



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ena Dumančić

**ULOGA INTERAKCIJE PROTEINA TROL
I FNR U ODGOVORU BILJKE
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. NA
SUŠNE UVJETE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ena Dumančić

**ULOGA INTERAKCIJE PROTEINA TROL
I FNR U ODGOVORU BILJKE
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. NA
SUŠNE UVJETE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Hrvoje Fulgosi

Zagreb, 2026



University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Ena Dumančić

**THE ROLE OF TROL-FNR PROTEIN
INTERACTION IN *Arabidopsis thaliana*
(L.) HEYNH. IN RESPONSE TO
DROUGHT STRESS**

Doctoral thesis

Supervisor: dr. sc. Hrvoje Fulgosi

Zagreb, 2026

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Razvoj fotosinteze	2
1.2. Fotosintetski proteinski kompleksi	3
1.2.1. Fotosustav II	3
1.2.2. Kompleks citokrom <i>b₆f</i>	4
1.2.3. Fotosustav I	4
1.2.4. Feredoksin:NADP ⁺ oksidoreduktaza	4
1.2.5. ATP sintaza	5
1.2.6. Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza	6
1.3. Linearni i alternativni transportni lanac elektrona	7
1.4. Fotosintetska izmjena plinova	8
1.5. Plastidi	8
1.5.1. Pojava i razvoj plastida	9
1.5.2. Razvoj kloroplasta i unos proteina	9
1.5.3. Genom kloroplasta i komunikacija s jezgrom	10
1.5.4. Biogeneza i građa tilakoida i klorofila	11
1.5.5. Pomoćni fotosintetski pigmenti	12
1.5.6. Protein Tic62	13
1.6. Oksidacijski stres	13
1.6.1. Reaktivne kisikove vrste	14
1.7. Mehanizmi antioksidacijske obrane	16
1.7.1. Superoksid dismutaza	17
1.7.2. Katalaza	18
1.7.3. Askorbat peroksidaza	18
1.7.4. Pirogalol peroksidaza	18
1.8. Stresni uvjeti – suša	19
1.8.1. Fotosinteza u uvjetima sušnog stresa	19
1.9. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. kao modelni organizam	21
1.10. Rodanaze	21
1.10.1. Thylakoid rhodanase-like protein	23
1.10.2. Proteinski kompleks TROL-FNR	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. Biljni materijal	28

3.3. Mjerenje vlage i električne vodljivosti supstrata	30
3.4. Konfokalna mikroskopija signala reakcije reaktivnih kisikovih vrsta s fluorescentnim bojama	33
3.5. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima	34
3.5.1. Mjerenje aktivnosti SOD	34
3.5.2. Mjerenje aktivnosti CAT	35
3.5.3. Mjerenje aktivnosti APX	36
3.5.4. Mjerenje aktivnosti PPX	37
3.6. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata	38
3.7. Kvantitativna westernska metoda otiska velike podjedinice enzima RUBISCO	39
3.8. Mjerenje fotosintetskih parametara izmjene plinova	41
3.9. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista	42
3.10. Statistička obrada podataka	43
4. REZULTATI	45
4.1. Funkcionalna analiza utjecaja potpunog izostanka proteina TROL i delecije domene RHO na regulaciju vezanja FNR-a tijekom sušnog stresa	45
4.1.1. Utjecaj sušnog stresa na akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta	45
4.1.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima	55
4.1.3. Udio fotosintetskih pigmenata	58
4.1.4. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO	63
4.1.5. Promjene parametara fotosintetske izmjene plinova	64
4.1.6. Promjene u anatomiji lista	68
4.2. Funkcionalna analiza utjecaja delecije domena ITEP i PEPE na interakciju FNR-a i strukturnu dinamiku proteina TROL tijekom sušnog stresa	69
4.2.1. Utjecaj sušnog stresa na akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta	69
4.2.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima	79
4.2.3. Udio fotosintetskih pigmenata	82
4.2.4. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO	87
4.2.5. Promjene parametara fotosintetske izmjene plinova	88
4.2.6. Promjene u anatomiji lista	92
4.3. Funkcionalna analiza uloge aminokiseline 207 u rodanaznoj domeni proteina TROL tijekom sušnog stresa	93
4.3.1. Utjecaj sušnog stresa na akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta	93
4.3.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima	103
4.3.3. Udio fotosintetskih pigmenata	106
4.3.4. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO	111
4.3.5. Promjene parametara fotosintetske izmjene plinova	112
4.3.6. Promjene u anatomiji lista	116

5. RASPRAVA	118
5.1. Funkcionalne posljedice mutacija TROL KO i TROL Δ RHO	118
5.2. Funkcionalne posljedice mutacija Δ ITEP i Δ PEPE	125
5.3. Funkcionalne posljedice mutacija D207E i D207N	128
6. ZAKLJUČCI	132
7. LITERATURA	133

Ovaj doktorski rad izrađen je na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Zavoda za molekularnu biologiju, pod vodstvom dr. sc. Hrvoja Fulgosija, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je izrađen i financiran u sklopu HRZZ projekta „Procjena fotosintetske aktivnosti i fotozaštitnog potencijala TROL-FNR razdjelnice“ (IP-2020-02-8590).

Zahvaljujem dr. sc. Hrvoju Fulgosiju na prilici i mogućnosti za izradu ovog doktorskog rada, te na kontinuiranom vodstvu, pomoći i unaprjeđivanju pri izradi rada.

Zahvaljujem dr.sc. Lei Vojta na suradnji, pomoći i savjetima.

Hvala svim ostalim suradnicima na pomoći.

Hvala svima koji su bili upućeni u izradu mog doktorskog rada.

Informacije o mentoru

Dr. sc. Hrvoje Fulgosi voditelj je laboratorija te znanstveni savjetnik u trajnom izboru Instituta Ruđer Bošković. Uspješno vodi Laboratorij za molekularnu biljnu biologiju i biotehnologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Stručnjak je u području biljne biologije. U svojoj znanstvenoj karijeri uspješno je proveo mnoge projekte uključujući i projekt u sklopu kojega je izrađen ovaj doktorski rad. Autor je i koautor brojnih istaknutih znanstvenih radova te dobitnik znanstvenih nagrada. Također je iskusan mentor sa zavidnim brojem doktoranada i diplomanata.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Doktorski rad

Uloga interakcije proteina TROL i FNR u odgovoru biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. na sušne uvjete

Ena Dumančić

**Institut Ruđer Bošković
Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb**

Fotosinteza je važan biokemijski proces koji se odvija u specijaliziranim organelima fotoautotrofnih organizama, kloroplastima. Pri tome se sintetiziraju ugljikohidrati i oslobađa molekularni kisik kao sporedni produkt. Važan dio ovog procesa je zadnji korak transporta elektrona s reduciranih molekula feredoksina na molekulu NADP^+ . Ovaj korak katalizira flavoenzim feredoksin NADP^+ oksidoreduktaza (FNR) koji se u obliku dimera veže na tilakoidne membrane pomoću proteina *Thylakoid Rhodanase-Like* (TROL). Dimer FNR vezan na TROL katalizira sintezu NADPH , a slobodan FNR sprječava nastanak reaktivnih kisikovih vrsta. Par TROL-FNR utječe na transport elektrona i uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta, što upućuje na zaštitnu ulogu ovog para u fotosintezi. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako mutacije u pojedinim domenama proteina TROL u biljci *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. utječu na raspodjelu fotosintetskih elektrona, a posebno u stresnim uvjetima suše. Eksperimentalne biljke uzgajane su u kontroliranim uvjetima koji vjerno oponašaju uvjete u prirodi. Detekcija reaktivnih kisikovih vrsta provedena je konfokalnom laserskom pretražnom mikroskopijom primjenom fluorescentnih boja. Različite mutacije proteina TROL pokazale su sposobnost zaštite biljaka od reaktivnih kisikovih vrsta u uvjetima sušnog stresa. Stopa asimilacije ugljikovog dioksida utvrđena je uređajem za mjerenje izmjene fotosintetskih plinova, a razlikovala se među mutantnim linijama i u odnosu na divlji tip (WT), kao i unutar svake linije s obzirom na uvjete uzgoja. Ekspresija velike podjedinice enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RUBISCO) kvantificirana je westernskom metodom otiska i bila je različita u usporedbi s WT-om, ali i ovisno o uvjetima uzgoja među nekim mutantnim linijama. Promjene u anatomiji lista, analizirane svjetlosnom mikroskopijom poludebelih prereza, također su zabilježene u usporedbi mutantnih linija s WT-om, kao i među mutantnim linijama pri različitim uvjetima rasta. Fiziološko stanje biljaka pri različitim uvjetima rasta dodatno je ispitano mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima i sadržaja fotosintetskih pigmenata. Linije s mutacijama proteina TROL pokazale su sposobnost antioksidacijske zaštite te fiziološke i anatomske prilagodbe u uvjetima sušnog stresa. Daljnja istraživanja dinamičke interakcije para TROL-FNR mogla bi pridonijeti razvoju biljaka s povećanom tolerancijom na stres.

147 stranica, 75 slika, 5 tablica, 208 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: reaktivne kisikove vrste, antioksidacijska obrana, interakcija proteina, fotosinteza, TROL, FNR

Mentor: dr. sc. Hrvoje Fulgosi, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

Ocjenjivači: dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, redoviti profesor

dr. sc. Biljana Balen, redoviti profesor u trajnom zvanju

dr. sc. Igor Weber, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

The role of TROL-FNR protein interaction in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in response to drought stress

Ena Dumančić

**Ruder Bošković Institute
Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb**

Photosynthesis is an important biochemical process of photoautotrophic organisms that takes place in the specialized organelles, chloroplasts, where carbohydrates are synthesized and molecular oxygen is released as byproduct. The very important part of this pathway is the final step of the electron transport chain, in which the transfer of electrons from reduced ferredoxin to NADP^+ occurs. This step is catalyzed by the flavoenzyme ferredoxin NADP^+ oxidoreductase (FNR), which binds to thylakoid membranes as a dimer via the TROL protein. Paired with TROL, the FNR dimer catalyzes NADPH synthesis, whereas FNR, when released, prevents the formation of reactive oxygen species. The influence of the TROL-FNR pair on photosynthetic electron distribution and reactive oxygen species scavenging suggest the protective role of this interaction. The objective of this research is to determine how different mutations in the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. TROL protein domains affect electron distribution, especially under drought stress conditions. Experimental plants are grown under controlled conditions which are highly similar to natural conditions. Detection of reactive oxygen species was carried out by confocal laser scanning microscopy in combination with fluorescent probes. Different TROL protein mutations demonstrated the ability to protect plants from reactive oxygen species under drought stress. The assimilation rate of carbon dioxide was measured using a photosynthetic gas exchange device and varied among mutant lines, compared to the wild type (WT), and within each line depending on the growing conditions. The expression of the large subunit of the enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO) was quantified by the Western blot method and differed from the WT, as well as among some mutant lines depending on the growing conditions. Changes in leaf anatomy, analysed by light microscopy of semi-thick sections, were also observed when comparing mutant lines with the WT and among mutant lines under different growth conditions. The physiological state of plants under different growth conditions was further assessed by measuring the activities of antioxidant enzymes and the content of photosynthetic pigments. Lines with TROL protein mutations exhibited antioxidant protection as well as physiological and anatomical adaptations under drought stress conditions. Further research into the dynamic interaction of the TROL-FNR pair could contribute to the development of plants with enhanced stress tolerance.

147 pages, 75 figures, 5 tables, 208 references, original in Croatian

Keywords: reactive oxygen species, antioxidative defense, protein interaction, photosynthesis, TROL, FNR

Supervisor: Hrvoje Fulgosi, Ph.D., Scientific advisor with tenure

Reviewers: Željka Vidaković-Cifrek, Ph.D., Full professor

Biljana Balen, Ph.D., Full professor tenure

Igor Weber, Ph.D., Scientific advisor with tenure

Popis kratica

$^1\text{O}_2$ – singletni kisik

ADP – adenzin difosfat

AK – aminokiselina

ANOVA – analiza varijance

APS – amonijev persulfat

APX – askorbat peroksidaza

ASC – askorbat

ATP – adenzin trifosfat

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – kalcijev nitrat tetrahidrat

CaCO_3 – kalcijev karbonat

CAT – katalaza

CET – ciklički tok elektrona (*eng. cyclic electron transport*)

CO_2 – ugljikov dioksid

CoA – koenzim A

Cu – bakar

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – bakrov sulfat pentahidrat

Cyt *b₆f* – citokrom *b₆f* kompleks

DHA – dehidroaskorbat

DHAR – DHA reduktaza

DHE – dihidroetidij

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DTT – ditiotritol

ECL – unaprijeđena detekcija kemilumiscencijom (*eng. enhanced chemiluminescent detection*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EPR – elektronska paramagnetska rezonanca

ETC – transportni lanac elektrona (*eng. electron transport chain*)

EtOH – etanol

FAD – flavin adenin dinukleotid

Fd – feredoksin

Fe – željezo

Fe-EDTA – željezo etilendiamintetraoctena kiselina

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – željezov sulfat heptahidrat

FNR – feredoksin-NADP⁺ oksidoreduktaza
FTR – Fd-ovisna TRX reduktaza
GPX – GSH peroksidaza
GR – NADPH-ovisna GSH reduktaza
GRX – glutaredoksin
GSH – glutation
GSSG – glutation disulfid
GST – glutation S-tranferaza
H₂O₂ – vodikov peroksid
H₃BO₃ – borna kiselina
HCl – klorovodična kiselina
HEPES – N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonat
ITEP – C-terminalna domena proteina TROL (*eng. Isothiocyanate-sensitive Thioredoxin-like domain with Proline-rich stretch*)
KCl – kalijev klorid
KH₂PO₄ – monokalijev fosfat
KNO₃ – kalijev nitrat
KO – *eng. knock out*
KOH – kalijev hidroksid
LED – svetleća dioda (*eng. light-emitting diode*)
LET – linearni tok elektrona (*eng. linear electron transport*)
LHC – antenski kompleks fotosistema (*eng. light harvesting complex*)
MDA – monodehidroaskorbat
MDHAR – MDA reduktaza
Mg – magnezij
MgSO₄ × 7H₂O – magnezijev sulfat heptahidrat
Mn – mangan
MnCl₂ × 4H₂O – manganov (II) klorid heptahidrat
Mo – molibden
MV – metil-viologen (*eng. methyl-viologen*)
Na₂HPO₄ × 7H₂O – dinatrijev fosfat heptahidrat
Na₃(C₆H₅O₇) × 2H₂O – natrijev citrat dihidrat
NaCl – natrijev klorid
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NaMoO₄ × H₂O – natrijev molibdat

NaOH – natrijev hidroksid

NBT – nitro plavi tetrazolij (*eng. nitro blue tetrazolium*)

NPQ – nefotokemijsko gašenje (*eng. non-photochemical quenching*)

NTRC – NADPH-ovisni redoks sustav

O₂ – molekularni kisik

O₂^{·-} – superoksidni radikal

·OH – hidroksilni radikal

PAM – *eng. pulse amplified modulation*

PAR – fotosintetski aktivno zračenje (*eng. photosynthetically active radiation*)

Pb(NO₃)₂ – olovo (II) nitrat

PBS – fosfatni pufer (*eng. phosphate buffered saline*)

PEPE – poliprolinska domena proteina TROL

PETC – fotosintetski transportni lanac elektrona (*eng. photosynthetic electron transport chain*)

PPX – pirogalol peroksidaza

PQ – plastokinon

PRX – peroksiredoksin

PSI – fotosustav I

PSII – fotosustav II

PVP – polivinilpirolidon

RHO – rodanazna domena proteina TROL

RNA – ribonukleinska kiselina

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

RuBP – ribuloza-1,5-bisfosfat

SDS – natrijev dodecil sulfat (*eng. sodium dodecil sulphate*)

Se – selen

SOD – superoksid dismutaza

SOSG – *eng. singlet oxygen sensor green*

Spy-LHP – „swallow-tailed“ derivat perilena za detekciju lipidnih hidroperoksida (*eng. swallow-tailed perylene derivative for detecting lipid hydroperoxides*)

tAPX – tilakoidni oblik enzima askorbat peroksidaze

TEM – transmisijaska elektronska mikroskopija (*eng. transmission electron microscopy*)

TEMED – tetrametiletildiamin

Tic – translokon unutarnje membrane ovojnice plastida (*eng. translocon at the inner envelope membrane of chloroplast*)

Toc – translokon vanjske membrane ovojnice plastida (*eng. translocon at the outer envelope membrane of chloroplast*)

TPX – tiol-ovisna peroksidaza

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

TROL – *eng. thylakoid rhodanase-like protein*

TRX – tioeredoksin

UV – ultraljubičasto zračenje (*eng. ultraviolet radiation*)

WT – divlji tip (*eng. wild type*); *A. thaliana* (L.) Heynh., ekotip Columbia (Col-0)

Zn – cink

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – cinkov sulfat heptahidrat

1. UVOD

Fotosinteza je proces koji omogućava život na Zemlji. S obzirom na važnost ovog procesa, ne iznenađuje činjenica da ga karakterizira visok stupanj složenosti i regulacije. Početni, od brojnih koraka ovog procesa, apsorpcija je fotona sunčeve svjetlosti, a krajnji korak je biosinteza ugljikohidrata (1). Kloroplasti su specijalizirani organeli autotrofnih organizama u kojima se odvija fotosinteza. Oni su semiautonomni organeli s vlastitim genom, ali su u koordinaciji s jezgrom (2). Sastoje se od unutarnje i vanjske membrane, koje čine plastidnu ovojnici i zatvaraju unutarnji dio, stromu, međumembranskog prostora, te sustava tilakoidnih membrana u stromi. Grana tilakoidi sačinjeni su od zbijenih naslaganih tilakoida, a međusobno ih povezuju stroma tilakoidi. Tilakoidne membrane zatvaraju prostor lumena. Na tilakoidnim membranama nalazi se niz proteinskih kompleksa koji omogućavaju prijenos elektrona pobuđenih fotonima svjetlosti, pretvorbu svjetlosne energije u energiju kemijskih veza, sintezu adenozin trifosfata (ATP) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (1). Cjelokupni proces fotosinteze može se podijeliti u dva dijela, svjetlosne reakcije i Calvin-Benson ciklus. Svjetlosne reakcije odvijaju se na membrani tilakoida i rezultiraju sintezom ATP-a i NADPH. Ovi produkti zatim se koriste u stromi, u Calvin-Benson ciklusu za fiksaciju ugljikova dioksida (CO_2) pomoću enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RUBISCO) i sintezu ugljikohidrata (3). Krajnji korak linearnog transporta elektrona (LET), odnosno sintezu NADPH katalizira flavoenzim feredoksin:NADP⁺ oksidoreduktaza (FNR) kojeg za tilakoidne membrane dinamički veže protein TROL (eng. *Thylakoid rhodanase-like*) (4). Protein TROL smješten je u tilakoidnoj membrani koju premošćuje s obje strane sa svoje dvije domene. Na strani lumena posjeduje neaktivnu rodanaznu (RHO) domenu, a na strani strome C-terminalnu domenu koja svojom hidrofobnom ITEP (eng. *Isothiocyanate-sensitive Thioredoxin-like domain with Proline-rich stretch*) regijom dinamički veže enzim FNR. Domeni ITEP prethodi domena PEPE bogata prolinima koji joj daju fleksibilnost, što je bitno za dinamičko vezanje FNR-a (5). N-terminalna regija, također u stromi, sadrži tranzitni peptid koji usmjerava protein TROL iz citosola u kloroplaste. Prijenos elektrona s reduciranog feredoksina (Fd) na NADP⁺ je reverzibilan i neciklički. FNR postoji u dva oblika: vezan za tilakoidne membrane, kada sudjeluje u efikasnoj redukciji NADP⁺, te u stromi u topivom obliku gdje sudjeluje u zaštiti od oksidacijskog stresa. Funkcija u vezanom obliku čini ga poveznicom između svjetlosnih reakcija i Calvin-Benson ciklusa. S obzirom na svoju oksidoreduktaznu aktivnost, prijenos elektrona može katalizirati i u suprotnom smjeru, s NADPH na Fd. Ovaj smjer reakcije poglavito je važan u situacijama prekomjerne redukcije fotosintetskog transportnog lanca

elektrona (PETC), a elektroni tada mogu biti preusmjereni u alternativne tokove (6, 7). Detaljnija daljnja istraživanja dinamičke interakcije proteinskog para TROL-FNR mogu dovesti do spoznaja koje bi omogućile razvoj biljaka otpornijih na stresne uvjete te koje bi mogle imati veći prinos biomase.

1.1. Razvoj fotosinteze

Oksigena fotosinteza složeni je proces koji se odvija u fotoautotrofnim organizmima, a osim što rezultira sintezom ugljikohidrata, omogućava život na Zemlji aerobnim organizmima. Apsorpcijom fotona svjetlosti pokreće se prijenos elektrona oslobođenih fotolizom vode (H_2O), duž tilakoidnih membrana. U toj reakciji oslobađaju se i protoni koji pomažu stvaranju elektrokemijskog gradijenta preko tilakoidne membrane, a molekularni kisik (O_2), koji je neophodan za život na Zemlji, oslobađa se kao sporedni produkt. Krajnji produkti PETC su ATP i NADPH koji se koriste kao izvor energije i redukcijski agens u Calvin-Benson ciklusu u kojem se odvija fiksacija CO_2 djelovanjem enzima RUBISCO. Produkt ovog ciklusa su molekule trioza-fosfata od kojih se dio koristi za biosintezu ugljikohidrata, a drugi dio trioza-fosfata koristi se za regeneraciju molekule koja se koristi kao akceptor CO_2 , ribuloza-1,5-bisfosfata (1). Proces fotosinteze zasnovane na klorofilu gotovo sigurno potekao je od bakterija. Točnije, smatra se da su alge i biljke kloroplaste stekle endosimbiozom sa cijanobakterijama koje su im prenijele svoje genetičke informacije (8). Postoje dvije teorije razvoja fotosinteze proizišle iz istraživanja evolucije reakcijskih centara, a to su model fuzije i model selektivnog gubitka. Prema modelu fuzije, reakcijski centri razvili su se neovisno, u različitim linijama koje su se zatim spojile u jednu liniju, dok model selektivnog gubitka govori o razvoju anoksigene fotosinteze. Anoksigena fotosinteza odvija se u bakterijama koje sadrže samo jedan fotosustav, a tu spadaju zelene ne-sumporne i sumporne, purpurne i heliobakterije (9). Prema tom modelu, postojali su predci cijanobakterija koji su sadržavali dva fotosustava od kojih se evolucijskim razvojem jedan izgubio. Vrsta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. pokazuje podudaranje porijekla s cijanobakterijama u 18% genoma (10) a zajedničko im je i postojanje dvaju fotosustava koji u reakcijskim središtima sadrže Fe-S klastere i kinon (9). Oksigenu fotosintezu danas provode biljke, cijanobakterije i neke alge. Veliki porast O_2 u atmosferi dogodio se prije 2,45 milijardi godina, a smatra se da su predci cijanobakterija sunčevim svjetlom potaknutu oksigenu fotosintezu provodili i ranije, sudeći prema fosilnim nalazima starim 3,5 milijarde godina (10). Prije pojave O_2 u atmosferi, smatra se da su anoksigene fotosintetske bakterije prve provodile fotosintezu, a za fiksaciju ugljika koristile su vodik kao izvor elektrona (9). Porast O_2 u atmosferi promijenio je redoks balans na Zemlji

kojem su se organizmi morali prilagoditi ili uspostaviti aerobni način života kako ne bi izumrli. Korištenjem O₂ kao krajnjeg oksidansa repertoar metaboličkih procesa se znatno proširio (10).

1.2. Fotosintetski proteinski kompleksi

Tilakoidne membrane na kojima se odvijaju fotosintetske reakcije ovisne o svjetlosti sadrže proteinske komplekse koji omogućuju tok elektrona. U njih spadaju fotosustav II (PSII), citokrom *b₆f* kompleks (Cyt *b₆f*), fotosustav I (PSI), te prenosioci između njih koji ih povezuju. Uz ovaj niz proteinskih kompleksa nalazi se i ATP sintaza, membranski enzim koji koristi energiju nastalog protonskog gradijenta za sintezu ATP-a koji se oslobađa u stromu. Svjetlosna energija koja pokreće tok elektrona apsorbira se pomoću antenskih kompleksa fotosustava koji se sastoje od različitih proteinskih podjedinica i pigmenata, te prenose energiju do reakcijskih središta. Energija se predaje klorofilu *a* koji se nalazi u reakcijskom središtu. Oksidacijom dviju molekula vode u području fotosustava II oslobađa se jedna molekula kisika te protoni i elektroni. Elektroni od PSII putuju preko plastokinona (PQ) do kompleksa Cyt *b₆f*, pa preko plastocijanina (PC) do PSI i Fd, a njihov tok stvara i elektrokemijski gradijent preko tilakoidne membrane koji omogućava ATP sintazi proizvodnju ATP-a (3).

1.2.1. Fotosustav II

PSII je kompleks u tilakoidnoj membrani koji se sastoji od velikog broja podjedinica, a smješten je većinom na grana tilakoidima. Glavna podjela podjedinica je na četiri velike integrirane membranske podjedinice PsbA-D, tri izvan-membranske podjedinice PsbO-Q i velikog broja malih podjedinica. Podjedinica PsbA se još naziva i D1, a podjedinica PsbD naziva se D2 te one čine reakcijsko središte oko kojeg su ugrađene antene za apsorpciju fotona svjetlosti. Antene tvore veće komplekse za apsorpciju svjetlosti (eng. *light harvesting complex II*, LHCII), i manje Lhcb4-6 komplekse. Ovdje se također nalaze i dvije posebne molekule klorofila *a* koje se nazivaju P680, kojima je maksimum apsorpcije na 680 nm u crvenom dijelu spektra. Za prijenos elektrona u ovom području zaslužne su molekule feofitina koje su sadržane u kompleksu. Kada klorofil P680 preda elektrone feofitinu oksidiran je te može primiti elektrone koji nastaju fotolizom H₂O u području PSII putem kompleksa koji cijepa molekule vode. P680⁺ uzima elektrone vezane na manganske centre koji sadrže dva kalcijeva i četiri manganova iona. Pobuda klorofila P680 uzrokuje prijenos elektrona s feofitina na vezani PQ_A, pa na pokretni PQ_B. Dolaskom drugog elektrona vežu se i dva protona iz strome te nastaje reducirani PQH₂. Elektroni se prenose na kompleks Cyt *b₆f*, a protoni se oslobađaju u lumen. Fotolizom H₂O oslobođeni protoni održavaju nižu pH vrijednost u lumenu tilakoida te doprinose formiranju

elektrokemijskog gradijenta protona koji pokreće sintezu ATP-a putem ATP sintaze (11). PSII smješten je u tilakoidnoj membrani tako da se redukcija PQ odvija na stromalnoj strani, a kompleks za fotolizu H₂O se nalazi na strani lumena (12).

1.2.2. Kompleks citokrom b_6f

Kompleks Cyt b_6f je dimerni kompleks integriran u tilakoidnu membranu, a raspoređen je podjednako na grana i stroma tilakoidima. Sastoji se od 8 do 9 polipeptidnih podjedinica od kojih četiri najveće imaju definiranu funkciju. U njih se ubrajaju podjedinica IV, b_6 , Rieske Fe-S i f podjedinica. Uz njih se u kompleksu nalaze i četiri male podjedinice PetG, PetL-N (11). Sam kompleks katalizira prijenos elektrona koji dolaze preko PQH₂ na PC, mali topivi protein lumena tilakoida koji sadrži bakar. Pri toku elektrona koji katalizira Cyt b_6f , ukupno četiri protona oslobađaju se u tilakoidni prostor (12).

1.2.3. Fotosustav I

PSI smješten je većinom na stroma tilakoidima. Struktura jezgre PSI evolucijski je povezana sa strukturom jezgre PSII. PSI sastoji se od dvije velike podjedinice PsaA i PsaB, četiri izvan-membranske podjedinice PsaC, PsaD, PsaE, PsaN i integriranih membranskih podjedinica PsaF, PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL. Kompleks antena za apsorpciju fotona svjetlosti LHCI sastoji se od četiri polipeptida, uz klorofil a i b te ksantofila (11). Klorofil a u reakcijskom središtu PSI razlikuje se od onog u PSII po valnoj duljini maksimuma apsorpcije, a ovdje je ta valna duljina 700 nm. Klorofil P700 pobuđuje se prijenosom energije apsorbirane antenskim pigmentima, a podjedinica PsaF, smještena u blizini klorofila P700, ujedno je i visoko konzervirano vezno mjesto za PC koji donosi elektrone do PSI. Elektroni se iz PSI prenose na oksidirani Fd, topivi protein koji sadrži klaster 2Fe-2S. U ovom koraku, elektroni se prenose na stranu strome kloroplasta gdje se nalazi vezno mjesto za Fd. Zadnji korak prijenosa elektrona u LET-u je prijenos s reduciranog Fd na NADP⁺ pomoću enzima FNR. Osim toga, Fd može reducirati i tioredoksin (TRX) pomoću TRX reduktaze, a elektrone može predati i drugim enzimima i alternativnim putevima (13, 14).

1.2.4. Feredoksin:NADP⁺ oksidoreduktaza

FNR je flavoenzim građen od dvije domene međusobno povezane petljom. Na N-terminalnom završetku nalazi se domena koja veže kofaktor flavin adenin dinukleotid (FAD), a na C-terminalnom završetku nalazi se NADP⁺ vezujuća domena. Molekulska masa ovog proteina je 35-45 kDa. FNR katalizira posljednji korak prijenosa elektrona u PETC, odnosno reverzibilni

neciklički prijenos elektrona s reduciranog Fd na NADP^+ . U ovoj reakciji koriste se dvije molekule reduciranog Fd i FAD kao kofaktor. FAD prima dva elektrona i protona s dvije molekule reduciranog Fd te nastaje FADH_2 , nakon čega se hidridni ion prenosi na NADP^+ . Vezno mjesto za Fd nalazi se u udubini između dvije domene, a u vezanje je uključen i fleksibilni N-terminalni završetak (15, 16). Reakcija se odvija na stromalnoj strani s koje se uzimaju protoni za redukciju. Produkt reakcije je NADPH, koji kao donor elektrona sudjeluje u Calvin-Benson ciklusu za fiksaciju CO_2 . Osim osiguravanja reduciranih donora elektrona u procesu fiksacije CO_2 u kloroplastima, u nefotosintetskim plastidima FNR sudjeluje u fiksaciji i redukciji dušika, oksidaciji metana, metabolizmu steroida, biogenezi Fe-S klastera, desaturaciji masnih kiselina (6, 17, 18), biosintezi izoprenoida, (19) te obrani od oksidacijskog stresa regeneracijom reduciranog glutationa (GSH) pomoću GSH reduktaze ovisne o NADPH (20, 21). FNR može biti prisutan u dva oblika: topiv u stromi ili vezan u proteinske komplekse za tilakoidne membrane, a izoforme su tkivno specifične (22). Istraživanja na mutantama TROL KO, koje imaju manju količinu vezanog FNR-a, pokazala su da FNR vezan za membrane sudjeluje u efikasnoj redukciji NADP^+ , dok topivi oblik sudjeluje u obrani od reaktivnih kisikovih vrsta, poglavito superoksidnog radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$), preusmjeravanjem elektrona u alternativne tokove (5, 23). S obzirom na oksidoreduktaznu aktivnost FNR-a, reakcija koju katalizira može se odvijati i u smjeru oksidacije NADPH, što je bitna karakteristika za održavanje redoks ravnoteže u situacijama prekomjerne redukcije PETC, odnosno u uvjetima stresa (6, 7). U vezanom obliku na tilakoidnoj membrani, FNR može biti povezan u komplekse s proteinima translokona unutarnje membrane ovojnice plastida (*eng. translocon at the inner envelope membrane of chloroplast*, Tic62) i TROL (4, 17, 24), budući da ova dva membranska proteina dijele vrlo sličnu građu FNR vezujuće domene s prolinskim i serinskim aminokiselinским (AK) ostatcima. Tic62 više sudjeluje u stabilizaciji FNR-a, dok TROL omogućava efikasan LET (24). FNR ima smanjenu stabilnost pri nižoj pH vrijednosti što je u kloroplastima slučaj noću (25). U vrsti *A. thaliana*, modelnom organizmu koji se koristio u ovom istraživanju, postoje dvije izoforme, AtFNR1 i AtFNR2. Smatra se da je izoforma AtFNR1 vezana za membranu, a AtFNR2 sudjeluje u retrogradnoj signalizaciji (26).

1.2.5. ATP sintaza

ATP sintaza katalizira proces sinteze ATP-a iz adenzin difosfata (ADP) i fosfata, a smještena je većinom u stroma tilakoidima. Ovaj proces moguć je zahvaljujući elektrokemijskom gradijentu preko tilakoidne membrane koji nastaje uslijed spomenute fotolize H_2O u području

PSII i prijenosa elektrona. Strukturu ATP sintaze čine dvije podjedinice, hidrofilna podjedinica F1 koja je okrenuta na stranu strome kloropasta, te membranska, hidrofobna podjedinica FO okrenuta na stranu tilakoidnog lumena. Protoni kroz enzim prolaze u području njihove visoke koncentracije i to preko podjedinice FO, dok se u području niske koncentracije protona odvija sinteza ATP-a preko podjedinice F1. Prilikom sinteze ATP-a dolazi do rotacije heksamernog rotora F1 podjedinice, u čijem središtu se nalazi podjedinica γ oko koje se nalaze po tri homologne nekatalitičke α i katalitičke β podjedinice (11). F1 podjedinica još sadrži i manju, na heksamer povezuju δ podjedinicu, i na γ povezane ϵ podjedinice. FO podjedinica sastoji se od 10 do 14 c komponenti koje formiraju prsten uronjen u membranu, a na čijem vanjskom dijelu se nalazi a podjedinica. Podjedinice F1 i FO povezane su pomoću podjedinica $\gamma\epsilon$ i dvjema b podjedinicama koje se vežu na a i δ podjedinice (12).

1.2.6. Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza

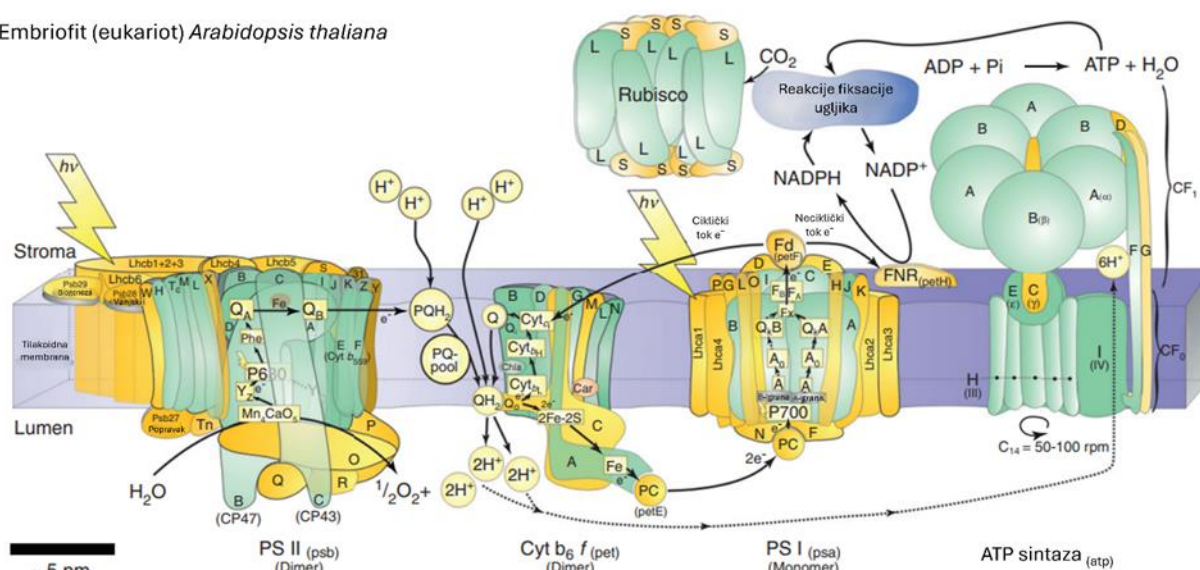
Prvi korak Calvin-Benson ciklusa primarna je fotosintetska reakcija, tj. vezanje CO_2 na akceptorsku molekulu ribuloza-1,5-bisfosfata kako bi nastale dvije molekule 3-fosfoglicerata. Ova reakcija katalizirana je enzimom RUBISCO koji se nalazi u većini autotrofnih organizama, a u listovima biljaka može iznositi i do 50% ukupnih topivih proteina. Lokaliziran je na stromalnoj strani tilakoidne membrane. Enzim RUBISCO sastoji se od dva različita tipa podjedinica: velikih katalitičkih i malih podjedinica. Biljni enzim RUBISCO sastoji se od 8 velikih i malih podjedinica. Male podjedinice kodirane su genomom jezgre, a velike genomom kloroplasta. Pojavljuje se u više molekularnih strukturnih oblika različitih po prisutnosti malih podjedinica koje nisu neophodne za katalitičku aktivnost. Uz to, struktura velike podjedinice više je konzervirana. Male podjedinice doprinose strukturnoj stabilnosti te kinetičkim svojstvima enzima. Aktivno mjesto nalazi se unutar dimera između C-terminalnog završetka jedne i N-terminalnog završetka druge velike podjedinice. Za vezanje supstrata potrebna je prethodna aktivacija enzima. To se kod biljaka postiže pomoću enzima RUBISCO aktivaze, vezanjem iona Mg^{2+} na lizin aktivnog mjesta pomoću dodatne molekule CO_2 . Magnezijev ion služi za aktivaciju molekule supstrata stabiliziranjem njegova negativnog naboja. Enzim RUBISCO poprilično je spor katalizator, a njegova karboksilacijska aktivnost u kompeticiji je s oksigencijskom aktivnošću, odnosno vezanjem O_2 , što smanjuje učinkovitost nastanka fotosintetskih produkata. O_2 se u atmosferi nalazi u većem volumnom udjelu u usporedbi s CO_2 , a uz to reakcija oksigenacije brža je u odnosu na reakciju karboksilacije (12, 27, 28). Redoks promjene u stromi uzrokovane svjetlošću i fosforilacijski potencijal određen stromalnim

omjerom ATP/ADP određuju aktivnost enzima RUBISCO aktivaze, a proces je posredovan mehanizmom Fd/TRX. Stopa asimilacije CO₂ putem enzima RUBISCO ograničavajući je korak u procesu sinteze ugljikohidrata (29, 30).

1.3. Linearni i alternativni transportni lanac elektrona

Pri povoljnim okolišnim uvjetima i normalnim energetskim potrebama elektroni se prenose navedenim proteinskim podjedinicama linearnim tokom. Ako dođe do poremećaja redoks i energetskog stanja, elektroni se usmjeravaju u alternativne tokove od kojih je najbolje opisan ciklički elektronski transport (CET). LET rezultira sintezom ATP-a i NADPH, dok CET za rezultat ima samo ATP, kako bi se omogućio Calvin-Benson ciklus (31) i zaštitile komponente fotosintetskog sustava od prekomjerne redukcije (32). Pri visokom omjeru NADPH/NADPH⁺ nema dovoljno dostupnog akceptora elektrona s Fd. Tada se elektroni s Fd prenose na Cyt *b₆f* i PC te ponovno na PSI, pri čemu se protonski gradijent za sintezu ATP-a i dalje stvara. ATP je izvor energije, a NADPH izvor visokoenergetskih elektrona (Slika 1).

Embriofit (eukariot) *Arabidopsis thaliana*



Slika 1. Fotosintetski aparat viših biljaka. Slika preuzeta i prilagođena iz Allen i sur. 2011 (33). ADP – adenzin difosfat, ATP – adenzin trifosfat, Car – karotenoidi, CF₁ i CF₀ – podjedinice ATP sintaze, Chl – klorofil, CO₂ – ugljikov dioksid, CP – klorofil vezujući proteini, Cyt *b₆f* – citokrom *b₆f* kompleks, e⁻ – elektron, Fd – feredoksin, Fe – željezo, FNR – flavoenzim feredoksin NADP⁺ oksidoreduktaza, H⁺ – proton, hν – foton svjetlosne energije, LHC – antenski kompleks fotosistema (eng. *light harvesting complex*), Mn₄CaO₅ – mangan-kalcij-oksidi klaster, NADPH/NADP⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat, P680 – klorofil P680, P700 – klorofil P700, PC – plastocijanin, pet – fotosintetski transport elektrona (eng. *photosynthetic electron transport*), Phe – feofitin, Pi – ortofosfat, PSI/psa – fotosustav I, PSII/psb – fotosustav II, PQH₂ – plastokinol, Rubisco – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza, Q – plastokinon, 2Fe-2S – željezo-sumpor klaster. Pojedinačna slova označavaju podjedinice kompleksa.

1.4. Fotosintetska izmjena plinova

Najvažnije varijable koje opisuju učinkovitost fotosinteze su stopa asimilacije CO_2 i transpiracija, a mogu se mjeriti izmjenom plinova. Mjerenje izmjene fotosintetskih plinova pokazuje kako se tok CO_2 i H_2O između lista i atmosfere mijenja s promjenom uvjeta u okolišu i kako dugotrajni različiti uvjeti utječu na biljku (34). Za fotosintetsku fiksaciju ugljika, CO_2 prvo mora difundirati iz atmosfere u unutrašnjost lista što je omogućeno putem puči. Osim toga, puči su odgovorne za izmjenu svih plinova između atmosfere i biljaka. Vodena para i O_2 izlaze istim putem kojim CO_2 ulazi. S obzirom na bitnu ulogu puči u izmjeni fotosintetskih plinova, treba napomenuti da su njihova morfologija, kvantiteta, kinetika i raspored također varijabilne i važne (35). U uvjetima sušnog stresa provodnost puči smanjuje se, a fotosinteza je u velikoj mjeri regulirana zatvaranjem puči koje smanjuje mogućnost unosa CO_2 i koncentraciju CO_2 u listu. Iz istog razloga smanjena je i transpiracija. Zbog ovih mehanizama smanjena je stopa izmjene fotosintetskih plinova (34). Fotorespiracija, proces u kojem se CO_2 oslobađa na svjetlosti, usko je povezan s fotosintezom. Fotorespiraciju pokreće povećana koncentracija O_2 i nedostatak CO_2 u listu, što je uzrokovano zatvorenim pučima. U toj situaciji enzim RUBISCO veže O_2 umjesto CO_2 . Povišena temperatura također favorizira reakciju oksigenacije. Ravnotežu fotosinteze i fotorespiracije određuje koncentracija O_2 i CO_2 te kinetička svojstva enzima RUBISCO. Fotorespiracija može služiti kao put odvoda elektrona u uvjetima stresa upotrebom reducirajućih ekvivalenata. Učinkovitost fotosinteze može se opisati i kao prinos organske tvari jer se u procesu fotosinteze CO_2 prevodi u ugljikohidrate, pa veća učinkovitost fotosinteze znači i veći prinos organske tvari (36).

1.5. Plastidi

Biljne stanice sadrže razne vrste plastida koji se razlikuju po svojoj lokalizaciji i ulozi. Kloroplastima je, kako je već spomenuto, primarna zadaća provođenje procesa fotosinteze, a zbog toga što sadrže klorofil zelene su boje. Struktura i funkcije im se razlikuju ovisno o tipu fotosinteze koja može biti C_3 , C_4 ili CAM (37). Još možemo razlikovati kromoplaste koji sudjeluju u sintezi i skladištenju karotenoida u cvjetovima i plodovima te pojedinim listovima i korijenju (38). Amiloplasti se često mogu naći u stanicama korijena, gomoljima, kotiledonima i endospermu sjemenki. Oni ne sadrže pigmente, već zalihe škroba nastalog u fotosintezi, a imaju i visoku aktivnost puta pentoza fosfata koji generira energiju za asimilaciju dušika. Etioplasti se nalaze u kotiledonima i sjemenkama tijekom klijanja u uvjetima nedostatka svjetlosti. Leukoplasti i elaioplasti specijalizirani su za skladištenje lipida (37).

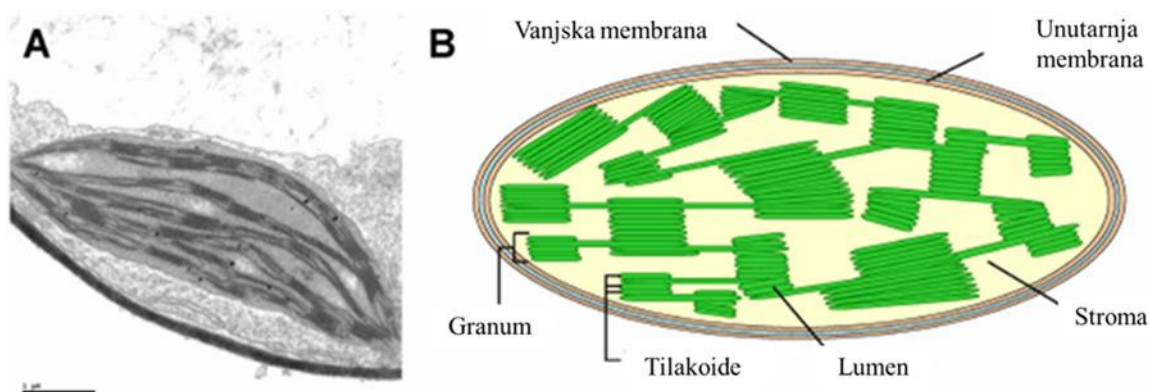
1.5.1. Pojava i razvoj plastida

Eukarioti s vlastitom jezgrom i mitohondrijima postali su domaćini prokariotima nalik na cijanobakterije prije približno 1,5 milijardi godina. Plastidi današnjih algi i biljaka dijele brojne sličnosti s cijanobakterijama. Kod kopnenih biljaka plastidi su dinamični organeli koji tijekom razvojnog ciklusa biljke i u različitim uvjetima okoliša mogu mijenjati svoj tip, tj. prilagođavati svoju strukturu i funkciju potrebama stanice. Tijekom evolucijskog razvoja genom plastida znatno je reduciran. Mnogi geni u potpunosti su izgubljeni jer nisu bili potrebni, dok su neki premješteni u jezgru domaćina. Taj prijenos nikada nije do kraja završen. Stoga funkcionalni plastidi vaskularnih biljaka danas sadržavaju ≈ 100 protein-kodirajućih gena u vlastitom genomu, plastomu, koji uglavnom kodiraju ključne proteine fotosintetskog aparata. Ostali proteini kodirani su genomom jezgre te se kao prekursori proteina transportiraju iz citosola u plastide (38). Postoji više mogućnosti zašto prijenos gena iz plastida u jezgru nije završen. Moguće je da se proteini koji su kodirani jezgrinim genomom ne bi mogli transportirati iz citoplazme u plastid. S druge strane, smatra se i da su geni zadržani u plastidima odgovorni za održavanje redoks homeostaze (39, 37). Također, moguće je i da podjela gena između jezgre i plastida održava regulaciju sinteze proteina i formiranja organela. Prvi simbiotski fotosintetski organizmi podijeljeni su s obzirom na pigmente, građu plastida i evolucijsku povijest u tri linije, zelenu i crvenu liniju te glaukofite, a zelena linija kolonizirala je Zemlju izvan oceana (37). Moderne cijanobakterije su gram negativne, imaju staničnu stijenku između dvije membrane koje okružuju stanicu. To znači da je evolucija kloroplastnih ovojnica uključivala gubitak stanične stijenke, a zadržala se samo u glaukofitima (40).

1.5.2. Razvoj kloroplasta i unos proteina

Kloroplasti se ne nasljeđuju u diferenciranom obliku. U kritosjemenjača nasljeđuju se uniparentalno citoplazmom jajne stanice (41). Tijekom razvoja biljke plastidi moraju se diferencirati u odgovarajući tip. Diferencijacija se odvija iz proplastida koji se nalaze u meristemskom tkivu i posjeduju samo primitivne elemente unutarnje membranske ovojnice. Razvojem bez svjetlosti (skotomorfogeneza) proplastidi se diferenciraju u etioplaste, u određenim okolnostima u kromoplaste, a u prisutnosti svjetlosti (fotomorfogeneza) u kloroplaste s razvijenim tilakoidnim sustavom i klorofilima (Slika 2), te visokom ekspresijom fotosintetskih gena (38). Skotomorfogeneza se preskače ako klijanje počinje na svjetlosti. Fotomorfogeneza nastupa percipiranjem svjetlosti putem fotoreceptorskih proteina fitokroma i kriptokroma. Oni aktiviraju ekspresiju gena iz jezgre koji kodiraju kloroplastne proteine. Važno obilježje razvoja kloroplasta sinteza je klorofila za koju je u većini biljaka također potrebno

svjetlo, a naziva se deetirolacija, zbog promjene plastida iz etioplasta u kloroplast. Etioplasti su prijelazni oblik u sintezi kloroplasta. U tami je eoplast međukorak prije razvoja etioplasta u kotiledonima, a oni se u hipokotiledonu i korijenu razvijaju u leukoplaste. Kloroplasti se dijele samostalnom diobom formiranjem unutarnjih i vanjskih kontraktilnih prstena. U procesu binarne fisije šire se dok stanica ne sazrije, nakon čega kloroplasti uglavnom više nisu sposobni za diobu. Iako se dijeliti može i razvijeni kloroplast, najčešće se dijele proplastidi, etioplasti i mladi kloroplasti. Unos proteina kodiranih jezgrom i sintetiziranih u citoplazmi započinje već tijekom biogeneze kloroplasta. Na membranama kloroplasta nalaze se proteinski kompleksi koji omogućuju unos proteina. To su translokoni vanjske membrane ovojnice plastida (*eng. translocon at the outer envelope membrane of chloroplast, Toc*) i translokoni unutarnje membrane ovojnice plastida čije su sastavne podjedinice aktivne ovisno o dostupnom svjetlu, te su supstratno specifične. Signalni slijed proteina odgovoran za unos u kloroplast nalazi se na njihovom N-terminalnom završetku, a nakon uspješnog unosa razgrađuje se peptidazama. Tranzitni peptid nema konzervirani slijed, a sadrži od 30 do više od 100 uglavnom malih, pozitivno nabijenih AA. Unos se odvija uz utrošak ATP-a (40).



Slika 2. Struktura kloroplasta A) snimka TEM-om; B) Shematski prikaz. Slika preuzeta i prilagođena iz Kindgren 2010 (42). Mjerilo predstavlja duljinu 1 μm .

1.5.3. Genom kloroplasta i komunikacija s jezgrom

Budući da su kloroplasti organeli nastali endosimbiozom, oni su semiautonomni. Stoga je potrebna koordinacija genske ekspresije, pa se između kloroplasta i jezgre razvilo anterogradno i retrogradno signaliziranje (43-45). Za adaptaciju kloroplasta uvjetima u okolišu odgovorni su jezgrini geni. Kloroplasti koriste svoje redoks procese kao signale da bi regulirali ekspresiju gena (37, 44, 45). Signali na relaciji plastid-jezgra (retrogradni) kontrolirani su stromalnim omjerom ATP/ADP, transtilakoidnim gradijentom pH vrijednosti i redoks stanjem fotosintetskih komponenti (46). Signali upućeni iz kloroplasta prema jezgri mogu se podijeliti u dvije kategorije: biogeni, koji informiraju o stanju kloroplasta tijekom biogeneze, te

operacijski, koji omogućavaju brzi odgovor na promjene stanja u okolišu i sprječavanje oksidacijskih oštećenja (47).

1.5.4. Biogeneza i građa tilakoida i klorofila

Proplastidi sadrže nekoliko unutarnjih membrana u obliku vezikula. Proces sazrijevanja počinje formiranjem duge lamele u proplastidu koja se transformira u diskove za formiranje grana tilakoida (48). Sinteza tilakoida zahtijeva povećanje sadržaja galaktolipida, čija sinteza je koordinirana sa sintezom klorofila i proteina (49). Materijal za sintezu i održavanje tilakoidnih membrana potječe iz unutarnje membranske ovojnice kloroplasta (50). Postoje tri glavne sile koje dovode do diferencijacije tilakoida u grana ili stroma oblik, a to su: van der Waalsove privlačne sile i kationske elektrostatske interakcije između membrana, lateralna segregacija proteinskih kompleksa unutar membrana i sterički efekti. Konačni oblik grana tilakoida još ovisi i o vrsti i postotku lipida i njihovom međudjelovanju s proteinskim kompleksima. Biogeneza tilakoida i kloroplasta su međuovisne. Tako se LHCII smatra odgovornim za elektrostatske interakcije između membrana i proteina. Kloroplasti s deficitom klorofila *b* ne mogu proizvesti normalne grana tilakoide. Nizak omjer lipida i proteina onemogućava normalno slaganje proteinskih kompleksa duž tilakoidnih membrana. Jedna od glavnih posljedica slaganja grana tilakoida fizička je razdvojenost PSII i PSI. Kada bi bili blizu, došlo bi do nekontroliranog toka energije, a razdvajanjem je omogućena i kontrola apsorpcije potrebne količine svjetlosti pomoću antena, pokrivanje većeg dijela svjetlosnog spektra te balansiranje između LET-a i CET-a (11). Također, PSI i PSII razlikuju se u količinama u kojima se pojavljuju u kloroplastima. Naime, PSII je sporiji i osjetljiviji na oštećenja, posebno zbog procesa cijepanja vode i stvaranja jakih oksidansa, pa biljka treba više PSII kompleksa kako bi održala učinkovit tok elektrona i nadoknadila gubitke (13). Klorofil se sastoji od četiri pirolna prstena povezana metilnim skupinama, u čijem je središtu na njihove dušikove atome vezan ion magnezija. Jedan od pirolnih prstena je reduciran, a jedan sadrži dodatno pripojen prsten od pet ugljikovih atoma. Također je prisutan i fitol, hidrofolbni alkohol od 20 ugljikovih atoma koji je povezan esterskom vezom na pirolni prsten i odgovoran je za topivost klorofila u vodi. Fitolnim repom klorofil se pričvršćuje za proteine membrane. Klorofil sadrži slabo vezane elektrone koji se apsorpcijom svjetlosne energije pobuđuju i prenose nizom prenosioca u PETC, a učinkovitost klorofila proizlazi iz njegove polienske prirode, sadrži alternirajuće jednostruke i dvostruke veze. Klorofil *b* se razlikuje od klorofila *a* po tome što sadržava formilnu skupinu umjesto metilne na pirolskom prstenu 2. Klorofil *a* maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm i 662 nm, a klorofil *b* svjetlost valnih duljina 453 nm i 642 nm. Udio klorofila *b*

može iznositi do trećine ukupne količine klorofila *a*. Biosinteza klorofila izvodi se u kloroplastima i može se podijeliti u tri faze: sinteza klorofila *a* iz glutamata, konverzija klorofila *a* u klorofil *b*, te degradacija klorofila *a* (51). Tetrapiroлни prstenovi se sintetiziraju iz L-glutamata, a Mg-protoporfirin IX nastaje ugradnjom magnezija pomoću kelataze bez čega daljnja sinteza ne bi bila moguća. Jedna od reakcija biosinteze klorofila kod kritosjemenjača ovisna je o svjetlu, a kod golosjemenjača i algi nije. Daljnja esterifikacija omogućuje sintezu klorofila *a*, a iz njega se sintetizira klorofil *b* (39). Grana tilakoidi sadrže 80% ukupnog klorofila dok se ostatak nalazi u stroma tilakoidima (52).

1.5.5. Pomoćni fotosintetski pigmenti

Metaboličke promjene u uvjetima sušnog stresa mogu uzrokovati propadanje strukture kloroplasta i s time povezan gubitak klorofila te ostalih fotosintetskih pigmenata i smanjenje aktivnosti fotosinteze (53, 54). Uz to, djelotvorni spektar fotosinteze ne poklapa se u potpunosti s onim klorofila *a*, što znači da u procesu sudjeluju i pomoćni pigmenti (12, 36). Ovdje do izražaja dolaze karoteinoidi, koji pomažu biljci podnijeti uvjete sušnog stresa (54) u kojima dolazi do poremećaja omjera klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida, te općenitog smanjenja količine klorofila njegovom enzimskom razgradnjom (55). Karotenoidi su drugi najbrojniji pigmenti u prirodi kojih ima preko 700 vrsta. To su izduženi polieni s maksimumima apsorpcije u modrom dijelu svjetlosnog spektra - od 400 nm do 500 nm. Osim što su pomoćni fotosintetski pigmenti u LHC kompleksima i na tilakoidnim membranama, karotenoidi sudjeluju u fotozaštiti, antioksidacijskoj obrani i proizvodnji hormona. Igraju važnu ulogu u nefotokemijskom gašenju (*eng. non-photochemical quenching*, NPQ) i zaštiti od prekomjerno oksidiranog P680. Jedni su od ključnih neenzimskih antioksidansa, ali su isto tako i poprilično osjetljivi na oksidacijski stres nastao uslijed uvjeta sušnog stresa (12, 56, 57). β -karoten je u kloroplaste ugrađen u središnji kompleks PSI i PSII, gdje je zaštita od reaktivnih kisikovih vrsta esencijalna za funkcioniranje kloroplasta (54). Njegove zaštitne uloge očituju se u preuzimanju viška energije od tripletnog klorofila što sprječava nastanak singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) (48). Smanjenje količine fotosintetskih pigmenata način je zaštite fotosintetskog aparata od prevelike količine svjetlosti (58). Na razini prethodno opisane biosinteze klorofila (poglavlje 1.5.2.), u uvjetima sušnog stresa, dolazi do smanjene sinteze i sklapanja podjedinica klorofila, te do smanjenja sadržaja proteina koji vežu klorofil, odnosno smanjenja količine i učinkovitosti LHC (59). Mijenja se i fluorescencija klorofila koja se koristi kao indikator aktivnosti fotosintetskih reakcija (59). Unatoč navedenom, istraživanjima je utvrđeno da količina klorofila u stresu može biti smanjena ili povećana ovisno o tome koliko su biljke tolerantne na stres (60, 61).

1.5.6. Protein Tic62

Protein Tic62 je podjedinica Tic kompleksa koja zajedno s Toc kompleksom omogućuje unos preproteina u kloroplaste. Pojavljuje se na membranama kloroplasta, tilakoidnim membranama i u stromi. Tic kompleks sastoji se od do sada 7 otkrivenih podjedinica sa specijaliziranim funkcijama. Tic62, zajedno s podjedinicama Tic32 i Tic55 čini redoks regulacijsku skupinu podjedinica. I sam se smatra redoks senzorom zbog svoje dehidrogenazne aktivnosti, pozicioniranja u stromi i na unutarnjoj membrani ovojnice kloroplasta, te zbog redoks ovisne interakcije s FNR-om (62, 63). Nizak omjer $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ vodi do vezanja Tic62 na membranu, dok je pri visokom omjeru $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ protein Tic62 lokaliziran u stromi. Povezanost s FNR-om pojačana je pri kiselim uvjetima i u tami (64). Tic62 sastoji se od dvije podjedinice podjednake veličine. N-terminalni završetak evolucijski je očuvan, sadrži dehidrogenaznu domenu i hidrofobnu domenu koja služi za vezanje s membranom. C-terminalni završetak jedinstven je u vaskularnim biljkama. Sadrži brojna ponavljanja prolin-serin koja omogućuju interakciju s FNR-om (65). TROL jače veže FNR od Tic62, ali ga i lakše otpušta (4, 18). Tilakoidni kompleks, Tic62-FNR ne sudjeluje u transportu elektrona, za razliku od kompleksa TROL-FNR. Vezanje FNR-a za Tic62 štiti FNR od inaktivacije u uvjetima tame, a dinamika vezanja Tic62-FNR je regulirana svjetlošću i stromalnom pH vrijednošću (17, 24).

1.6. Oksidacijski stres

Brojni isprepleteni i osjetljivi procesi u različitim staničnim odjeljcima moraju zadržati homeostazu tijekom promjena u okolini kako bi biljke preživjele. Promjene ravnoteže fizioloških i biokemijskih stanja kod biljnih organizama izazvane su djelovanjem biotičkih (patogena) i abiotičkih (ekstremne temperature, suša, poplave, onečišćenja, nedostatak nutrijenata, kemijski sastav tla, osvjetljenje, salinitet) stresnih čimbenika (66). Stanje u kojem se biljni organizam nalazi nakon na ovakav način nastalih promjena naziva se oksidacijski stres. Takvo stanje organizma posljedica je disbalansa ravnoteže nastanka i uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta, odnosno njihove povećane propagacije i nakupljanja u stanicama, a uzrokovano je prijenosom energije na O_2 . Uspješan nastavak života, unatoč nepovoljnim okolišnim uvjetima, naziva se otpornost na stres (67). Iako reaktivne kisikove vrste nastaju kao uobičajeni produkti metabolizma te u nižim količinama služe kao stanični glasnici i regulatorne molekule, imaju ulogu i u rastu i razvoju te sudjeluju u biljnom imunom odgovoru, u povišenim količinama stanicama i njihovim sastavnim dijelovima nanose štetu koja može biti reverzibilna ili ireverzibilna, a u konačnici može dovesti do gubitka funkcije dijelova stanice. Štetnost od

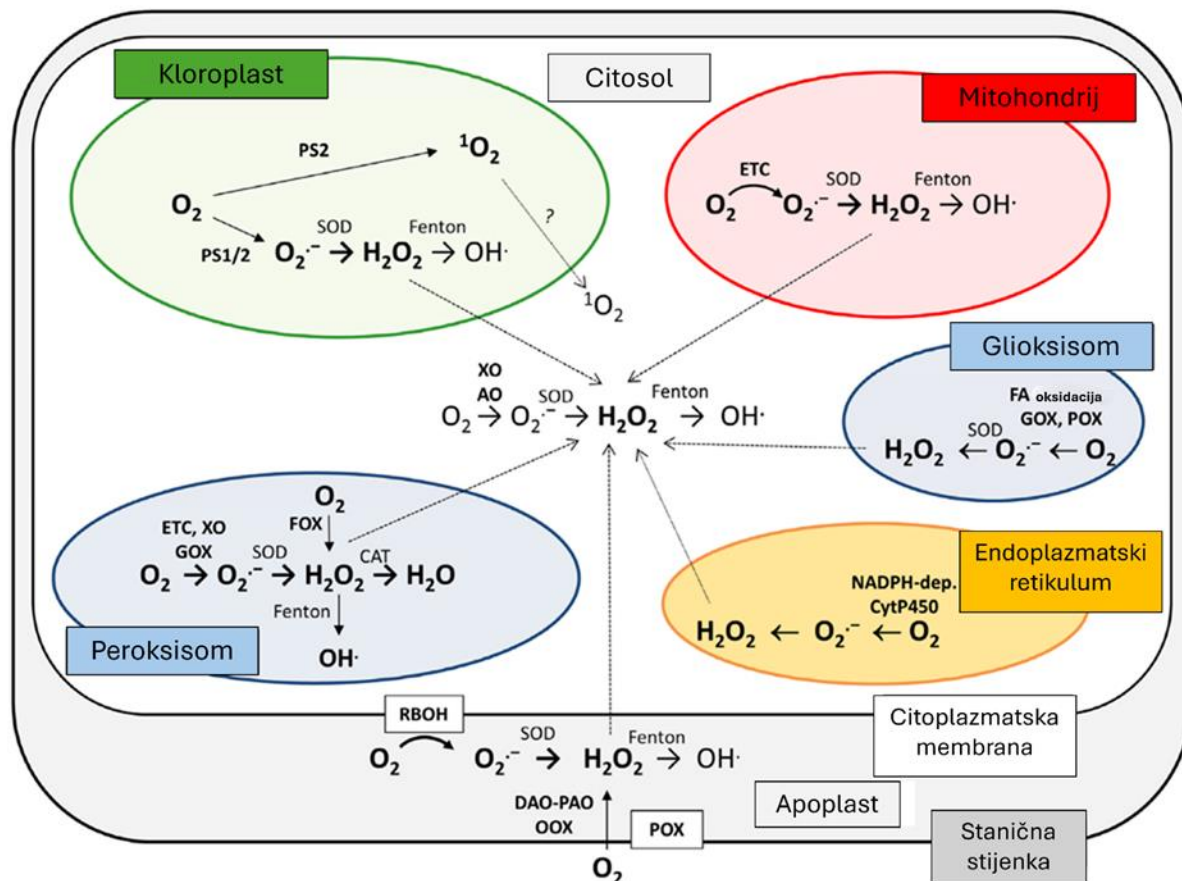
reaktivnih kisikovih vrsta za dijelove stanice proizlazi iz njihove visoke reaktivnosti, a mete su im molekule DNA (jednostruki i dvostruki lomovi lanaca, oksidacija nukleotidnih baza, zaustavljanje replikacije i transkripcije) i RNA (smanjena stabilnost, razgradnja, inhibicija translacije, promjena u ekspresiji gena, oštećenja nukleotidnih baza), lipidi (peroksidacija lipida) i proteini (narušavanje regulatornih, transportnih, metaboličkih, strukturnih funkcija) (68). S obzirom na svoju visoku reaktivnost, lako izazivaju lančane reakcije u kojima se njihova količina multiplicira (69). Organel s najvećom stopom propagacije reaktivnih kisikovih vrsta u biljnim organizmima je kloroplast, mjesto provedbe procesa fotosinteze. Preciznije, najveća količina reaktivnih kisikovih vrsta nastaje u PETC-u kao međuprodukt fotolize H_2O i prilikom transporta elektrona u području PSI gdje dolazi do reakcije elektrona s O_2 . Ograničenje fiksacije CO_2 i prekomjerna redukcija transportnog lanca elektrona (ETC) uzrokuju proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta. Osim u kloroplastima, reaktivne kisikove vrste nastaju i u mitohondrijima, staničnoj stijenci, staničnoj membrani, apoplastu, peroksisomima, glioksisomima i endoplazmatskom retikulumu. S obzirom da su sesilni organizmi i ne mogu se maknuti od izvora stresa, biljke su razvile niz antioksidacijskih zaštitnih mehanizama kako bi održale ravnotežu između nastanka i uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta.

1.6.1. Reaktivne kisikove vrste

Reaktivne kisikove vrste mogu biti slobodni radikali ili neradikalni molekularni oblici. U skupinu najznačajnijih reaktivnih kisikovih vrsta spadaju: superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), singletni kisik (1O_2), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($\cdot OH$) (Slika 3). Među navedenima najmanje štetan je H_2O_2 , a nakon njega $O_2^{\cdot-}$ (70). Uzevši u obzir da je reaktivna kisikova vrsta, H_2O_2 relativno je stabilna molekula, s niskom sposobnošću prolaska preko membrana (membrane najčešće prolazi preko akvaporina), a koja je u svojoj sintezi isprepletena s $O_2^{\cdot-}$. Naime, djelovanjem enzima superoksid dimutaze (SOD), $O_2^{\cdot-}$ se disproporcionira u H_2O_2 i O_2 (71). Osim na ovaj način, H_2O_2 nastaje kao nusprodukt mnogih oksidaza te spontano iz interakcija između vode, organske tvari i svjetlosti (71), najviše u blizini PSI. Posebno je opasan za metaloproteine i enzime Calvinovog ciklusa (72). Sintetizira se na brojnim mjestima u stanici, a brzina difuzije unutar stanice je velika pa lako dolazi od jednog do drugog organela. Razgradnja H_2O_2 u biljnim organizmima odvija se poglavito preko antioksidacijskih enzima katalaze (CAT) i niza peroksidaza (POX), te u procesu ciklusa askorbat-glutation (eng. ascorbate-glutathione, ASC-GSH) (73) (Slika 3). $O_2^{\cdot-}$ produkt je jednoelektronske redukcije O_2 . Otežano prelazi lipidne membrane (prolazi kroz anionske kanale) pa ima duži životni vijek u lipidnom okruženju. Kako je već navedeno, nalazi se među manje štetnim reaktivnim

kisikovim vrstama, posjeduje slabiju direktnu reaktivnost prema većini staničnih molekula. Veliku reaktivnost posjeduje prema pozitivno nabijenim ionima Fe i Fe-S klasterima. Izaziva superoksid-ovisnu redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} , pri čemu sudjeluje u inaktivaciji enzima važnih za proizvodnju energije i metabolizam AK (74). Mjesto njegove sinteze je prvenstveno PSI u procesu nazvanom Mehlerova reakcija (75) ili pesudociklički tok elektrona (76). U Mehlerovoj reakciji dolazi do fotoredukcije O_2 u području PSI te nastaje $\text{O}_2^{\cdot -}$. Za održavanje homeostaze ove reaktivne kisikove vrste odgovoran je antioksidacijski enzim SOD, a može doći i do spontane neenzimatske razgradnje (74) (Slika 3). Unatoč nižoj razini izazivanja štete, iz navedenih reaktivnih kisikovih vrsta sintetizira se $\cdot\text{OH}$ koji uzrokuje najviše štete stanicama procesom lipidne peroksidacije te oštećenjem DNA i proteina. Lipidna peroksidacija jedan je od glavnih pokazatelja oksidacijskog stresa, a posebno je opasna jer izaziva oštećenje bioloških membrana koje za sobom donosi i oštećenje ostalih organela i makromolekula. $^1\text{O}_2$ sintetizira se u procesu prijenosa energije s pobuđenog klorofila na O_2 prvenstveno u području kompleksa PSII-LHC na grana tilakoidima. Do propagacije ove reaktivne kisikove vrste dolazi uslijed rasipanja viška energije koja premašuje energetske kapacitet molekula klorofila (Slika 3). S obzirom da je jak oksidans, $^1\text{O}_2$ uzrokuje ireverzibilnu štetu u molekuli DNA, pigmentima, proteinima i lipidima, a također prijeti fotooštećenjem PSII (77). Prvu crtu obrane protiv $^1\text{O}_2$ čine karotenoidi, tokoferol, PQ i ASC, a može se inaktivirati i rasipanjem energije u obliku topline (78). Reaktivna kisikova vrsta najveće reaktivnosti i najkraćeg životnog vijeka je $\cdot\text{OH}$ koji nastaje Haber-Weiss i Fentonovom reakcijom u prisutnosti prijelaznog metala kao katalizatora (Slika 3). ASC i bakar također mogu prouzročiti neenzimatsku sintezu $\cdot\text{OH}$ (79, 80). U stanicama ne postoje enzimi ili druge antioksidacijske molekule koje direktno razgrađuju $\cdot\text{OH}$, pa su biljke usmjerene na sprječavanje njegova nastanka uklanjanjem prekursora. Štetnost $\cdot\text{OH}$ proizlazi i iz činjenice da može nastati iz inače antioksidacijskih enzimskih reakcija (peroksidaze koje sadrže hem i nalaze se u staničnoj membrani), a u dovoljno velikoj količini $\cdot\text{OH}$ može uzrokovati i inhibiciju antioksidacijskih enzima (80). Među glavnim organelima propagacije $\cdot\text{OH}$ ponovno su kloroplasti, posebice PSII. Fotolizom H_2O oslobađa se O_2 , a u kontaktu s ionima Mn^{2+} i Fe^{2+} može doći do sinteze $\cdot\text{OH}$ (Slika 3). Posljedica je fotoinhibicija, proces u kojem stresni uvjeti, najčešće prekomjerna svjetlost, uzrokuju oštećenje fotosintetskog aparata, posebno PSII, smanjujući učinkovitost fotosinteze (78, 79, 80). S obzirom na već spomenutu visoku reaktivnost reaktivnih kisikovih vrsta, njihov životni vijek je kratak pa su stoga njihova detekcija i mjerenje propagacije u stanicama izazovan zadatak (81). Razvijene metode za mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta uključuju direktne tehnike s fluorescentnim bojama koje ih oksidiraju, a korištene su i u ovom istraživanju za njihovu detekciju primjenom

konfokalne mikroskopije (82), histokemijsko bojanje, spektroskopsku metodu elektronskom paramagnetskom rezonancijom (*eng. electronic paramagnetic resonance, EPR*) detekcijom paramagnetskih centara, te indirektnih tehnika, poput mjerenja produkata oksidacije uzrokovane reaktivnim kisikovim vrstama.



Slika 3. Shematski prikaz propagacije reaktivnih kisikovih vrsta u organelima, citosolu i apoplastu biljnih stanica. Preuzeto i prilagođeno prema Janku i sur. 2019 (83). AO – aldehyd oksidaza, CytP450 – citokrom P450, CAT – katalaza, DAO – diamin oksid, ETC – transportni lanac elektrona, FA – masne kiseline (*eng. fatty acids*), FOX – flavin oksidaza, GOX – glikolat oksidaza, H₂O₂ – vodikov peroksid, NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat, O₂^{•-} – superoksidni radikal, •OH – hidroksilni radikal, PAO – poliamin oksidaza, POX – peroksidaza, PS – fotosustav, RBOH – NADPH oksidaza, SOD – superoksid dismutaza, XO – ksantin oksidaza/dehidrogenaza, ¹O₂ – singletni kisik.

1.7. Mehanizmi antioksidacijske obrane

Biljke su razvile niz antioksidacijskih obrambenih mehanizama kako bi spriječile i uklonile opasne reaktivne kisikove vrste i održale redoks homeostazu u nepovoljnim fiziološkim i metaboličkim uvjetima (84). Tako u biljnim stanicama možemo naći niz enzimskih i neenzimskih antioksidacijskih molekula i njima pripadajućih reakcija (85). Reaktivne kisikove vrste su zbog nesparenog elektrona nestabilne i u potrazi su za slobodnim elektronima, a antioksidacijske molekule mogu donirati elektron i pri tome ostati stabilne (86). U grupi

enzimskih antioksidansa najznačajniji su SOD, CAT, TRX, POX, monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), glutathion reduktaza (GR), glutathion S-transferaza (GST), dok među neenzimatske antioksidanse spadaju ASC, GSH, karotenoidi, tokoferol, flavonoidi (87), fenoli, alkaloidi, antocijani (88). Veliki broj antioksidacijskih molekula ukazuje na činjenicu da su kapacitet i aktivnost antioksidacijskog sustava važni za održavanje funkcionalnog biljnog metabolizma i redoks homeostaze (89). U uvjetima stresa, aktivnost antioksidacijskih enzima u pravilu raste (90), a kapacitet antioksidacijske obrane je određen količinom antioksidacijskih spojeva i njihove aktivnosti (68). Metabolički putevi obrane međusobno se nadopunjuju kako bi zaštita djelovala u potpunosti (20). Osim što prenosi elektrone na NADP^+ , Fd ih prenosi i na redoks-regulirajući enzim TRX pomoću Fd-ovisne TRX reduktaze (FTR). Askorbat peroksidaza (APX) koristi ASC kao donor elektrona u svojim detoksikacijskim reakcijama, pri čemu nastaje monodehidroaskorbat (MDA) koji se oksidira u dehidroaskorbat (DHA). MDHAR i DHAR koriste reducirani GSH za regeneraciju ASC pri čemu nastaje oksidirani GSH, dok je regeneracija GSH pod kontrolom NADPH-ovisne GR. Tiol ovisne peroksidaze (TPX) uključuju peroksiredoksine (PRX) i GSH peroksidaze (GPX). One ovise o disulfidnoj reduktaznoj aktivnosti NADPH-ovisnog redoks sustava (NTRC), TRX, te glutaredoksina (GRX) (47). APX razgrađuje i H_2O_2 nastao djelovanjem SOD na H_2O i O_2 . Time završava Mehlerova reakcija u kojoj elektroni iz H_2O nastali u području PSII putuju do H_2O u području PSI, a usput nastaje i protonski gradijent preko tilakoidne membrane kada je niska razina akceptora elektrona na PSI. Ovaj proces potpomaže i funkciji NPQ (91).

1.7.1. Superoksid dismutaza

Prvu crtu obrane biljaka od reaktivnih kisikovih vrsta čini najučinkovitiji enzim, SOD (86). Enzim se sastoji od dvije domene, a prema metalnom ionu koji se nalazi u aktivnom mjestu između domena može se podijeliti u tri skupine izoformi: Cu/ZnSOD, MnSOD, FeSOD. Izoforme se nalaze u različitim organelima pa tako FeSOD možemo naći u kloroplastima, MnSOD u mitohondrijima i peroksisomima, a Cu/ZnSOD u kloroplastima, citosolu i izvanstaničnom prostoru. SOD katalizira reakciju disproporcioniranja $\text{O}_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 i O_2 (84) prema formuli: $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (92). Metalni ion enzima donira elektrone $\text{O}_2^{\cdot-}$ vezanom za aktivno mjesto te tako učini reaktivnu kisikovu vrstu stabilnom (86). Što su prisutnost različitih izoformi i aktivnost SOD veće, biljka je otpornija na stresne uvjete (93).

1.7.2. Katalaza

CAT je prvi otkriveni antioksidacijski enzim, tetramerne je strukture te sadrži hem skupinu. U biljkama postoje tri izoenzima CAT1, CAT2 i CAT3, koji su različito lokalizirani. CAT1 nalazi se u peludu i sjemenkama, CAT2 u fotosintetskim tkivima, korijenu i sjemenkama, dok se CAT3 lokalizira u listovima i vaskularnom tkivu (92). Enzim ima visok afinitet za H_2O_2 , a njegova specifičnost je u tome što ne zahtijeva redukcijski ekvivalent iz stanice za razliku od ostalih enzima koji kataliziraju razgradnju H_2O_2 (94). Slaba supstratna specifičnost i visoka katalitička aktivnost proizlaze iz istovremene potrebe za dvjema molekulama H_2O_2 vezanim u aktivno mjesto za provođenje reakcije njegove razgradnje. Najveća aktivnost enzima zabilježena je u peroksisomima i glikosisomima gdje se uvelike odvija sinteza H_2O_2 fotorespiracijom, odnosno oksidacijom masnih kiselina. Ovisno o intenzitetu i trajanju stresa, enzim može biti aktiviran ili inaktiviran (94). Reakcija razgradnje H_2O_2 uz CAT kao katalizator odvija se prema formuli:

$$2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{CAT}} \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \quad (95).$$

1.7.3. Askorbat peroksidaza

Jedan od enzima skupine oksidoreduktaza, preciznije hem peroksidaza, koje kataliziraju razgradnju H_2O_2 je i APX (96). Također je jedan od najzastupljenijih antioksidacijskih enzima u biljnim stanicama s puno većim afinitetom za H_2O_2 od CAT (97). Ima središnju ulogu u ciklusu ASC-GSH, jednom od primarnih načina razgradnje H_2O_2 u kloroplastima. Za reakcije detoksikacije koristi dvije molekule askorbinske kiseline kao donore elektrona, pri čemu se one oksidiraju u MDA, a bez prisutnosti ASC enzim je nestabilan (90). Postoji više izoformi ovisno o lokalizaciji u stanici: citosolna, kloroplastna, mitohondrijska, membranska i tilakoidna, a može biti u topivom obliku ili vezana na membranu (90, 98). Reakcije razgradnje H_2O_2 uz APX kao katalizator odvija se prema formuli: $2\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{APX}} 2 \text{MDA} + 2\text{H}_2\text{O}$ (99).

1.7.4. Pirogalol peroksidaza

Pirogalol peroksidaza (PPX) još je jedan enzim skupine oksidoreduktaza. Isto kao i APX sadrži hem skupinu, ali za razliku od nje vrlo je stabilna. Reakcija koju katalizira je oksidoredukcija između H_2O_2 i reducensa, pri čemu pirogalol djeluje kao donora elektrona i nakon oksidacije prelazi u purpurogalin. Izoforme ovog enzima lokalizirane su u: vakuoli, Golgijevom aparatu i mitohondrijima (96). Ima važnu ulogu u procesu diferencijacije stanica i izgradnji stanične stijenke (100). Reakcije razgradnje H_2O_2 uz PPX kao katalizator odvija se prema formuli:



1.8. Stresni uvjeti – suša

U doba velikih klimatskih promjena, kada je sve manje oborina, a temperature su sve više, razdoblja intenzivnog sušnog stresa postaju sve učestalija. Istovremeno, svjetska populacija je u konstantnom porastu, pa su i potrebe za hranom sve veće. Zbog toga važnost istraživanja biljne otpornosti i tolerancije na stres te povećanja prinosa sve više dolaze do izražaja (101). U središtu tih istraživanja nalaze se procesi fotosinteze, odgovorni za rast i razvoj biljaka. Istraživanja se provode u različitim stresnim uvjetima uključujući i sušni stres (102). Suša se definira kao dugo razdoblje nedostatka ili nemogućnosti iskorištenja vode te je jedan od abiotičkih stresora koji značajno utječu na život biljaka. Može se dogoditi na razini atmosfere, tla i površinskih voda (103). Nastaje kada je gubitak vode transpiracijom veći od količine vode koju biljka apsorbira (54, 68). Dovodi do smanjenja vodnog potencijala tla i biljke, turgora, stope fotosinteze i fiksacije CO₂, prinosa biomase, povećanja temperature lista i stope respiracije, zatvaranja puči, narušavanja strukture membrana i aktivnosti enzima, promjene ekspresije gena te narušavanja metaboličkog balansa (66, 104, 105). Ovo za biljku nepovoljno stanje posljedično dovodi do oksidacijskog stresa, odnosno prekomjerne propagacije i nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta. Na preživljavanje u uvjetima sušnog stresa utječu jačina i trajanje stresa, starost, vrsta i genotip biljke (106).

1.8.1. Fotosinteza u uvjetima sušnog stresa

Umjereno osvjtljenje i temperatura te optimalna količina H₂O i CO₂ predstavljaju idealne uvjete za provođenje fotosinteze. No, takav skup idealnih uvjeta u prirodi rijetko se postiže (107). Zbog toga su biljke razvile niz sustavnih prilagodbi i uspijevaju opstati unatoč stresnim čimbenicima kojima su izložene. Negativan utjecaj sušnog stresa na fotosintezu može se očitovati putem mehanizama neovisnih o otvorenosti puči i mehanizama ovisnih o otvorenosti puči (108). Tijekom sušnog stresa dolazi do nekroze, kovrčanja i opadanja listova, kloroze (48, 109), smanjenja provodnosti puči i stope transpiracije, učinkovitosti karboksilacije, sadržaja pigmenata, a na kraju i smanjene stope fotosinteze i prinosa biomase (110), te inhibicije ETR-a (111). U uvjetima sušnog stresa mijenja se i struktura kloroplasta, organela u kojem se provodi proces fotosinteze. Oblik prelazi iz ovalnog u okruglasti, nabubreni su, pomiču se prema sredini stanice, tilakoidna struktura je narušena te se nakupljaju zrnca škroba i kapljice lipida (110). Smanjuje se koncentracija klorofila, karotenoida, kao i omjer klorofila *a* i klorofila *b* (103), pigmenti i proteini degradiraju (110, 112). Smanjenjem stope difuzije CO₂ i metaboličkim ograničenjima, proces fotosinteze značajno je narušen u svim svojim fazama tijekom razdoblja sušnog stresa (103). Zatvorene puči smanjuju dostupnost CO₂, što određuje učinkovitost

Calvin-Benson ciklusa, smanjena je dostupnost CO₂ za enzim RUBISCO i njegova funkcionalnost (110), a oksigenacijska aktivnost veća mu je nego u optimalnim uvjetima, čime raste fotorespiracija (48). Sušni stres uzrokuje zakiseljavanje strome kloroplasta što može dodatno smanjiti aktivnost enzima RUBISCO. Zbog narušene funkcije enzima RUBISCO i sinteze ATP-a, dolazi i do poremećaja omjera NADPH/NADP⁺, što znatno utječe na metabolizam (103). U uvjetima sušnog stresa veća je osjetljivost na visoki intenzitet svjetlosti. Prevelika količina svjetlosti može oštetiti komponente fotosintetskog lanca i dovesti do fotoinhibicije na što je posebno osjetljiv PSII. Stopa fotorespiracije i rasipanja energije kao topline u tim uvjetima povećane su (103, 110). Poseban problem u uvjetima suše predstavlja kombinacija smanjene stope asimilacije CO₂ i visokog intenziteta svjetlosti. Fotosustavi i dalje apsorbiraju energiju, ali zbog ograničene potrošnje elektrona u Calvin-Benson ciklusu dolazi do prekomjerne reduciranosti sastavnica fotosintetskog lanca prijenosa elektrona, osobito na razini PSI (111). Višak elektrona može se prenijeti na O₂, pri čemu nastaju O₂^{•-} i H₂O₂. Povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta može uzrokovati inhibiciju linearnog toka elektrona, pojavu fotoinhibicije i oksidacijska oštećenja fotosustava (103, 110). Dugotrajan disbalans energije i redoks stanja u fotosintetskom aparatu može značajno ograničiti sintezu ATP-a i NADPH te dovesti do ozbiljnog oštećenja fotosintetskog sustava (113, 114). Ovdje dinamičko vezanje para TROL-FNR i njegova sposobnost regulacije redoks statusa dolaze do izražaja, kao i reduktivna aktivnost FNR-a (4, 6, 21, 115). Kada se omjer NADP⁺/NADPH promijeni i PETC je prekomjerno reduciran, FNR se otpušta s proteina TROL, vjerojatno signalom odaslanim iz domene RHO. FNR tada reducira Fd i druge molekule koje uklanjaju reaktivne kisikove vrste te vodi elektrone u alternativne tokove (4). Linije sa smanjenom količinom FNR-a imaju povećanu sklonost fotoinaktivaciji zbog prekomjerne redukcije PETC i nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (116). Fotoredukcija reaktivnih kisikovih vrsta u kloroplastima spriječena je relaksirajućim mehanizmima, npr. prilikom povećane apsorpcije fotona preko alternativnih tokova elektrona kao što je CET, fotorespiracijom, kloroplastnom respiracijom, Mehlerovom reakcijom, ksantofilskim ciklusom (113, 117, 118). NPQ je način zaštite biljaka od viška energije, pogotovo u slučaju sušnog stresa. Pokreće ga tilakoidni protonski gradijent i mehanizmi odgovorni za rasipanje viška pobudne energije kako bi se suvišak energije oslobodio u obliku topline i spriječilo oštećenje PSII. Jedna od komponenata NPQ-a je i ksantofilski ciklus (113, 119). Cilj svjetlosnih reakcija fotosinteze je sinteza NADPH, koji se koristi za sintezu ugljikohidrata i sinteza ATP-a. Kada zbog stresa dođe do disbalansa stvaranja ovih dvaju produkata, odnosno kada je potrebna sinteza ATP-a bez NADPH, aktivira se CET. U CET-u se elektroni iz PSI preko Fd vraćaju na Cyt *b₆f* i PC,

odnosno tok elektrona odvija se oko PSI, stvarajući elektrokemijski gradijent protona između lumena i strome za proizvodnju ATP-a bez NADPH (113, 120). Prilagodbe koje omogućuju adaptaciju i stvaraju otpornost na nepovoljne uvjete još uključuju: zaštitne pigmente (ksantofilski ciklus i promjene u sastavu i količini pomoćnih antenskih pigmenata u situaciji visokog osvjetljenja, karotenoidi), te enzimске i neenzimске antioksidacijske molekule (poglavlje 1.2.) (110). Karotenoidi su sastavni dio LHC kompleksa koji u uvjetima stresa pomažu uspostavljanju ravnoteže toka elektrona između dva fotosustava, procesom poznatim pod nazivom „prijelazna stanja“ (121). Karotenoidi čuvaju fotosustave nefotokemijskim gašenjem pobuđenog klorofila, neutralizacijom $^1\text{O}_2$, gašenjem tripletnog klorofila, ksantofilskim ciklusom, stabilizacijom fotosustava. Karotenoidi preuzimanjem energije ne mogu stvoriti reaktivne kisikove vrste (122). Fluorescencija nastaje zbog zasićenosti nizvodnih komponenata PETC, koji ne mogu primati više elektrona iz pobuđenih molekula klorofila (123).

1.9. Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. kao modelni organizam

Modelni organizam korišten u ovom istraživanju je biljka *A. thaliana* (L.) Heynh., kritosjemenjača iz porodice Brassicaceae. Široko je rasprostranjena u Sjevernoj Americi, Aziji, Africi i Europi pa je stoga i lako dostupna. Prvi put ju je opisao Johann Thal 1557. godine (124). Vrlo je čest modelni organizam jer ima mali genom od 5 kromosoma s ≈ 25498 gena, biljka se lako uzgaja i ima kratak životni ciklus. Osim toga, genom ove biljke u potpunosti je sekvenciran (*The Arabidopsis Genome Initiative* 2000) (125), što omogućuje detaljna istraživanja na ovoj biljci u području biljne molekularne biologije. U prirodnim uvjetima jednogodišnja je biljka čije rozete rastu na razini tla, a listovi su prekriveni trihomima. Sitni bijeli cvjetovi rastu na stabljici iznad rozete. Iz cvijeta se razvija plod komušica koji nosi sjemenke, a prisutno je samooprašivanje. Korijen je jednostavan. Provodi C3 tip fotosinteze. S obzirom na sekvencirani genom, u istraživanjima se često koriste mutirane linije ove biljke kao što je slučaj i u ovom istraživanju.

1.10. Rodanaze

Sumpor je jedan od ključnih elemenata za rast i razvoj biljaka. Prisutan je u mnogim staničnim odjeljcima koji bez njega ne bi mogli normalno funkcionirati. Biljke reduciraju sulfate kao primarni izvor sumpora i ugrađuju ga u različite spojeve. Sumporne AK (cistein i metionin), tripeptid glutation (koji sadrži cistein), membranski fosfolipidi, tioli proteina i peptida, vitamini i kofaktori (tiamin, biotin, koenzim A (CoA)) sastavnice su organizma koje sadrže

sumpor (126). Rodanaze su sumporne transferaze koje kataliziraju prijenos atoma sumpora sa molekule donora na nukleofilni primatelj pri čemu nastaje persulfid kao međuprodukt na katalitički aktivnom cisteinu (127). Najistraženija je rodanaza goveđe jetre (*bovine liver rhodanase*), koja katalizira reakciju prijenosa sumpora s tiosulfata na cijanid (127). Općenito, mogu postojati kao fosforilirani i defosforilirani enzimi. Fosforilirani oblik preuzima sulfide iz Fe-S klastera i formira međuprodukt, a istovremeno dolazi do smanjenja sinteze ATP-a i usporavanja toka elektrona duž tilakoidne membrane. Nakon prijenosa sumpora na primatelja, fosfatna skupina enzima disocira, a sinteza ATP-a i brzina toka elektrona vraćaju se na prvobitnu razinu (127). Rodanazne domene mogu se naći kao uzastopna ponavljanja s jednim aktivnim cisteinom, u enzimima s aktivnim cisteinskim ostatkom na C-terminalnom završetku, kao samostalne domene enzima te u kombinaciji s udaljenim domenama (127). Ključno obilježje aktivne rodanazne domene je očuvan cisteinski ostatak u očuvanom slijedu od 12 AK. Supstratna specifičnost i katalitička aktivnost ovise o veličini i sastavu AK katalitičke petlje (127, 128). Kod neaktivne rodanazne domene na N-terminalnom završetku cisteinski ostatci zamijenjeni su aspartatskim ili glicinskim ostacima, a u tim oblicima povezani su s proteinskim domenama MAPK fosfataza (129), proteinima odgovora na stres i nekoliko ubikvitarnih proteina (127). Navedeni proteini sudjeluju u održavanju redoks homeostaze i detoksikaciji reaktivnih kisikovih vrsta u različitim unutarstaničnim procesima. Stoga se smatra da neaktivne rodanazne domene sudjeluju u prijenosu signala i regulaciji. Rodanaze su prilagodile svoje funkcije potrebama organizama za sumporom u metaboličkim i regulatornim putevima (128). Sudjeluju u detoksikaciji cijanida, biosintezi metabolita kao što su vitamini, enzimi i kofaktori koji sudjeluju u transferima sumpora, biosintezi tiamina, sintezi Mo-kofaktora, biogenezi Fe-S klastera, održavanju redoks balansa interakcijama s TRX-om, detoksikaciji reaktivnih kisikovih vrsta i H₂S putem respiratorne aktivnosti mitohondrija, bioremedijaciji, asimilaciji sulfata i metabolizmu selena (Se) (127, 130, 131). U modelnom organizmu *A. thaliana* 20 gena kodira sumporne transferaze i srodne enzime, od kojih svaki sadrži barem jednu rodanaznu domenu (132, 133). *A. thaliana* pokazuje povećanu aktivnost rodanaza u procesima transporta sumpora i tijekom stresa za vrijeme scenescencije (127, 128). Također, zabilježena je aktivnost tijekom stresa uzrokovanog teškim metalima (127). Zbog velike količine rodanaza i srodnih proteina pronađenih u velikom broju biljnih vrsta i njihove lokalizacije u različitim staničnim odjeljcima smatra se da omogućuju nekoliko specifičnih bioloških funkcija s naglaskom na obranu od biotičkog i abiotičkog stresa (127). U obrani biljaka od reaktivnih kisikovih vrsta sudjeluje tripeptid glutation u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku, održavajući sulhidrilne (-SH) skupine. U metabolizmu i homeostazi GSH sudjeluju rodanaze kao što je tiosulfat

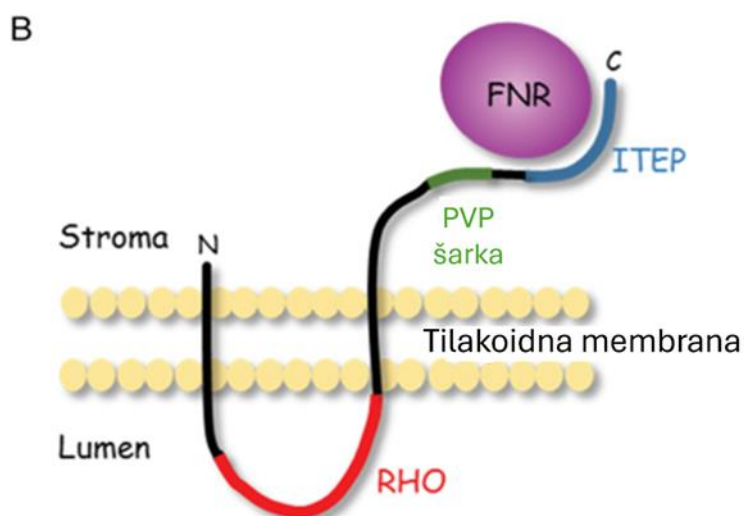
S-transferaza (127). U ovu skupinu ubrajaju se i GR, GPX te GST (127). Postoji mogućnost da rodanaze održavaju redoks ravnotežu u različitim staničnim odjeljcima interakcijom s TRX, pri čemu djeluju kao TRX peroksidaze s međuprodukom sulfenatom (127). Smatra se da je otvaranje i zatvaranje puči kod *A. thaliana* djelomično pod utjecajem receptora za kalcij koji sadrži neaktivnu rodanaznu domenu (134). Neaktivna rodanazna domena sastavni je dio i transmembranskog proteina TROL koji je u središtu ovog istraživanja, a smatra se da je odgovorna za prijenos signala preko tilakoidne membrane što utječe na dinamičko otpuštanje FNR-a (4, 135). Dinamičko vezanje para TROL-FNR važno je za održavanje ravnoteže redoks stanja strome i ETC-a, što je ključno za sprječavanje prekomjerne redukcije. Rodanaze vjerojatno sudjeluju i u opskrbi sulfidima neophodnima za sintezu Fd u kloroplastima, rekonstituciji Fd, te regeneraciji aktivnosti NADH:nitrat reduktaze nakon djelovanja cijanida (127, 131).

1.10.1. Thylakoid rhodanase-like protein

Protein koji se nalazi u središtu ovog istraživanja je TROL (*eng. thylakoid rhodanase-like protein*). To je transmembranski protein koji je građen od dvije domene koje premošćuju tilakoidnu membranu, neaktivne domene RHO u lumenu tilakoida (135, 136), te C- i N-terminalnih završetaka koji se nalaze na strani strome. Neaktivna domena RHO u katalitičkom mjestu sadrži aspartat 207, za razliku od aktivne domene RHO koja bi na tom mjestu sadržavala cistein. C-terminalni završetak sadrži hidrofobnu ITEP regiju koja je karakteristična za vaskularne biljke, a služi za uspostavljanje interakcija s FNR-om. Uzvodno od ove regije nalazi se regija PEPE koja se sastoji od karakterističnih ponavljanja AK prolin-valin-prolin koja joj omogućuju fleksibilnost. Veličina ovog proteina je 66 kDa, a u biljci *A. thaliana* kodira ga gen At4g01050 četvrtog kromosoma (Slika 4). Posjeduje dvojni lokalizaciju, kao pretprotein nalazi se na unutarnjoj membranskoj ovojnici kloroplasta sa signalnom sekvencom na N-terminalnom završetku, a u zreom obliku nalazi se na stroma tilakoidima i rubnim dijelovima grana tilakoida (136). U sustavu tilakodnih membrana služi kao šarka (*hinge*) između PETC i Calvin-Benson ciklusa, odnosno sudjeluje u prijenosu elektrona s reduciranog FNR-a na NADP^+ kako bi nastao NADPH koji se koristi u Calvin-Benson ciklusu (135). Protein TROL može vezati različite ligande, na što upućuje pronalazak ovog proteina u kompleksima različitih veličina. U ovom radu istraživao je kompleks s proteinom FNR koji ima veličinu 190 kDa (5). Protein TROL igra ključnu ulogu u sidrenju enzima FNR, posljednje proteinske komponente PETC koja elektrone prenosi na NADP^+ (5).

A

01	MEALKTATFS	PMSVLSEKRS	EPRKPFSLPN	LFPPKSQRPI	SQESFLKRFN
51	GGLALLTSVL	SSATAPAKSL	TYEEALQQSM	TTSSSFDSGD	LIEGISNFVT
101	DNPLVIAGGV	AALAVPFVLS	QVLNKKPKSW	GVE SAKNAYT	KLGTDDNAQL
151	LDIRATADFR	QVGSPNIKGL	GKKAVSTVYN	GEDKPGFLKK	LSLKFKDPEN
201	TTLYILDKFD	GNSELVAELV	ALNGFKSAYA	IKDGAEGPRG	WLNSSLPWIE
251	PKKTL SLDLS	SLTDSISGVF	GES SDGVSVA	LG VAAAAGLS	VFA FTETIETI
301	LQLLGSAALV	QLAGKKLLFA	EDRKQTLKQV	DEFLNTKVAP	KELVDELKEI
351	GKALLPQSTS	NKALPAPATV	TAEAESATAT	TTTVDK PVPE	PET VAATTTT
401	VDKPVPEPEP	VPEPV VPVPAI	EAAVAAQVIT	EPT ETEAKPK	PHSR PLSPYA
451	SY PDLKPSS	PM PSQP			

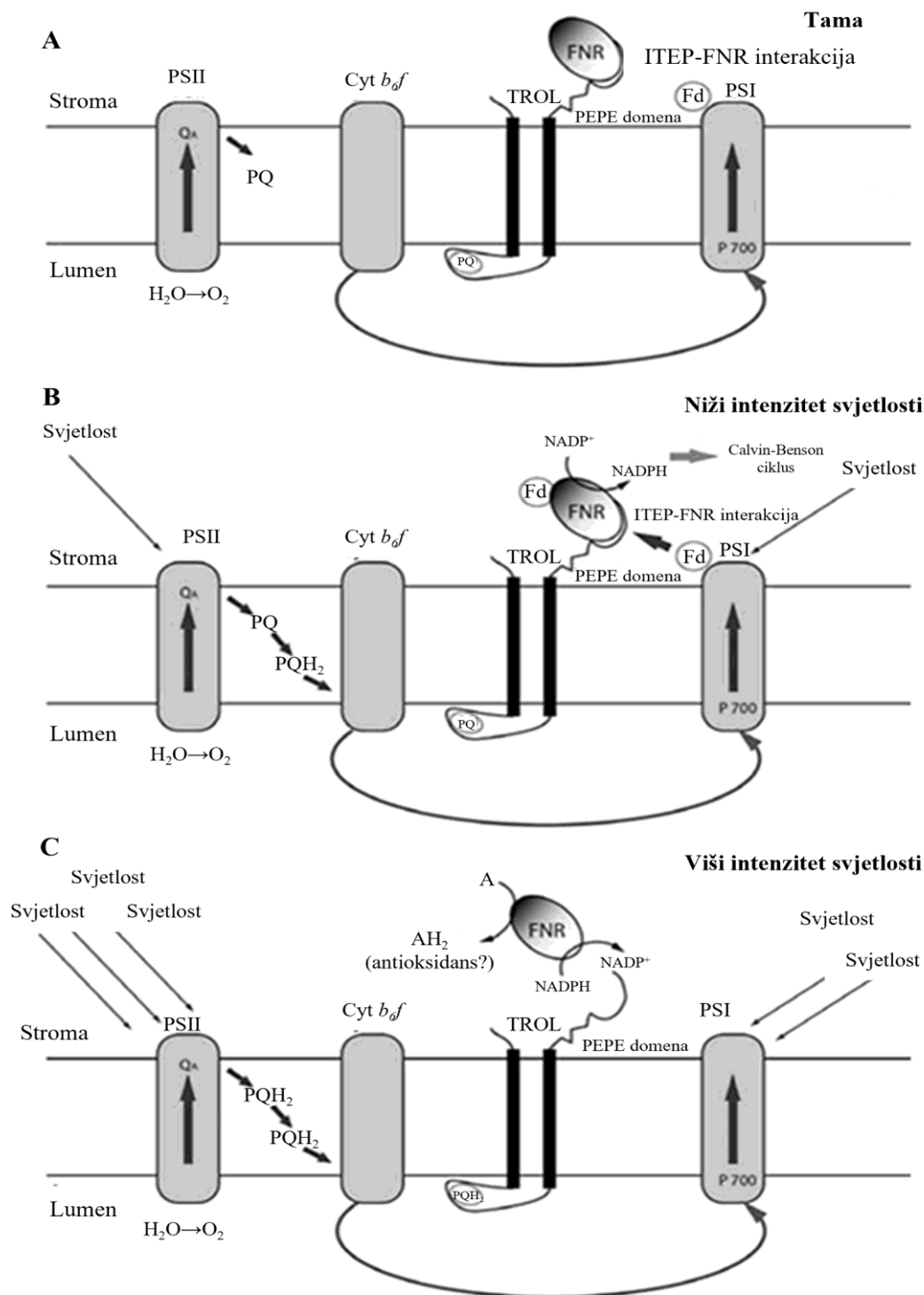


Slika 4. A) aminokiselinski slijed i domene proteina TROL; B) model proteina TROL. Slika preuzeta i prilagođena iz Vojta i Fulgosi, 2019 (136). FNR – feredoksin-NADP⁺ oksidoreduktaza, ITEP – C-terminalna domena proteina TROL (eng. *Isothiocyanate-sensitive Thioredoxin-like domain with Proline-rich stretch*), PVP – poliprolinska regija proteina TROL, RHO – neaktivna rodanazna domena proteina TROL.

1.10.2. Proteinski kompleks TROL-FNR

Tijekom vremena raspravljalo se o nekoliko načina na koje bi se proteini TROL i FNR mogli vezati u kompleks. Prvo je predloženo da je u razdoblju tame većina FNR-a vezana na tilakoidne membrane putem proteina Tic62 i TROL, a kada nastupi razdoblje svjetlosti FNR disocira u stromu i povećava učinkovitost LET, odnosno fotoredukciju NADP⁺ (17, 24). Ovakav model nije vjerojatan zbog neučinkovitosti fotoredukcije NADP⁺ od strane slobodnog FNR-a (23). Drugi model predlaže da se TROL i FNR dinamički vežu, pri čemu TROL stabilizira FNR tijekom perioda tame i time sprječava oksidaciju elektrona iz NADPH. S druge strane, tijekom perioda svjetlosti dinamičko vezanje omogućuje sintezu NADPH prijenosom elektrona s reduciranog Fd na NADP⁺, dok u uvjetima prekomjernog osvjetljenja domena RHO uslijed vezanja reduciranog liganda (PQ) šalje transmembranski signal proteinu TROL za otpuštanje vezanog FNR-a zbog nastalih konformacijskih promjena. Time se elektroni

usmjeravaju u alternativne tokove (4, 135) (Slika 5). Posljednji model temelji se na redoks stanju u stromi kloroplasta, odnosno omjeru $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, koji regulira dinamičko vezanje kompleksa TROL-FNR, a pod utjecajem je okoliša (62). Proteini Tic62 i TROL vaskularnih biljaka dijele viskokonzerviranu sekvencu visoke sličnosti MRM (*eng. membrane recruiting motif*) na C-terminalnom završetku za vezanje FNR-a. Najvažnije interakcijske regije dimera FNR su one s hidrofobnim Van der Waalsovima interakcijama, a smještene su u blizini domene ITEP proteina Tic62 i TROL. Identificirano je i pet funkcionalno važnih vodikovih veza. Ove interakcije istražene su simulacijom molekularne dinamike pri različitim pH vrijednostima. One su ovisne o pH vrijednostima te omogućuju veće konformacijske promijene ovisno o stanju u okolišu. Stabilnost homodimera FNR ovisi o kvaliteti interakcija FNR s konzerviranim prolinima i serinima domene ITEP proteina TROL (137). U ovoj interakciji, domena RHO proteina TROL utječe na dinamičko vezanje s FNR-om u situaciji kada je omjer $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ u neravnoteži. Kada dođe do prekomjerne redukcije PETC (stresni uvjeti), na domenu RHO veže se reducirani PQ (5), što uzrokuje konformacijsku promjenu i otpuštanje FNR-a u stromu gdje sudjeluje u oksidaciji NADPH, a time dolazi i do redukcije Fd i drugih molekula koje sudjeluju u detoksikaciji reaktivnih kisikovih vrsta (4). Nuklearna magnetska rezonanca strukture domene RHO pokazala je mjesto koje bi moglo primiti PQ kao signalnu molekulu (135). Napredak eukariotskog staničnog ciklusa kontroliran je Cdc25 fosfatazom s aktivnom rodanaznom domenom, a pod utjecajem je unutarstaničnih redoks promjena. Vezanje kinona mijenja njenu aktivnost, što potvrđuje ulogu redoks-ovisnih regulatornih funkcija rodanaznih domena (4, 135).



Slika 5. Prikaz predloženog dinamičkog vezanja kompleksa TROL-FNR u različitim uvjetima osvjetljenja. A) Tama; B) Niži intenzitet osvjetljenja; C) Viši intenzitet osvjetljenja. Preuzeto i prilagođeno iz Vojta i sur. 2012 (135). A – oksidirani donor elektrona, AH₂ – reducirani donor elektrona, Cyt b_6f – citokrom b_6f kompleks, Fd – feredoksin, FNR – flavoenzim feredoksin NADP⁺ oksidoreduktaza, ITEP – C-terminalna domena proteina TROL, NADPH/NADP⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat, P700 – klorofil P700, PSI – fotosustav I, PSII – fotosustav II, PEPE – poliprolinska domena proteina TROL, PQ – plastokinon, PQH₂ – plastokinol, TROL – eng. *thylakoid rhodanase-like protein*.

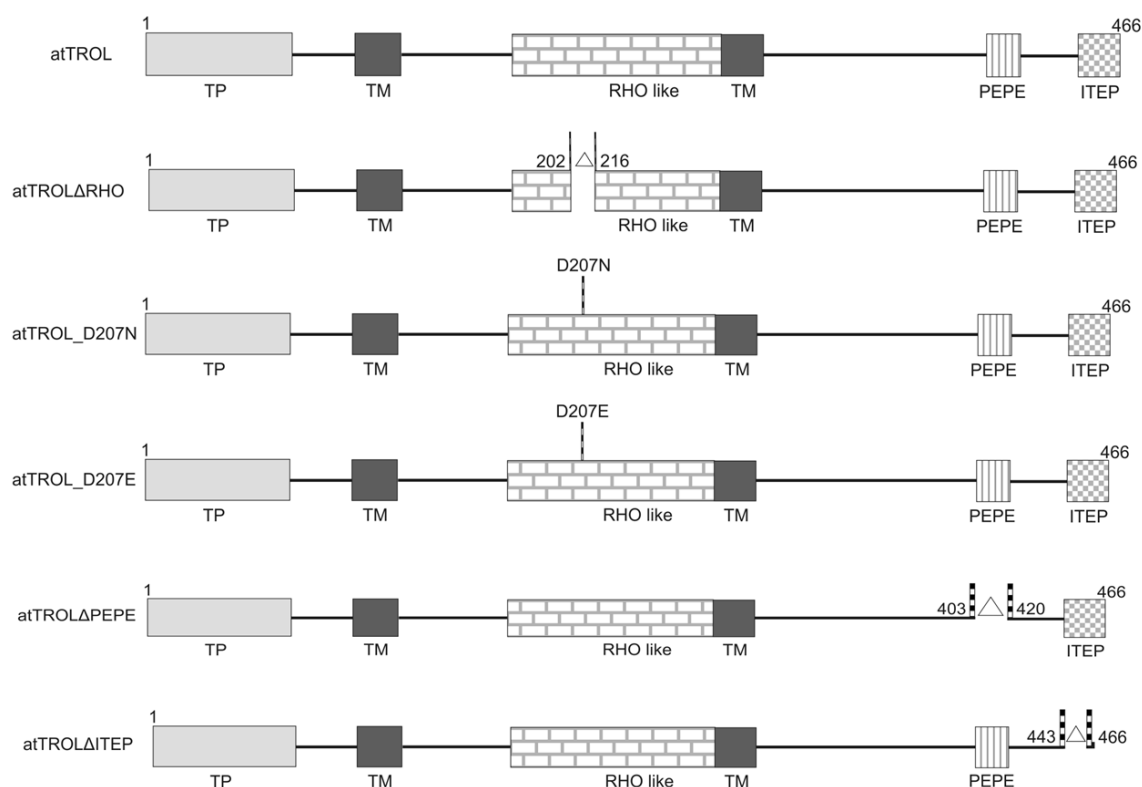
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovaj doktorski rad izrađen je s ciljem stjecanja novih spoznaja o utjecaju dinamičkog vezanja proteinskog para TROL-FNR na raspodjelu i tok visokoenergetskih elektrona te antioksidacijsku obranu u procesu fotosinteze. Istraživanje je usredotočeno na različite linije biljke *A. thaliana* s mutiranim proteinom TROL i izložene uvjetima sušnog stresa te na usporedbu s biljkama divljeg tipa (WT). Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako mutacije u različitim domenama proteina TROL utječu na: i) dinamiku razdiobe visokoenergetskih elektrona u procesu fotosinteze, ii) aktivnost obrambenog antioksidacijskog sustava, iii) sastav fotosintetskih pigmenata, iv) stopu asimilacije CO₂ u biljkama izloženim sušnom stresu. Hipoteza ovog istraživanja predlaže da mutacije u domenama proteina TROL utječu prvenstveno na dinamiku vezanja dimera FNR, odnosno na raspodjelu visokoenergetskih elektrona te posljedično na održavanje fizioloških procesa ovisnih o fotosintetskom lancu prijenosa elektrona. Također, stresni uvjeti, kao što je suša, negativno utječu na biljku, a upravo bi mutacije u domenama proteina TROL mogle utjecati na odgovor biljaka na stresne uvjete.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Za pokuse sam koristila listove biljnog modelnog organizma *A. thaliana* (L.) Heynh ekotip Columbia (Col-0), koje sam uzgajala na dva različita tipa supstrata (prosijani te prosijani i sušeni) i u dvama različitim fiziološkim uvjetima (normalna vlaga i sušni stres). Koristila sam biljke WT i 6 mutantnih linija: TROL KO koja ne eksprimira protein TROL (5), TROL Δ RHO kojoj nedostaje 13 AK (203-215) domene RHO (136, 138), D207E u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom (138), Δ ITEP u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP te Δ PEPE u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE (139) (Slika 6). Ove biljne linije koristila sam za ispitivanje: i) utjecaja različitih mutacija proteina TROL na njegovu interakciju s proteinom FNR, ii) utjecaja različitih uvjeta uzgoja na interakciju para TROL-FNR te posljedično na količinu enzima RUBISCO, koncentraciju fotosintetskih pigmenata, aktivnost antioksidacijskih enzima, propagaciju reaktivnih kisikovih vrsta, izmjenu plinova te anatomiju lista. Potpuno razvijeno lisno tkivo uzorkovala sam nakon svakog ciklusa uzgoja, smrznula u tekućem dušiku i čuvala na -80 °C. Za pokuse sam koristila svježi ili smrznuti biljni materijal te ekstrakte tkiva lista.



Slika 6. Shematski prikaz pozicija i mutacija domena proteina TROL u biljci *A. thaliana* (L.) Heynh. ekotip Columbia (Col-0) korištenih u pokusima. atTROL – protein TROL vrste *A. thaliana*, atTROLΔRHO – mutanta TROL ΔRHO koja sadrži deleciju 13 AK (203-215) domene RHO, atTROL_D207N – mutanta D207N s točkastom mutacijom u domeni RHO na poziciji 207 (aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom), atTROL_D207E – mutanta D207E s točkastom mutacijom u domeni RHO na poziciji 207 (aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom), atTROLΔPEPE – mutanta ΔPEPE koja sadrži deleciju 23 AK (403-420) domene PEPE, atTROLΔITEP – mutanta ΔITEP koja sadrži deleciju 17 AK (443–466) domene ITEP, TP – tranzitni peptid, N-terminalna sekvenca odgovorna za usmjeravanje proteina u kloroplast, TM – transmembranska domena, hidrofobna regija koja omogućuje ugradnju proteina u tilakoidnu membranu, RHO like – domena slična domeni RHO, stromalna domena uključena u redoks signalizaciju i regulaciju vezanja FNR-a, D207N – točkasta mutacija u kojoj je aspartat na poziciji 207 zamijenjen asparaginom, D207E – točkasta mutacija u kojoj je aspartat na poziciji 207 zamijenjen glutaminskom kiselinom, PEPE – C-terminalna poliprolinska domena proteina TROL uključena u fleksibilnost i pozicioniranje FNR-a, ITEP – C-terminalna domena proteina TROL koja veže FNR (eng. *Isothiocyanate-sensitive Thioredoxin-like domain with proline-rich stretch*). Brojevi označavaju položaj aminokiselina u proteinskoj sekvenci.

3.2. Uzgoj biljaka

Biljke *A. thaliana* uzgajala sam u kontroliranim uvjetima, na dva različita tipa supstrata (A400, Stender, Schermbeck, Njemačka): prosijanom te prosijanom i osušenom (Slika 7). Sušenje supstrata provela sam u sušioniku na 55 °C u trajanju od 48 h, odnosno do gubitka ≈25% mase. Sušenjem se mijenjaju fizikalna svojstva supstrata, zbog čega on ima drugačiju sposobnost zadržavanja vode. Oba tipa supstrata raspodijelila sam u košarice koje su dio sustava za uzgoj

(Arasystem 3600 KIT, Betatech, Gent, Belgija) (Slika 7). Supstrate sam zatim dobro navlažila preko noći, a sjemenke sam prije sijanja stratificirala na 10 °C 48 h u mraku. Nakon sijanja, sustav za uzgoj prekrila sam prozirnom folijom do isključivanja. Uvjete uzgoja postavila sam na 440 ppm $\pm$ 20 ppm CO₂, 21 °C te 12-satni period dana i noći (ravnodnevica 21. ožujka). Osvjetljenje sam regulirala podesivim sustavom LED osvjetljenja (CI-800 LED Experimentation System, CID Bio-Science, Inc., Camas, Washington, SAD) pomoću programa *Light snap!* (V 1.0.16.221) (Slika 8). S obzirom da program omogućuje odabir „svjetlosnih recepata“, odnosno različitih vrijednosti količine i valne duljine svjetlosti ovisno o odabranoj geografskoj poziciji, odabrani program imitirao je sunčevo osvjetljenje na geografskoj poziciji grada Birminghama (West Midlands, UK, 54.00° sjeverne geografske širine i 2.00° zapadne geografske dužine). Temperaturu i vlagu pratila sam pomoću uređaja za bilježenje podataka – *data logger* (LOG32 Data logger, Dostmann electronic GmbH, Wertheim am Main, Njemačka) (Slika 9), a koncentraciju CO₂ pomoću mjerača CO₂ s data loggerom (AirControl 5000, Dostmann electronic GmbH, Wertheim am Main, Njemačka). Biljke su rasle mjesec dana u uvjetima normalne vlage, a zatim još dva tjedna u uvjetima sušnog stresa. Uvjete normalne vlage i sušnog stresa održavala sam različitim intenzitetom zalijevanja, što je praćeno gravimetrijskom metodom. Za uvjete normalne vlage masu Arasystema tijekom uzgoja održavala sam između 2,5 i 3,0 kg, a za uvjete sušnog stresa između 2,0 i 2,4 kg. Uzgojni supstrat svaka dva tjedna prihranjivala sam hranjivom otopinom prema Hoaglandu koncentracije 0,25% (1,25 ml/l Ca(NO₃)₂ $\times$ 4H₂O, 1,25 ml/l KNO₃, 0,25 ml/l KH₂PO₄, 0,5 ml/l MgSO₄ $\times$ 7H₂O, 0,25 ml/l mikroelementi (2,86 g/l H₃BO₃, 1,81 g/l MnCl₂ $\times$ 4H₂O, 0,22 g/l ZnSO₄ $\times$ 7H₂O, 0,08 g/l CuSO₄ $\times$ 5H₂O, 0,02 g/l NaMoO₄ $\times$ H₂O g/l), 0,25 ml/l željezo-etilendiamintetraoctena kiselina (Fe-EDTA) (10,4 g/l EDTA, 7,8 g/l FeSO₄ $\times$ 7H₂O, 56,1 g/l KOH g/l), pH vrijednosti 5,5 (140). Fizikalno-kemijski sastav supstrata kontroliran je u akreditiranom analitičkom laboratoriju na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (Odsjek za agroekologiju, Zavod za ishranu bilja, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska), isto kao i razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima prosijanog te prosijanog i sušenog supstrata pri uvjetima normalne vlage i sušnog stresa.

3.3. Mjerenje vlage i električne vodljivosti supstrata

Razliku u vlazi i električnoj vodljivosti između dvaju tipova supstrata izmjerila sam u uzorku supstrata jednake mase. Mjerenje sam provedela pomoću prijenosnog digitalnog uređaja za mjerenje parametara tla (JXCT, Weihai, Shandong, Kina), prije i nakon trodnevnog upijanja vode. Mjerne igle senzora zabola sam na 12 različitih mjesta u uzorcima supstrata. Uređajem

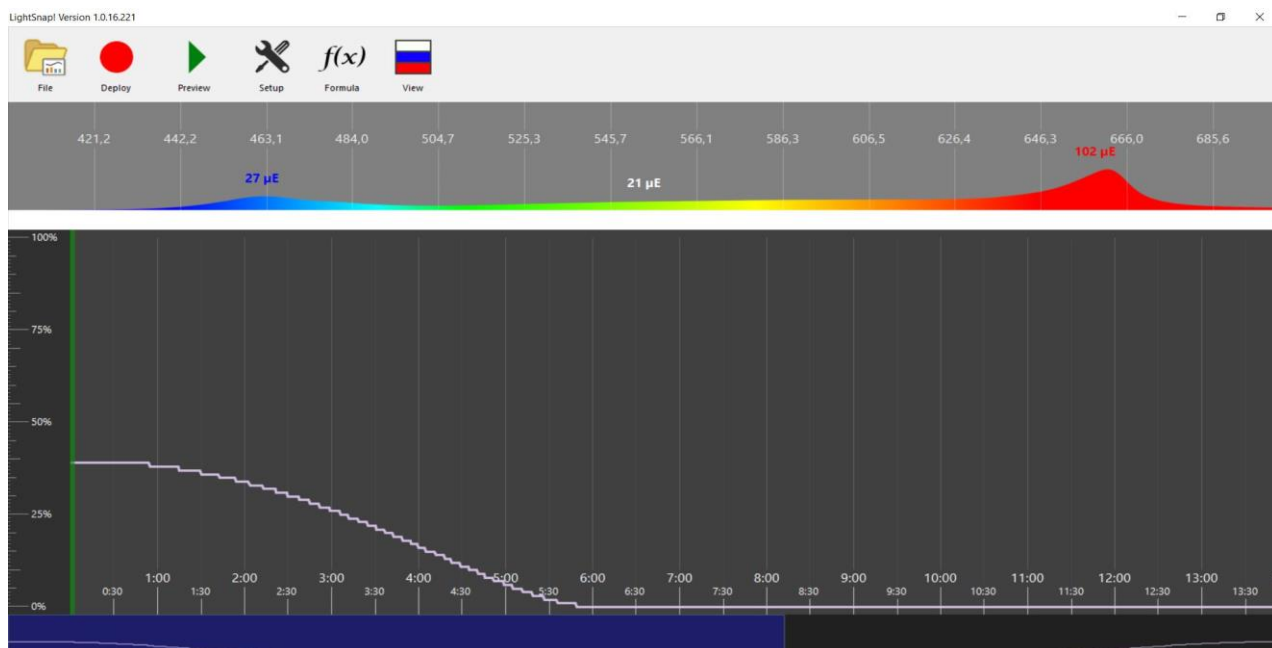
izmjerene vrijednosti prikupila sam, a krajnji rezultat bio je prosječna vrijednost 12 mjerenja (Tablica 1).

Tablica 1. Rezultati mjerenja električne vodljivosti i sadržaja vlage u prosijanom i sušenom supstratu prije natapanja i nakon trodnevnog natapanja u vodi.

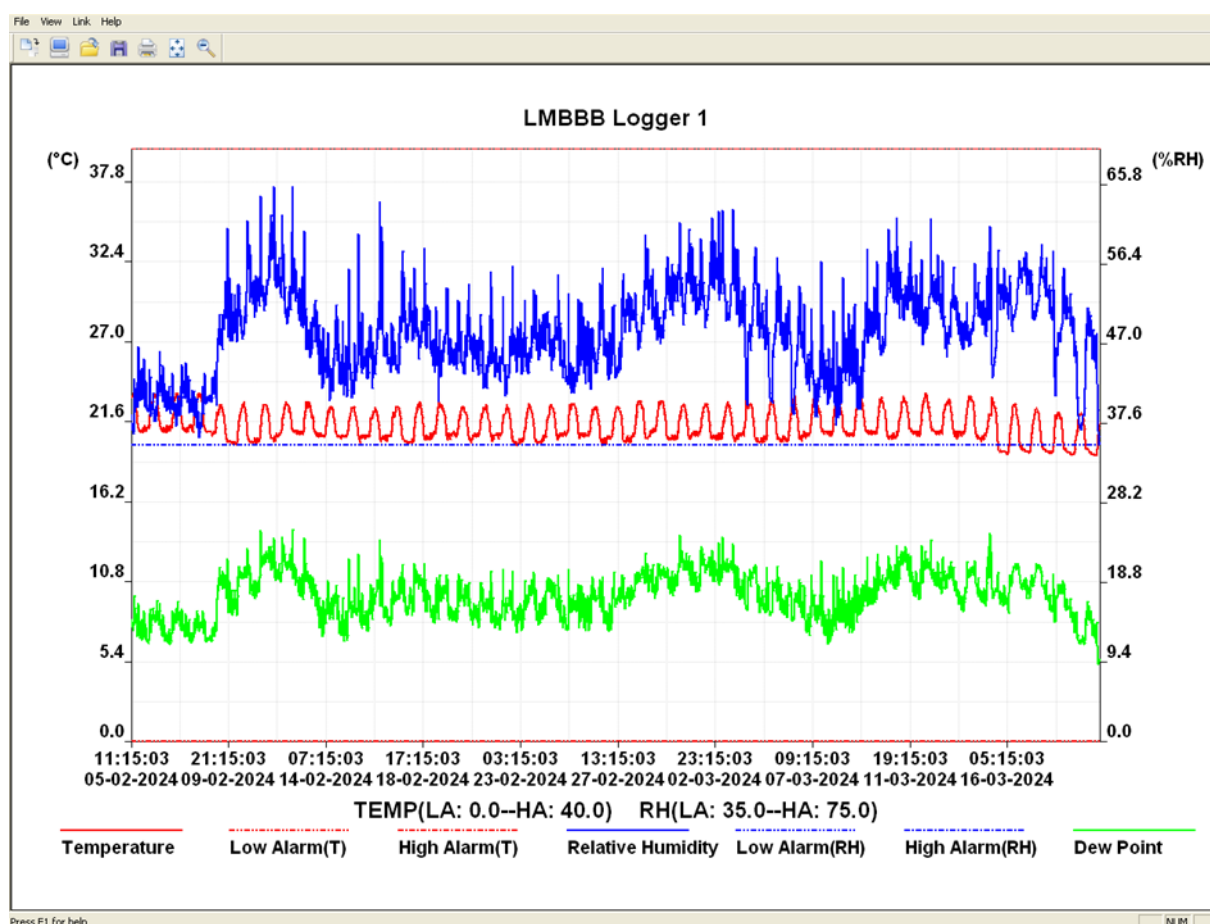
	Električna vodljivost supstrata ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Sadržaj vlage u supstratu (%)
Prosijani supstrat prije natapanja	16,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$	0 %
Prosijani supstrat nakon natapanja	478,50 $\mu\text{S}/\text{cm}$	99,05 %
Sušeni supstrat prije natapanja	0 $\mu\text{S}/\text{cm}$	0 %
Sušeni supstrat nakon natapanja	334,83 $\mu\text{S}/\text{cm}$	76,34 %



Slika 7. Primjer uzgoja biljaka za pokuse u komori za uzgoj pod kontroliranim uvjetima ($440 \text{ ppm} \pm 20 \text{ ppm CO}_2$, 21°C te 12-satni period dana i noći (ravnodnevica 21. ožujka)), na prosijanom te prosijanom i osušenom supstratu.



Slika 8. „Svjetlosni recept“ korišten u pokusima (*Light snap!* (V 1.0.16.221)). Graf prikazuje promjenu intenziteta osvjetljenja u danu. Donja os X prikazuje vrijeme u danu; gornja os X prikazuje valnu duljinu svjetlosti u nm i emisijski spektar u μE ; os Y prikazuje relativni intenzitet svjetlosti u %.



Slika 9. Podatci praćenja temperature i relativne vlage u uzgojnoj komori (LOG32 Data logger, Dostmann electronic GmbH, Wertheim am Main, Njemačka).

3.4. Konfokalna mikroskopija signala reakcije reaktivnih kisikovih vrsta s fluorescentnim bojama

Za vizualizaciju lokalizacije reaktivnih kisikovih vrsta $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , i H_2O_2 u stanicama lista provela sam konfokalnu mikroskopiju primjenom fluorescentnih boja prilagođenom metodom prema Prasad i sur. 2020 (82). Za detekciju $O_2^{\cdot-}$ koristila sam 250 μM dihidroetidij (DHE, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) otopljen u kloroformu, za detekciju H_2O_2 primijenila sam 50 μM fluorescentnu probu „swallow-tailed“ derivat perilena za detekciju lipidnih hidroperoksida (*eng. swallow-tailed perylene derivative for detecting lipid hydroperoxides*, Spy-LHP, Dojindo Molecular Technologies Inc. Rockville, Maryland, SAD) otopljenu u acetonu, a 1O_2 detektirala sam 50 μM bojom Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Thermo Fisher Scientific) otopljenom u metanol. Biljke sam dva sata prije početka pokusa držala u mraku (141). Koristila sam cijeli list koji sam nakon odsijecanja s biljke kratko uronila u 50 mM pufer HEPES, pH vrijednosti 7,5 koji sam zatim inkubirala 30 minuta u otopini jedne fluorescentne boje, dok kontrolne uzorke nisam inkubirala u otopinama boje, nego u 50 mM puferu HEPES. Nakon inkubacije, uzorke sam kratko isprala uranjanjem u 50 mM pufer HEPES i postavila na predmetno stakalce u kapi 50 mM pufera HEPES te pokrila pokrovnim stakalcem. Preparate sam potom analizirala konfokalnom mikroskopijom (Leica TCS SP8 X Laser Scanning Confocal Microscope, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka). Svi uzorci snimani su na istim postavkama mikroskopa HC PL APO CS2 63x/1.40 oil objektivom, 405 nm diodnim laserom i superkontinualnim pobudnim laserom (Leica Microsystems, Germany). Valna duljina pobuđujuće svjetlosti za DHE iznosila je 480 nm, a područje detekcije 560 – 610 nm, za Spy-LHP valna duljina pobuđujuće svjetlosti iznosila 524 nm, a područje detekcije 535 – 580 nm, dok je za SOSG valna duljina pobuđujuće svjetlosti iznosila je 504 nm, a područje detekcije 520 – 560 nm. Autofluorescenciju kloroplasta detektirala sam u području valnih duljina 650 – 750 nm za sve fluorescentne boje. Na početku svakog pokusa intenzitet lasera konfokalnog mikroskopa namjestila sam pomoću kontrolnih uzoraka inkubiranih u 50 mM puferu HEPES bez dodatka fluorescentnih boja. Svi pokusi uključivali su snimke autofluorescencije kloroplasta (crveno signalno polje), svijetlog polja (sivo signalno polje) i detektirane reakcije fluorescentne boje i reaktivnih kisikovih vrsta (zeleno signalno polje). Uzorke sam snimila u tri različita vidna polja i na više različitih ravnina za sve uzorke. Pokus je proveden *in situ*. Od prosječne jačine signala zelenog signalnog polja, u kojem sam mjerila jačinu reakcije fluorescentne boje s reaktivnim kisikovim vrstama, oduzela sam prosječnu jačinu signala kontrolnih uzoraka inkubiranih samo u puferu HEPES kako bi otklonila

autofluorescenciju. Analizu snimaka dobivenih konfokalnom mikroskopijom provela sam programom ImageJ (Fiji), (Java 1.8.0_345 (64 bit), V 1.53t).

3.5. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima

Određivala sam aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX, za što sam pripremila uzorke. Na 0,035 g svježeg tkiva lista dodala sam manju količinu polivinilpirolidona (PVP) (na vrhu špatule) i 1 ml hladnog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0. Tkivo sam homogenizirala tučkom u hladnom tarioniku. Homogenat sam zatim centrifugirala 15 minuta na 20817 g i +4 °C. Dobiveni supernatant čuvala sam na -80 °C.

3.5.1. Mjerenje aktivnosti SOD

Aktivnost SOD-a određivala sam spektrofotometrijskom metodom prema Beauchampu i Fridovichu (1971) (142). Prije mjerenja pripremila sam reakcijsku smjesu koja ne smije biti izložena svjetlosti jer svjetlost pokreće reakciju. Pokus sam zbog toga provodila u mraku, a boca u kojoj se nalazila reakcijska smjesa morala je biti omotana aluminijskom folijom. Reakcijska smjesa sastojala se od: 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,8, 13 mM metionina, 75 µM nitroplavog tetrazolija (*eng. nitro blue tetrazolium*, NBT), 0,1 M EDTA i 1 mM riboflavina. Najprije sam izmjerila apsorbanciju slijepe probe koja se sastojala od 800 µl reakcijske smjese, uz dodatak 190 µl 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,8 i 10 µl 1 mM otopine riboflavina. Riboflavin sam dodala zadnji, jer pod utjecajem svjetlosti generira $O_2^{\cdot-}$, nakon čega sam sadržaj kivete izmiješala. Tijekom reakcije nastaje plavo obojenje koje potječe od netopivog formazana, produkta redukcije NBT-a u prisutnosti $O_2^{\cdot-}$. Apsorpcijski maksimum formazana je na valnoj duljini 560 nm, stoga sam spektrofotometrijsko mjerenje provodila na toj valnoj duljini. SOD uklanja $O_2^{\cdot-}$ potreban za redukciju NBT-a u formazan pa se ovom metodom mjeri smanjenje intenziteta nastanka plavog obojenja.

Zatim sam izmjerila maksimalnu apsorbanciju nastalog formazana u istoj smjesi kao za slijepu probu, ali nakon dodatka riboflavina i miješanja sadržaja, kivetu sam izložila osmominutnom djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W). Izlaganje sadržaja kivete djelovanju svjetlosti pokreće reakciju sinteze $O_2^{\cdot-}$ putem riboflavina.

Za mjerenje apsorbancije u uzorcima lista dodala sam 20 µl uzorka uz proporcionalno smanjenje volumena 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,8. Volumen riboflavina ostao je isti. Uzorke sam prije mjerenja također izložila osmominutnom djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W).

Za kvantifikaciju aktivnosti SOD-a izradila sam baždarnu krivulju iz serije razrjeđenja standardne otopine SOD-a (Superoxid dismutase bovine, Merck, Rahway, New Jersey, SAD) poznatih koncentracija (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,08; 0,1; 0,2; 0,5; i 1 U). Apsorbanciju sam mjerila na isti način kao u mjerenjima aktivnosti SOD-a u uzorcima lista. Jedinica aktivnosti SOD-a označava količinu enzima potrebnu da se redukcija NBT-a u prisutnosti riboflavina na svjetlosti (560 nm) smanji za 50%. Aktivnost SOD-a u uzorcima odredila sam interpolacijom na baždarnoj krivulji. Dobivena vrijednost predstavljala je aktivnost enzima u dodanom volumenu ekstrakta. Aktivnost SOD-a zatim sam preračunala na masu svježe tvari prema jednadžbi:

$$\text{SOD} = \frac{U}{V(uz) \times m} [\text{U g/sv. tv}]$$

Pri čemu je:

U – aktivnost dobivena interpolacijom

$V(uz)$ – volumen uzorka (0,02 ml)

m – masa svježe tvari (0,035 g)

Prilikom mjerenja ukupni volumen reakcijske smjese u kiveti bio je 1 ml kako bi se osigurali standardizirani uvjeti reakcije, konstantne koncentracije reagensa i pouzdana usporedivost enzimске aktivnosti između uzoraka. Pokus sam ponovila tri puta pri čemu sam koristila tri različite replike.

3.5.2. Mjerenje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT izmjerila sam metodom prema Aebi (1984) (143). Za mjerenje aktivnosti pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastojala od 50 ml 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0 i 51 μl 10 mM H_2O_2 . S obzirom da sam mjerenje provodila na 240 nm koristila sam UV-kivete. Slijepa proba sastojala se od 950 μl reakcijske smjese i 50 μl 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0, dok sam u smjesu za mjerenje aktivnosti u ekstraktima lista kalij-fosfatni pufer zamijenila uzorkom u istom volumenu. H_2O_2 se u reakciji troši te sam stoga mjerila pad apsorbancije. Mjerenje sam bilježila svakih 10 sekundi tijekom 2 minute, a aktivnost CAT izrazila sam jedinicom μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po gramu svježe tvari prema jednadžbi:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A(s.v.) \times 6 \times V(r.s.) \times F.R.}{V(uz) \times \epsilon \times l \times m} [\mu\text{mol/min g}_{\text{sv.tv.}}]$$

Pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm u 10 sekundi

6 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

$V(r.s.)$ – volumen reakcijske smjese (1ml)

$F.R.$ – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(uz)$ – volumen uzorka (0,05 ml)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (40 l/mM cm)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

m – masa svježe tvari (g)

Prilikom mjerenja ukupni volumen reakcijske smjese u kiveti bio je 1 ml kako bi se osigurali standardizirani uvjeti reakcije, konstantne koncentracije reagensa i pouzdana usporedivost enzimске aktivnosti između uzoraka. Pokus sam ponovila tri puta pri čemu sam koristila tri različite replike.

3.5.3. Mjerenje aktivnosti APX

Aktivnost APX izmjerila sam metodom koju su razvili Nakano i Asada (1981) (144). Za mjerenje aktivnosti pripremila sam otopine: 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatni pufer pH vrijednosti 7,0, pufer 1 (50 ml 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0 i 500 μ l 10 mM EDTA), 12 mM H_2O_2 (priprema se neposredno prije mjerenja) te 10 mM askorbinsku kiselinu. Mjerenje sam provodila na 290 nm stoga sam koristila UV-kivete. Smjesa za mjerenje slijepe probe sastojala se od 800 μ l pufera 1, 180 μ l 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0, 10 μ l 10 mM askorbinske kiseline i 10 μ l 12 mM H_2O_2 . Za mjerenje aktivnosti APX u uzorcima lista, u istu smjesu kao za slijepu probu, umjesto 180 μ l kalij-fosfatnog pufera dodala sam isti volumen uzorka. H_2O_2 sam dodala posljednji, neposredno prije mjerenja, kako bi se pokrenula reakcija. Do pada apsorbancije dolazi jer se reducirani askorbat, koji apsorbira na 290 nm, oksidira u DHA koji ne apsorbira na toj valnoj duljini. Mjerenje sam bilježila svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost APX izrazila sam kao μ mol oksidiranog askorbata po minuti po gramu svježe tvari prema jednadžbi:

$$APX = \frac{\Delta A(s.v.) \times 4 \times V(r.s.) \times F.R.}{V(uz) \times \varepsilon \times l \times m} [\mu\text{mol/min g}_{sv.tv.}]$$

Pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm u 15 s

4 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

$V(r.s.)$ – volumen reakcijske smjese (1 ml)

$F.R.$ – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(uz)$ – volumen uzorka (0,18 ml)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (2,8 1/mM cm)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

m – masa svježe tvari (g)

Prilikom mjerenja ukupni volumen reakcijske smjese u kiveti bio je 1 ml kako bi se osigurali standardizirani uvjeti reakcije, konstantne koncentracije reagensa i pouzdana usporedivost enzimске aktivnosti između uzoraka. Pokus sam ponovila tri puta pri čemu sam koristila tri različite replike.

3.5.4. Mjerenje aktivnosti PPX

Aktivnost PPX izmjerila sam metodom koju su razvili Nakano i Asada (1981) (144). Reakcijska smjesa sastojala se od 50 ml 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0 u kojem sam otopila 0,126 g pirogalola. Neposredno prije mjerenja u reakcijsku smjesu dodala sam 5,5 μ l 30% H₂O₂, a smjesa je bila u mraku i zamotana u aluminijsku foliju. Za mjerenje slijepe probe u kiveti sam pomiješala 980 μ l reakcijske smjese i 20 μ l 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0, dok sam za mjerenje PPX u uzorcima kalij-fosfatni pufer zamijenila istim volumenom uzorka. Mjerenje sam provodila na valnoj duljini od 430 nm, a zbog nastanka purpurogalina, obojenog produkta oksidacije pirogalola, mjerila sam porast apsorbanije. Mjerenje sam bilježila svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost PPX izrazila sam kao μ mol purpurogalina po minuti po gramu svježe tvari prema jednadžbi:

$$PPX = \frac{\Delta A(s.v.) \times 4 \times V(r.s.) \times F.R.}{V(uz) \times \varepsilon \times l \times m} [\mu\text{mol}/\text{min g}_{sv.tv.}]$$

Pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ – srednja vrijednost promjene apsorbanije pri 430 nm u 15 s

4 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

$V(r.s.)$ – volumen reakcijske smjese (1ml)

$F.R.$ – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(uz)$ – volumen uzorka (0,02 ml)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (2,47 1/mM cm)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

m – masa svježe tvari (g)

Prilikom mjerenja ukupni volumen reakcijske smjese u kiveti bio je 1 ml kako bi se osigurali standardizirani uvjeti reakcije, konstantne koncentracije reagensa i pouzdana usporedivost enzimске aktivnosti između uzoraka. Pokus sam ponovila tri puta pri čemu sam koristila tri različite replike.

3.6. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Ekstrakciju uzoraka i mjerenje koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida provela sam prema protokolu po Wellburnu (1994) (145). Na 30 mg svježeg tkiva lista dodala sam 1 ml 80% hladnog acetona i manju količinu kalcijeva karbonata (CaCO₃) (na vrhu špatule). Homogenizaciju sam provela u hladnom tarioniku s tučkom. Nakon prve homogenizacije u tarionik dodala sam još 0,5 ml hladnog acetona za ispiranje tarionika. Ukupan volumen uzorka centrifugirala sam 10 minuta na 5000 g i temperaturi +4 °C. Supernatant sam odvojila od taloga, a na preostali talog sam dodala još 1 ml 80% hladnog acetona te sam tubice protresla na vortexu. Uzorke sam zatim ponovno centrifugirala pri istim uvjetima, a supernatant sam spojila s onim dobivenim prethodnim ciklusom centrifugiranja. Volumene svih uzoraka ujednačila sam nadopunjavanjem acetonom do jednakog volumena. Tako dobivene ekstrakte koristila sam za spektrofotometrijsku analizu. Apsorbanciju sam mjerila na tri valne duljine: 470 nm, 646 nm i 663 nm, a dobivene vrijednosti uvrstila sam u empirijske jednadžbe radi izračuna koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida:

$$C_a = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646} [\mu\text{g/ml}]$$

$$C_b = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663} [\mu\text{g/ml}]$$

$$C_c = \frac{1000 A_{470} - 3,27 C_a - 104 C_b}{198} [\mu\text{g/ml}]$$

Kako bi koncentracije pigmenata izrazila u μg po mg svježeg tkiva, masene koncentracije pigmenata dobivene u prethodnim jednadžbama uvrstila sam u sljedeću jednadžbu:

$$w = \frac{C(\text{pigm}) \times V(e.o.)}{m} [\mu\text{g/mg}_{\text{sv. tv.}}]$$

Pri čemu je:

C_a – masena koncentracija klorofila *a* ($\mu\text{g/ml}$)

C_b – masena koncentracija klorofila *b* ($\mu\text{g/ml}$)

C_c – masena koncentracija karotenoida ($\mu\text{g/ml}$)

A_{470} – absorbancija pri 470 nm

A_{646} – absorbancija pri 646 nm

A_{663} – absorbancija pri 663 nm

w – maseni udio pigmenata u svježem tkivu ($\mu\text{g/mg}_{\text{sv. tv.}}$)

C_{pigm} – masena koncentracija pojedinog pigmenta ($\mu\text{g/ml}$)

$V_{e.o.}$ – volumen ekstrakcijske otopine (ml)

m – masa svježe tvari (mg)

Osim masenog udjela klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida, rezultate određivanja pigmenata u svježem biljnom tkivu izrazila sam i kao omjer klorofila *a* i klorofila *b*, maseni udio ukupnih klorofila, te omjer ukupnih karotenoida i ukupnih klorofila.

3.7. Kvantitativna westernska metoda otiska velike podjedinice enzima RUBISCO

Westernsku metodu otiska velike podjedinice enzima RUBISCO provela sam pomoću komercijalnog kompleta („kita“) i prema protokolu proizvođača (Rubisco quantitation kit (Western blot), Agrisera, Vännäs, Švedska). Prije provođenja pokusa prethodno sam pripremila proteinske ekstrakte lista. Homogenizirala sam 100 mg smrznutog tkiva lista u hladnom tarioniku uz dodatak 490 µl proteinskog ekstrakcijskog pufera u radnoj koncentraciji (1×) (protein extraction buffer (PEB 4×), Agrisera, Vännäs, Švedska) i 10 µl proteaznog inhibitora (cOmplete ULTRA tablets, mini, EDTA-free, EASYpack, Basel, Švicarska). Uzorke sam zatim naizmjenično zamrzavala u tekućem dušiku i sonificirala u tri uzastopna ciklusa, a za cijelo vrijeme trajanja postupka uzorke sam držala na ledu. Potom sam uzorke centrifugirala tri minute na 10000 g kako bi zeleni supernatant izdvojila od sivo-bijelog taloga, te supernatant prelila u čiste plastične tubice. Alikvote proteinskog ekstrakta smrznula sam u tekućem dušiku i čuvala na -80 °C. Prije samog nanošenja na gel uzorke sam razrijedila s bezbojnim Laemmli puferom (4% natrijev dodecil-sulfat (*eng. sodium dodecil sulphat*, SDS), 20% glicerol, 10% 2-merkaptetanol, 0,125 M Tris HCl, pH vrijednosti 6,8) u omjeru biljni uzorak : Laemmli pufer = 1:20, te dodala malu količinu ditiotreitola (DTT) (na vrhu špatule). Tako pripremljene uzorke zagrijala sam 5 minuta na 55 °C.

Tablica 2. Sastav gela za koncentriranje (gornji gel) i gela za razdvajanje (donji gel) za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima.

	Gornji gel (5%)	Donji gel (12%)
dH ₂ O	3,360 ml	1,98 ml
Akrlamid (30%)	0,996 ml	2,40 ml
Tris-HCl pufer	1,5 ml 0,5 M, pH vrijednosti 6,8	1,5 ml 1,5 M, pH vrijednosti 8,8
10% SDS (w/v)	60,00 µl	0,10 ml
10% amonijev persulfat (APS), (w/v)	60,00 µl	0,10 ml
tetrametiletildiamin (TEMED)	25,00 µl	15,00 µl

U okviru westernske metode otiska prvo sam provela poliakrilamidnu vertikalnu elektroforezu u denaturirajućim uvjetima kako bi proteine razdvojila u gelu prema njihovoj molekulskoj masi. Na gornji gel za koncentriranje (Tablica 2) nanijela sam 2 μ l proteinskog ekstrakta što odgovara ekvivalentu približno 0,02 mg svježe mase tkiva, 5 μ l RUBISCO proteinskog standarda (Rubisco positive control/quantitation standard, Agrisera, Vännäs, Švedska) koncentracije 0,15 pM/ μ l, što odgovara koncentraciji 0,75 pM velike podjedinice enzima RUBISCO, te 2,5 μ l biljega molekulskih masa (Precision plus protein™ dual color standards, Bio-rad Laboratories, Hercules, California, SAD) za procjenu molekulske mase proteinskih vrpce detektiranih iz proteinskih uzoraka. Elektroforezu sam provela u kadici (Peqlab PerfectBlue Vertikales Doppelgelsystem 45-2020-i Twin L, Schönwalde-Glien, Njemačka) u 1 $\times$ SDS puferu (3,03 g Tris, 14,41 g glicin, 1 g SDS, H₂O do 1 l) na 130 V (Electrophoresis power supply – EPS 301, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, SAD) dok uzorci nisu prešli u donji gel za razdvajanje (Tablica 2). Elektroforezu sam nastavila na 150 V do trenutka kada su uzorci dosegнули neposrednu blizinu donjeg ruba gela za razdvajanje. Za postupak provođenja westernske metode otiska i detekcije rezultata pripremila sam otopine: 10 $\times$ pufer za prijenos (112,605 g glicin, 24,22 g Tris, H₂O do 1 l), 10 $\times$ fosfatni pufer (*eng. phosphate buffered saline*, PBS, 40,00 g NaCl, 1 g KCl, 5,75 g Na₂HPO₄ $\times$ 7H₂O, 1 g KH₂PO₄, dH₂O do 500 ml), otopina A (50 ml 1 $\times$ PBS, 5 ml Tween 20, 25 g mlijeka u prahu, dH₂O do 500 ml), otopina B (205 μ l Tween 20, 1 $\times$ PBS do 25 ml), primarno antitijelo (Anti-RbcL Rubisco large subunit, form I (rabbit), Agrisera, Vännäs, Švedska, 1:4000 u otopini A), sekundarno antitijelo (Goat anti-Rabbit IgG (H&L), HRP conjugated, Agrisera, Vännäs, Švedska, 1:50000 u otopini A). Nakon što sam provela elektroforezu, proteine sam prenijela s gela na nitroceluloznu membranu (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, SAD). Gel i membranu složila sam u „sendvič“ za prijenos, koji se sastojao od točno poredanih komponenata namočenih u pufer za prijenos s dodatkom 10% metanola: spužvica, Whatman papir, nitrocelulozna membrana, gel s uzorcima, Whatman papir i spužvica. „Sendvič“ je umetnut u kazetu i kadicu za prijenos (VWR® PerfectBlue™ Tank-Electroblotter, VWR, West Chester, Pennsylvania, SAD), koja je napunjena puferom za prijenos tako da je membrana okrenuta prema katodi, a gel prema anodi. Za vrijeme prijenosa, kadicu sam postavila na magnetsku miješalicu, a u kadicu sam stavila magnet koji je tijekom prijenosa miješao pufer. Prijenos sam provodila 1 h na 350 mA na istom izvoru struje kao elektroforezu. Nakon uspješnog prijenosa proteina s gela na membranu, membranu sam blokirala u otopini A 30-60 minuta kako bi spriječila nespecifično vezanje antitijela. Zatim sam membranu inkubirala u otopini primarnog antitijela preko noći u hladnoj komori. Idući dan, membranu sam isprala 4 $\times$ po 10 minuta u otopini A, nakon čega sam ju

inkubirala u otopini sekundarnog antitijela 1 h na sobnoj temperaturi. Na kraju sam membranu ispirala u otopini B $2\times$ po 10 minuta. Sve inkubacije u otopinama provela sam na tresilici. Nakon toga razvila sam, odnosno detektirala rezultate na medicinskom rendgenskom filmu (AGFA, Ortho, CP-GU, Mortsel, Belgija) upotrebom unaprijedene detekcije kemiluminiscencijom (ECL, *eng. enhanced chemiluminescent detection*, (AgriseraECL SuperBright, Agrisera, Vännäs, Švedska). Razvijanje sam provela umatanjem membrane u prozirnu foliju na kojoj su se nalaze fluorescentne otopine ECL A i ECL B SuperBright u jednakim omjerima, a potreban volumen za detekciju ovisi o uzorcima. Membranu sam postavila u kazetu za razvijanje, a na nju sam postavila rendgenski film. Razvijanje sam izvodila u potpunom mraku, a vrijeme eksponiranja ovisilo je o postignutom intenzitetu fluorescencije detektiranih uzoraka (1-3 minute). Zatim sam film uronila u otopinu razvijача (Kodak, Rochester, New York, SAD) 1 minutu uz lagano miješanje, nakon čega sam film kratko ispirala u dH_2O . Pri kraju postupka film sam uronila u otopinu fiksativa (Kodak, Rochester, New York, SAD) i ponovno isprala u dH_2O . Tako dobivene rezultate na filmu skenirala sam na uređaju EPSON perfection V700 photo a (Suwa, Nagano, Japan) te kvantificirala primjenom programa ImageJ (Fiji), (Java 1.8.0_345 (64 bit), V 1.53t). Ekspresiju velike podjedinice enzima RUBISCO u uzorcima odredila sam kvantitativnom analizom jačine detektiranih signala, uz normalizaciju prema standardu velike podjedinice enzima RUBISCO (0,75 pmol) koji sam nanijela na svaki gel, čime sam omogućila usporedbu između različitih uzoraka. Budući da je intenzitet signala standarda varirao između različitih filmova za detekciju, vjerojatno zbog učinkovitosti kemiluminiscentne detekcije, enzimske reakcije, raspodjele reagensa i osjetljivosti filma, kvantifikaciju uzoraka nisam provela usporedbom apsolutnih intenziteta između filmova nego isključivo relativno na standard prisutan na istom filmu. Time sam svaki film tretirala kao zasebnu kalibracijsku jedinicu, unutar istih uvjeta detekcije. Usporedivost uzoraka bila je osigurana neovisno o razlikama u apsolutnoj jačini signala i učinkovitosti detekcije između različitih filmova. Varijacije jačine signala standarda nisu odražavale promjene u količini, već tehničku varijabilnost detekcijskog sustava.

3.8. Mjerenje fotosintetskih parametara izmjene plinova

Promjene u stopi asimilacije CO_2 ($\text{A } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) izmjerila sam uređajem GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Uređaj funkcionira na principu analize i usporedbe sastava zraka koji ulazi u mjernu komoru i koji izlazi iz nje. Tijekom mjerenja zrak kontroliranog sastava i protoka struji kroz klimatski reguliranu komoru u kojoj se nalazi biljni uzorak. Uređaj kontinuirano mjeri koncentracije CO_2 i vodene pare u ulaznom i izlaznom zraku infracrvenim

analizatorima plinova te iz njihove razlike izračunava neto stopu asimilacije CO₂, transpiraciju i stomatalnu provodljivost. Sustav omogućuje preciznu kontrolu okolišnih uvjeta u mjernoj komori, uključujući koncentraciju CO₂, intenzitet fotosintetski aktivnog zračenja (*eng. photosynthetically active radiation*, PAR)), temperaturu, relativnu vlažnost i protok zraka. U komoru za mjerenje smjestila sam cijelu zasađenu biljku, a mjerenja sam provela nakon svakog ciklusa uzgoja. Promjenu stope asimilacije CO₂ u biljkama mjerila sam u dva odvojena pokusa: pri stupnjevitoj promjeni koncentracije CO₂ (35, 100, 180, 280, 400, 700, 1200, 2000 ppm CO₂) u komori za mjerenje, te pri stupnjevitoj promjeni intenziteta osvjetljenja (PAR 200, 500, 800, 1500, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) u komori za mjerenje. Tijekom mjerenja stope asimilacije CO₂ u ovisnosti o stupnjevitoj promjeni koncentracije CO₂ u mjernoj komori, ostali uvjeti u mjernoj komori bili su konstantni: 23 °C, protok zraka 750 $\mu\text{mol}/\text{s}$, PAR 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, koncentracija vodene pare 1800 ppm. Početni interval prilagodbe biljke uvjetima u komori za mjerenje trajao je 15 minuta pri čemu je koncentracija CO₂ bila 400 ppm. Nakon promjene koncentracije CO₂ uzorci su se prilagođavali svakoj novoj koncentraciji CO₂ po potrebi 60-150 sekundi, ovisno o brzini postizanja stabilne razine izmjene plinova. Nakon stabilizacije bilježila sam stopu asimilacije CO₂ 40-60 sekundi. Mjerenje sam provela nakon postizanja stabilne stope asimilacije CO₂ pri svakom stupnju koncentracije CO₂ u mjernoj komori. Tijekom mjerenja stope asimilacije CO₂ u ovisnosti o stupnjevitoj promjeni intenziteta osvjetljenja u mjernoj komori, ostali uvjeti u mjernoj komori bili su konstantni: 23°C, protok zraka 750 $\mu\text{mol}/\text{s}$, koncentracija CO₂ 400 ppm, koncentraciji vodene pare 1800 ppm. Početni interval prilagodbe biljke uvjetima u komori za mjerenje trajao je 5 minuta pri čemu je PAR iznosio 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Nakon svake promjene intenziteta osvjetljenja u mjernoj komori period prilagodbe trajao je pet minuta, nakon čega sam odmah zabilježila razinu stope asimilacije CO₂. Podatke mjerenja zabilježila sam pomoću uređaju pripadajućeg programa GFS-Win Software i grafički prikazala pomoću uređaju pripadajućeg programa GFS-plot Software (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Stopu promjene asimilacije CO₂ standardizirala sam na površinu rozeta biljaka korištenih u pokusima. Površinu rozeta odredila sam digitalnom analizom slike pomoću programa ImageJ (Fiji), (Java 1.8.0_345 (64 bit), V 1.53t) kalibracijom piksela. Program na temelju referentnog predmeta poznate duljine piksele pretvara u mm². Površinu rozeta izrazila sam u mm².

3.9. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista

Poludebele prereze tkiva lista pripremila sam prema ranije uhodanom protokolu (146). Za postupak izrade poludebelih prereza pripremila sam otopine: 0,05 M kakodilatni pufer pH

vrijednosti 7,2 (25 ml 0,2 M natrijevog kakodilata [$4,28 \text{ g Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$] u 75 ml dH_2O), 2% glutaraldehid (primarni fiksativ) ($(\text{CH}_2)_3(\text{CHO})_2$ u kakodilatnom puferu), 2% osmij tetroksid (sekundarni fiksativ) (1 g OsO_4 u 50 ml H_2O), Spurovo sredstvo (40 g ERL 4221-D (vinil cikloheksan dioksid), 32 g DER 736 (Polipropilen glikol diglicidil eter), 104 g NSA (nonenil sukcinski anhidrid), 1,6 g S-1 (Dimetilaminoetanol, (DMAE))). Uklapanje biljnog tkiva u polimer za izradu poludebelih prereza počinje postupkom fiksacije tkiva. Tkivo lista sam u otopini glutaraldehida žiletom izrezala na kvadratiće ne veće od 1 mm^2 te provela primarnu fiksaciju inkubacijom u glutaraldehidu 1 h. Zatim sam tkivo isprala kakodilatnim puferom $2\times$ po 10 minuta. Sljedeći korak je sekundarna fiksacija koju sam provela inkubacijom 1 h u otopini OsO_4 i kakodilatnog pufera u omjeru 1:1. Navedene inkubacije provela sam na ledu. Zatim sam tkivo ispirala u dH_2O $4\times$ po 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam tkivo dehidrirala u padajućem nizu razrjeđenja etanola 50%, 60%, 70%, 80%, 90% i 96%, po 10 minuta. Nakon dehidracije inkubirala sam tkivo u prijelaznim otapalima od kojih je prvo bilo mješavina 96% etanola i acetona u omjeru 1:1, u kojem je tkivo bilo 30 minuta. Sljedeća inkubacija bila je u čistom acetonu također 30 minuta. Tkivo sam zatim inkubirala u mješavinama acetona i Spurovog sredstva u različitim omjerima. Inkubacija u mješavini aceton:smola 2:1 trajala je 1 h, u mješavini aceton:smola 1:1 trajala je 2 h, u mješavini aceton:smola 1:2 3 h, te za kraj u čistoj smoli preko noći na tresilici. U silikonske kalupe za polimerizaciju postavila sam oznake uzoraka napisane običnom olovkom na papiru te sam ih prekrila malom količinom Spurovog sredstva. Zatim sam u kalupe postavila po tri komadića tkiva lista i kalup do vrha napunila Spurovim sredstvom. Polimerizacija je trajala dva dana na 65°C u peći. Za promatranje poludebelih prereza lista primjenom invertnog svjetlosnog mikroskopa (Opton Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Njemačka) polimerizirani blok s tkivom prirezala sam pomoću piramitoma, a prereze debljine 500 nm izradila sam pomoću ultramikrotoma (Leica ultracut R, Wetzlar, Njemačka). Prereze sam zatim na predmetnom stakalcu obojala 1% otopinom toluidinskog modrila ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}^+$) i 2% boraksa ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) u omjeru 1:1. Otopinu sam lagano isparavala na izvoru topline kako bi se uzorci zalijepili za predmetno stakalce, te ju zatim isparala laganim mlazom dH_2O . Uzorke sam promatrala na povećanju $400\times$.

3.10. Statistička obrada podataka

Za spektrofotometrijsko mjerenje udjela fotosintetskih pigmenata i aktivnosti antioksidacijskih enzima koristila sam tri biološke i tri tehničke replike. Navedeno mjerenje provela sam na svim biljnim linijama u svim uvjetima rasta. Rezultate sam prikazala kao izračun srednjih vrijednosti $\pm$ standardna devijacija.

Za vizualizaciju lokalizacije reaktivnih kisikovih vrsta konfokalnom mikroskopijom koristila sam tri biološke replike i 10 tehničkih replika. Snimke sam izradila u tri različita vidna polja i u više različitih ravnina. Vizualizaciju na navedeni način provela sam na svim biljnim linijama u svim uvjetima rasta. Intenzitet signala detektiranih reaktivnih kisikovih vrsta kvantificirala sam programom ImageJ (*Fiji*) (Java 1.8.0_345 (64 bit), V 1.53t). Rezultate sam prikazala kao izračun srednjih vrijednosti $\pm$ standardna devijacija.

Mjerenje stope asimilacije CO₂ izradila sam u tri biološke replike. Mjerenje sam provela na svim biljnim linijama u svim uvjetima rasta. Rezultate sam grafički prikazala programom GFS-plot Software (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Svaka točka grafa prikazuje prosjek tri mjerenja stope asimilacije CO₂ na pripadajućim uvjetima intenziteta svjetlosti ili koncentracije CO₂ u mjernoj komori uređaja.

Statističke analize i određivanje značajnih razlika između mutantnih linija i WT-a provela sam pomoću analize varijance One-way ANOVA i Dunnettovog testa s razinom značajnosti 5%. Statistički značajne razlike na grafovima označila sam zvjezdicom. Statističke analize i određivanje značajnih razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja provela sam pomoću analize varijance One-way ANOVA i Tukey testa s razinom značajnosti 5%. Statistički značajne razlike na grafovima označila sam različitim slovima. Statističku obradu podataka provela sam u programu GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, SAD). Biljke korištene u svim pokusima odabrala sam nasumično.

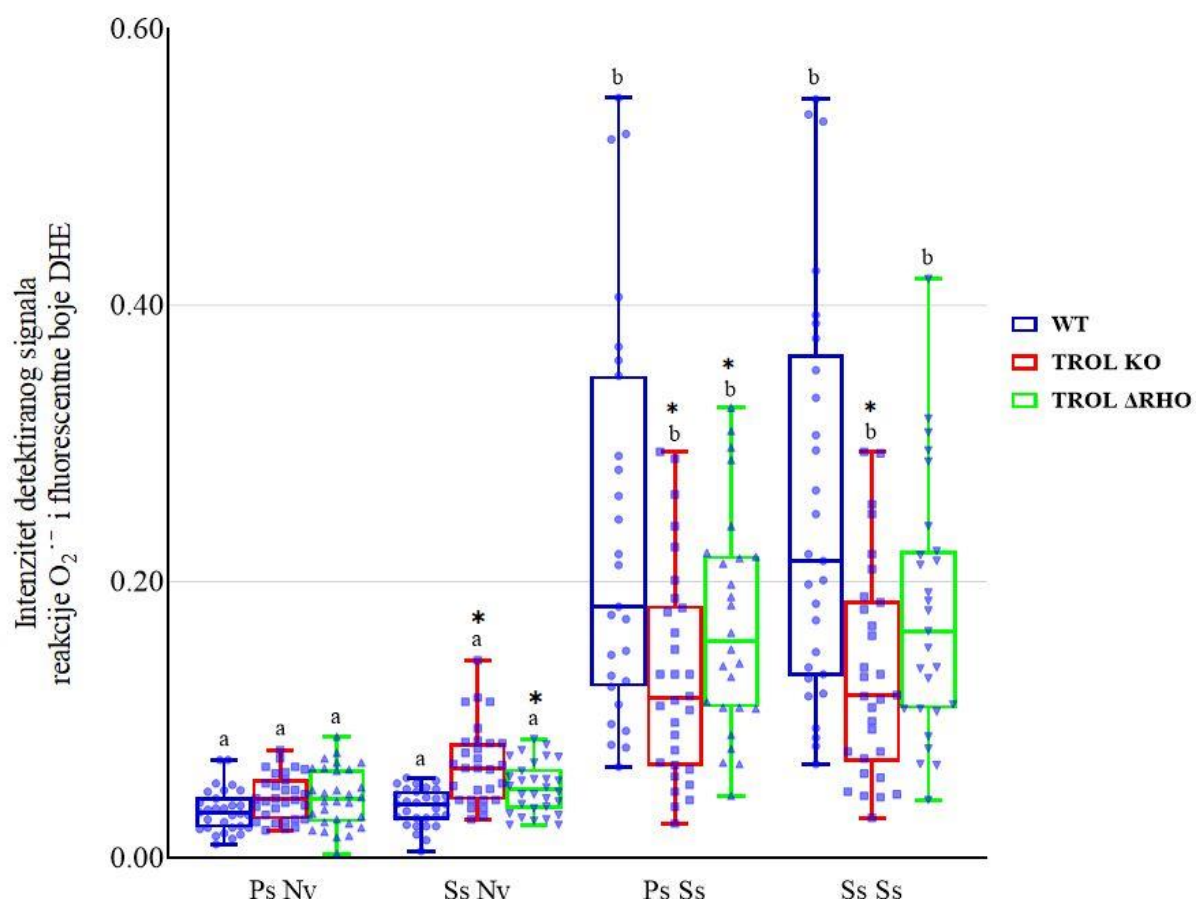
4. REZULTATI

Rezultate pokusa prikazala sam u tri cjeline. Svaka cjelina prati rezultate dviju mutantnih linija i WT-a. Dobivene rezultate za mutantne linije usporedila sam međusobno te u odnosu prema WT-u. Naglasak sam stavila na mutantne linije TROL KO i TROL Δ RHO koje su bile u središtu istraživanja. TROL KO ne eksprimira protein TROL pa je vezanje FNR-a za tilakoidne membrane znatno smanjeno. Liniji TROL Δ RHO nedostaje 13 AK (203-215) domene RHO za koju se smatra da, uslijed vezanja reduciranog liganda, PQ, odašilje signale preko tilakoidne membrane za otpuštanje FNR-a s proteina TROL. Rezultate istraživanja provedenih na linijama TROL KO i TROL Δ RHO prikazala sam u prvoj cjelini. U drugoj cjelini prikazala sam rezultate istraživanja na linijama Δ ITEP i Δ PEPE. Domena ITEP odgovorna je za vezanje s FNR-om, a kod linije Δ ITEP uklonjeno je 17 AK te domene. Domena PEPE odgovorna je za fleksibilnost C-terminalne regije, a kod linije Δ PEPE uklonjeno je 23 AK te domene. Rezultate za linije D207E i D207N prikazala sam u trećoj cjelini. Za aktivnost rodanaznih domena u proteinima s rodanaznom aktivnošću odgovoran je cistein na poziciji 207. U proteinima koji nemaju rodanaznu aktivnost, kao što je protein TROL, na poziciji 207 umjesto cisteina nalazi se aspartat. U liniji D207E aspartat 207 zamijenjen je glutaminskom kiselinom, a u liniji D207N asparaginom.

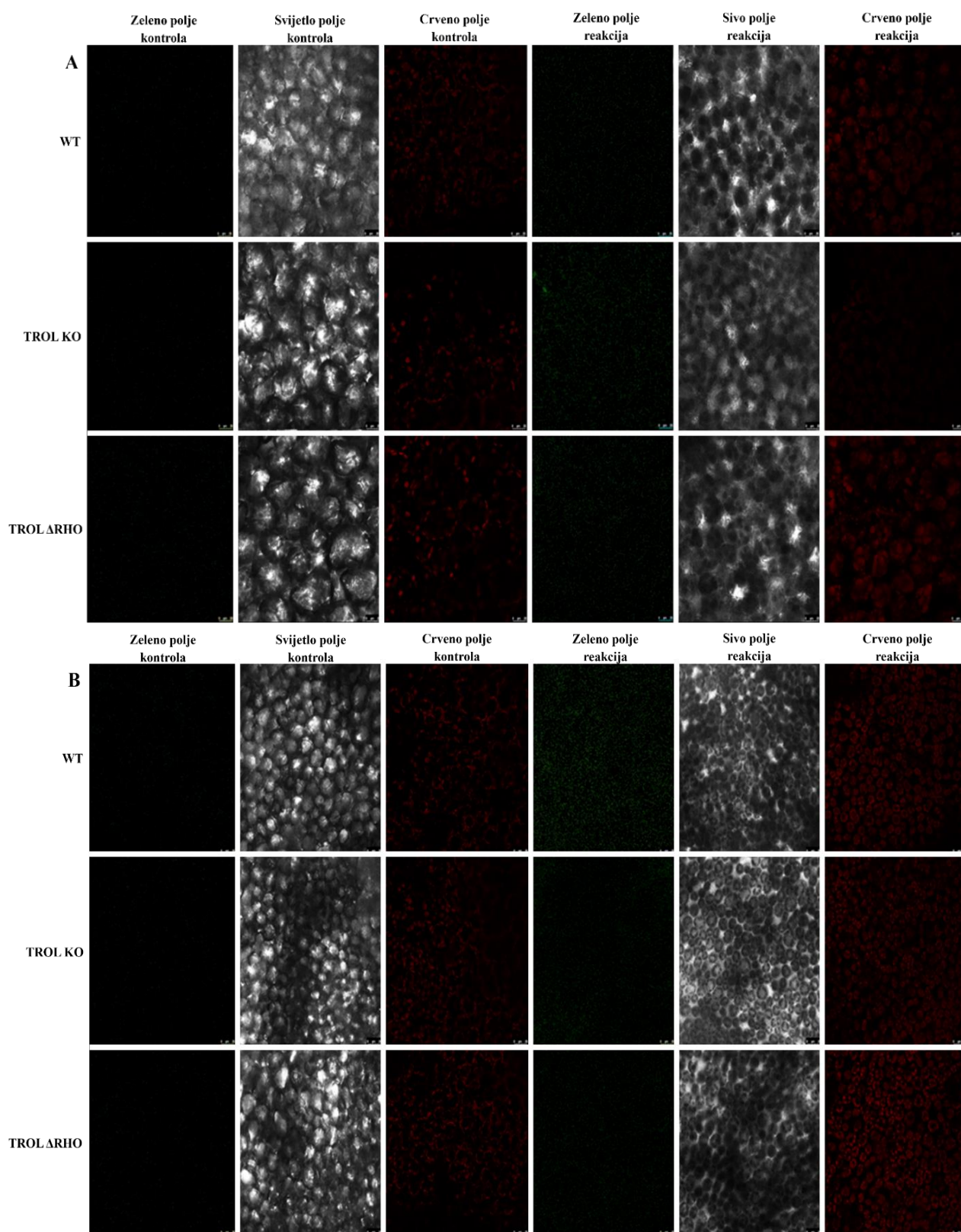
4.1. Funkcionalna analiza utjecaja potpunog izostanka proteina TROL i delecije domene RHO na regulaciju vezanja FNR-a tijekom sušnog stresa

4.1.1. Utjecaj sušnog stresa na akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta

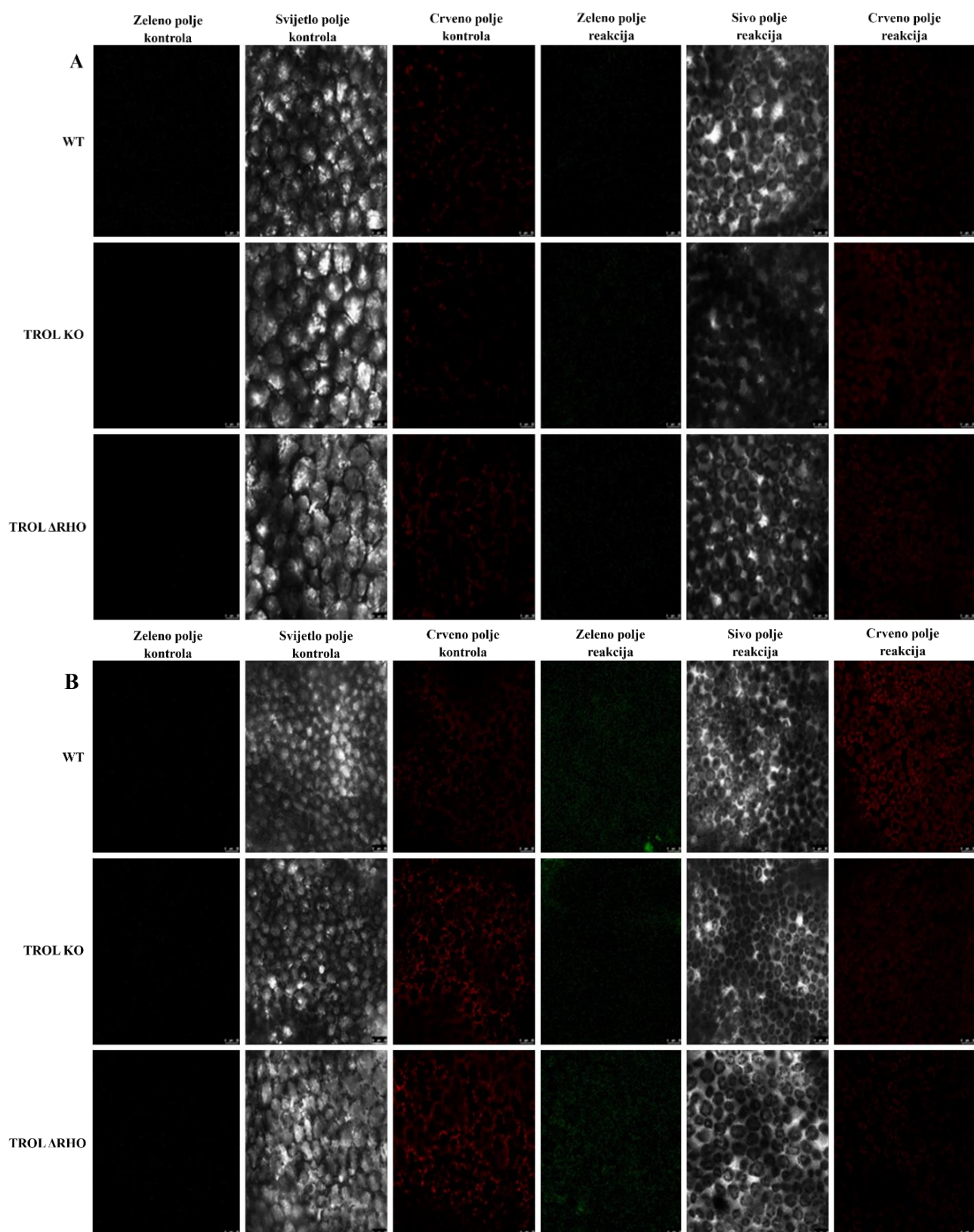
Konfokalnom mikroskopijom uz pomoć fluorescentnih boja detektirala sam signale reakcije odgovarajuće fluorescentne boje s reaktivnim kisikovim vrstama $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i 1O_2 . Uočila sam značajne razlike između mutantnih linija i WT-a, te između istih linija na različitim uvjetima uzgoja. U slučaju $O_2^{\cdot-}$ do značajnog smanjenja signala došlo je u biljaka uzgajanih na oba tipa uzgojnog supstrata u uvjetima sušnog stresa kod linije TROL KO u odnosu na WT. S druge strane, obje mutantne linije u uvjetima normalne vlage na sušenom supstratu pokazale su povećanje signala u odnosu na WT. Usporedbom pojedinih linija uočila sam znatno povećanje signala u uvjetima sušnog stresa u odnosu na uvjete normalne vlage kod linija WT, TROL KO i TROL Δ RHO (Slike 10, 11, 12).



Slika 10. Jačina signala fluorescentne boje DHE detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT-om označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. DHE – dihidroetidij, O₂•⁻ – superoksidni radikal, TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

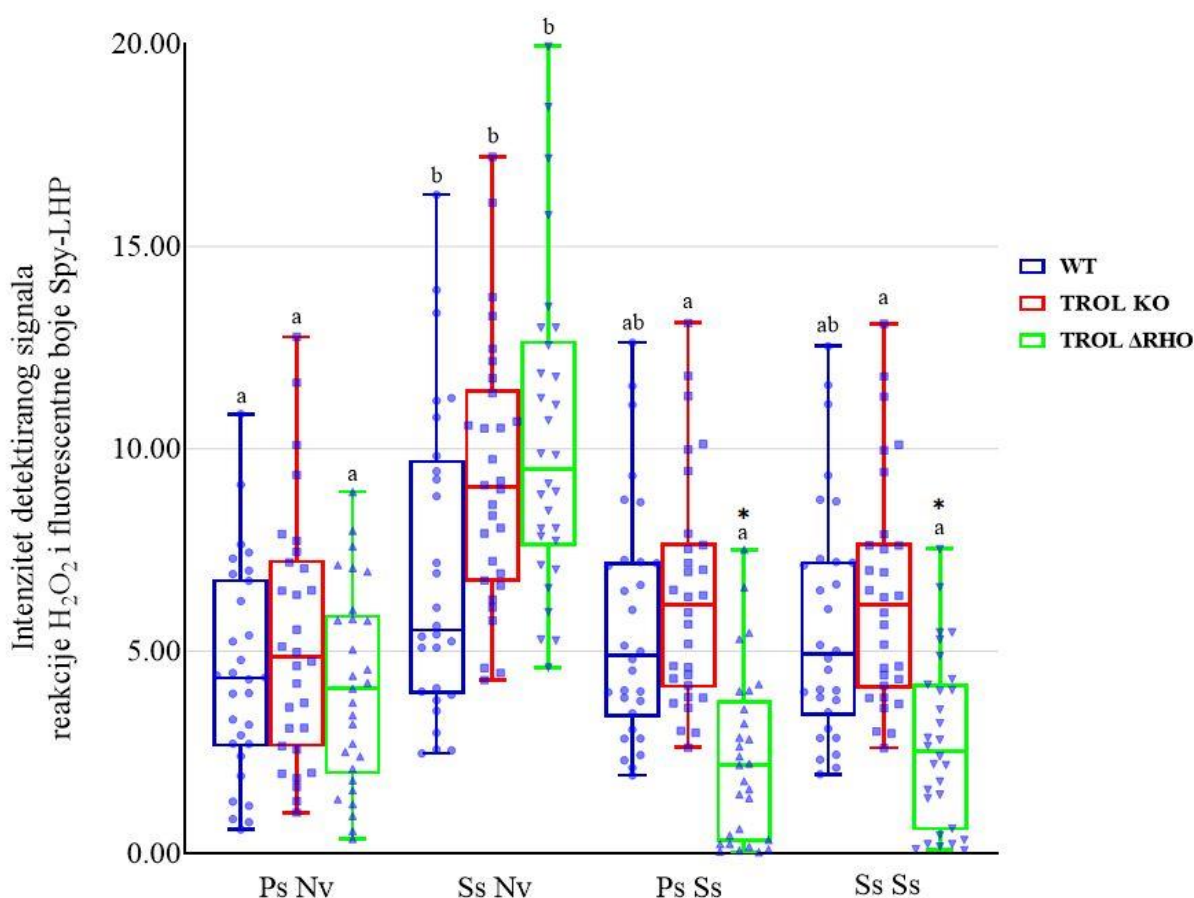


Slika 11. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje DHE konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne ekspirira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

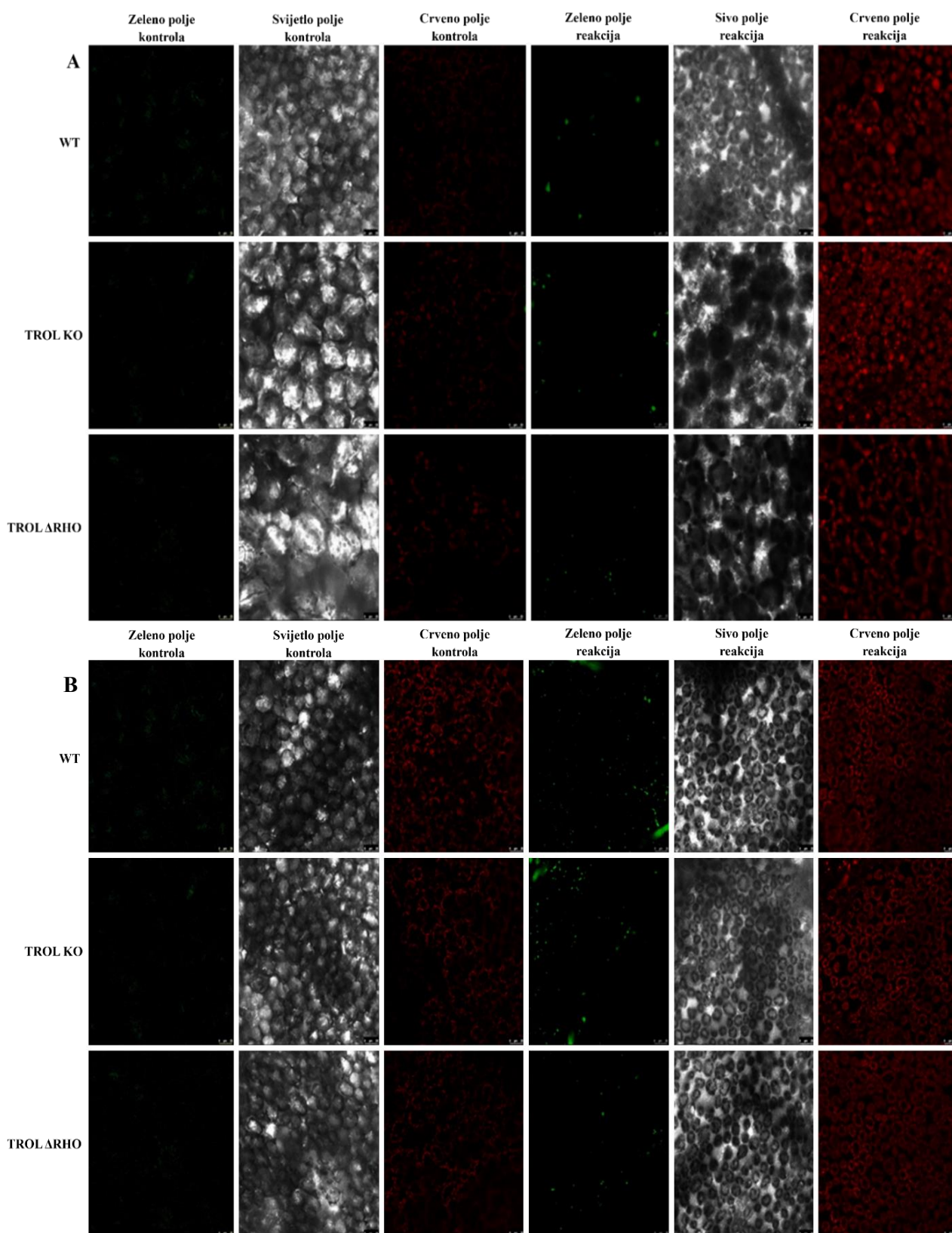


Slika 12. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje DHE konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

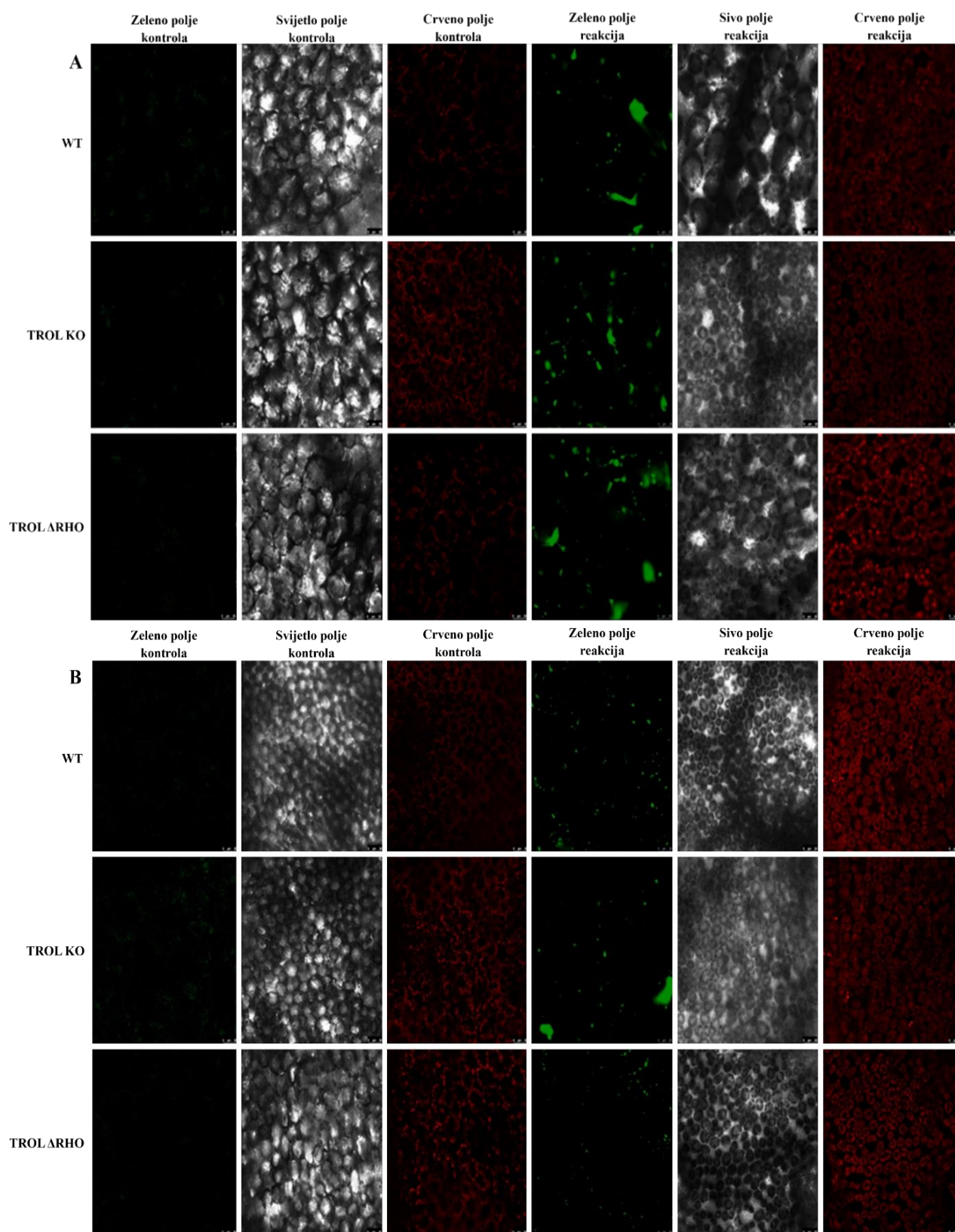
U slučaju H_2O_2 do značajnog smanjenja signala došlo je kod linije TROL Δ RHO u uvjetima sušnog stresa na oba tipa uzgojnog supstrata u usporedbi s WT. Sve tri linije pokazale su značajan porast signala na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi. (Slike 13, 14, 15).



Slika 13. Jačina signala fluorescentne boje Spy-LHP detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Spy-LHP – eng. *swallow-tailed perylene derivative for detecting lipid hydroperoxides*, H_2O_2 – vodikov peroksid, TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (eng. *wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

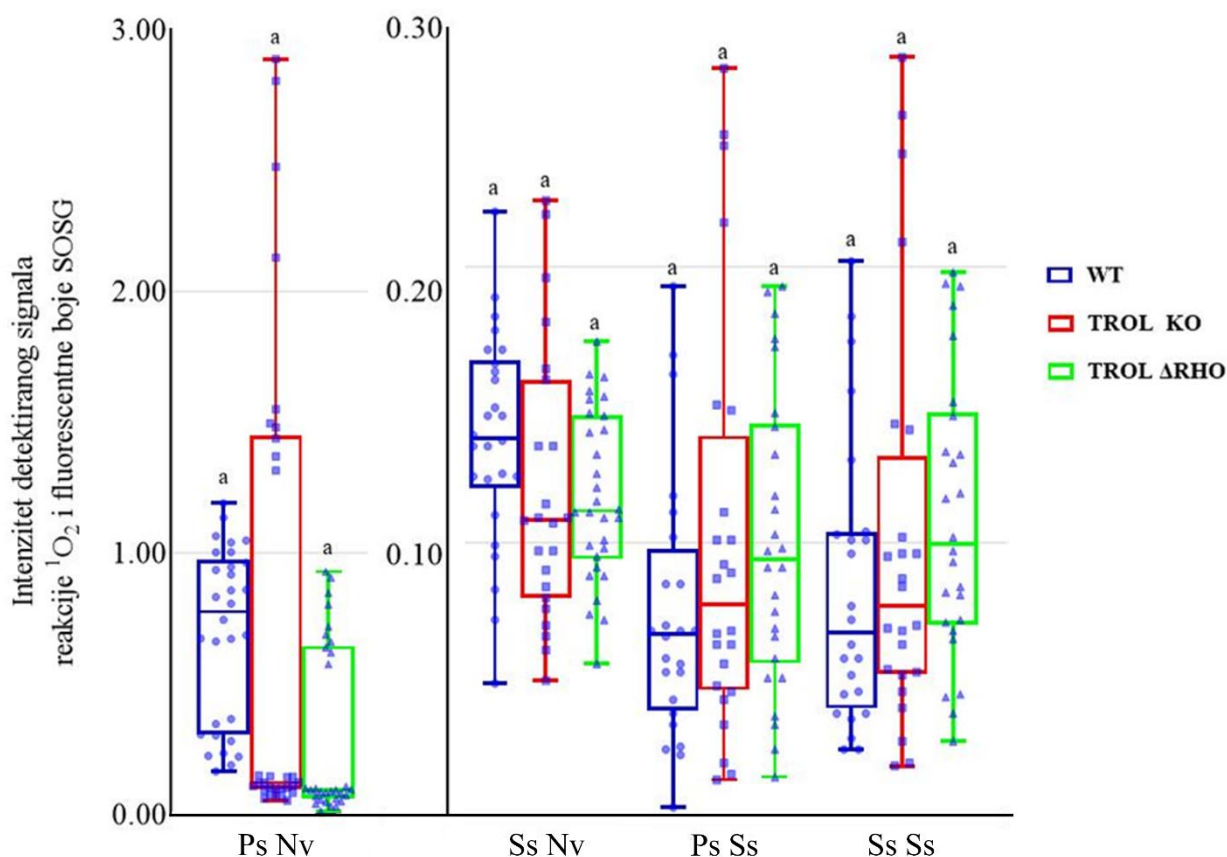


Slika 14. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje Spy-LHP konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne ekspirira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

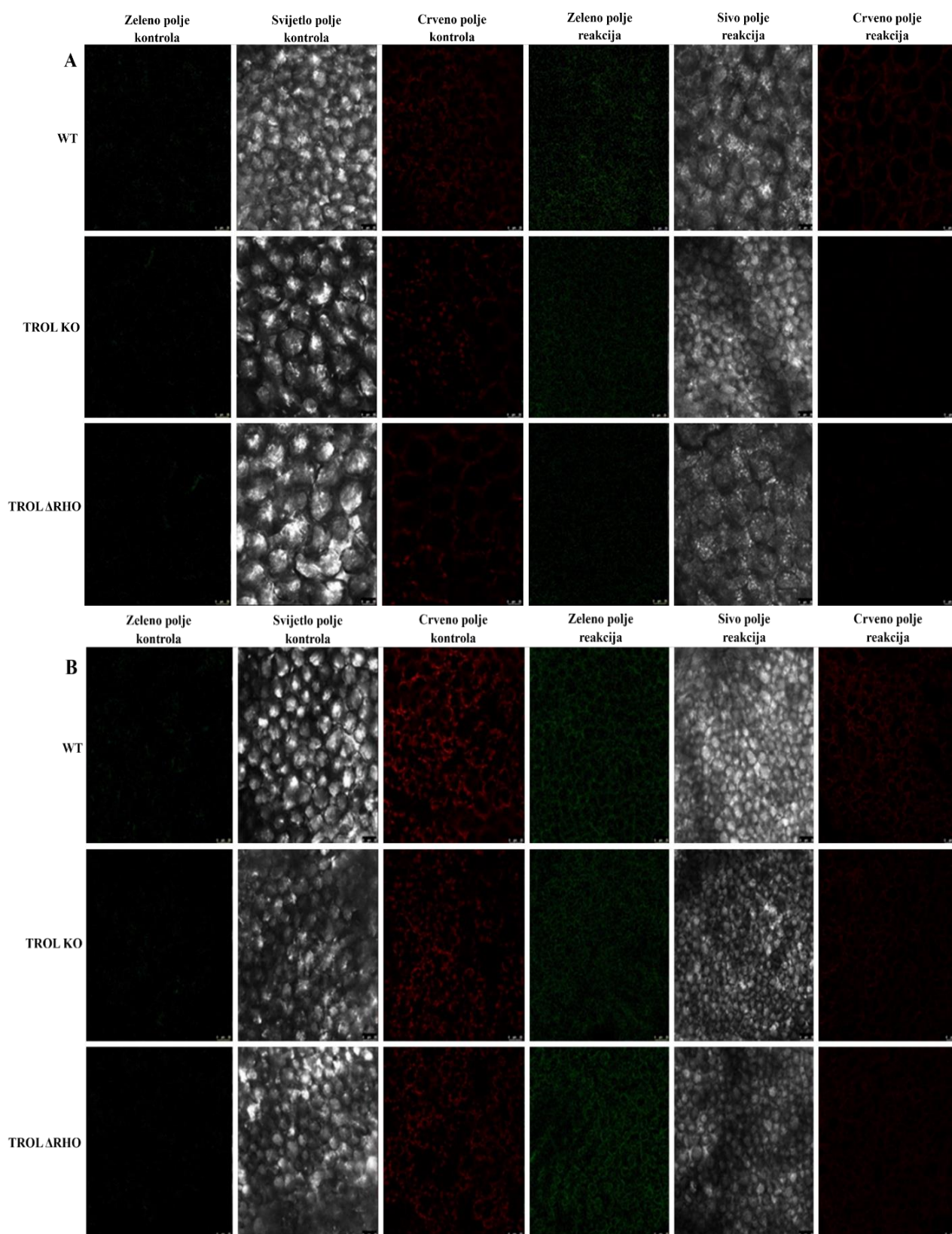


Slika 15. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje Spy-LHP konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* sa smanjenom ekspresijom proteina TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

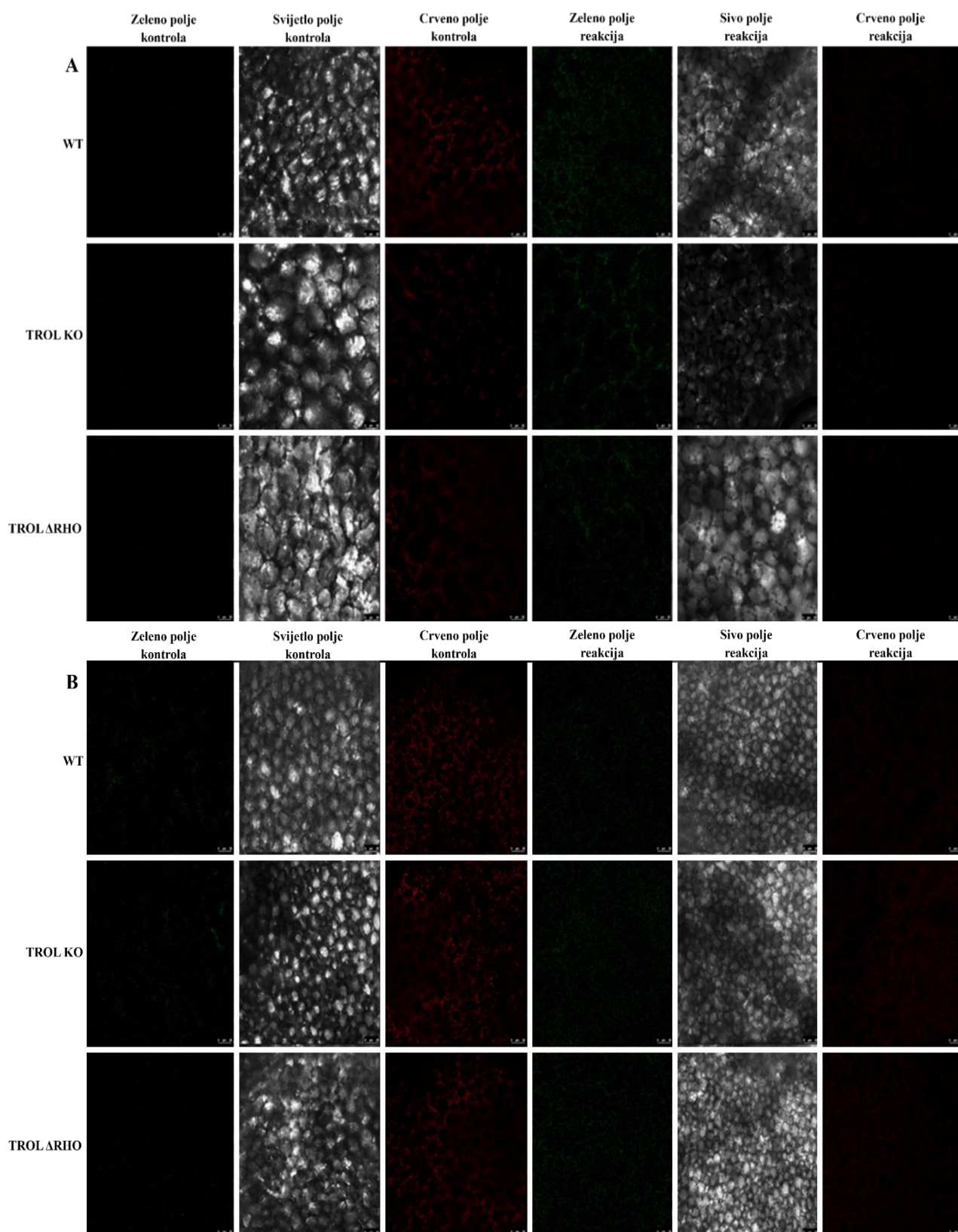
U slučaju $^1\text{O}_2$ došlo je do značajnog smanjenja signala u liniji TROL ΔRHO na prosijanom supstratu pri uvjetima normalne vlage u usporedbi s WT. Usporedbom pojedine linije pri različitim uvjetima uzgoja, sve tri linije pokazale su značajno povećanje signala na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi (Slike 16, 17, 18).



Slika 16. Jačina signala fluorescentne boje SOSG detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO . Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. SOSG – Singlet Oxygen Sensor Green, $^1\text{O}_2$ – singletni kisik, $\text{O}_2^{\cdot-}$ – superoksidni radikal, TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres. Zbog razlika vrijednosti detekcije signala i bolje preglednosti, grafovi su prikazani odvojeno.



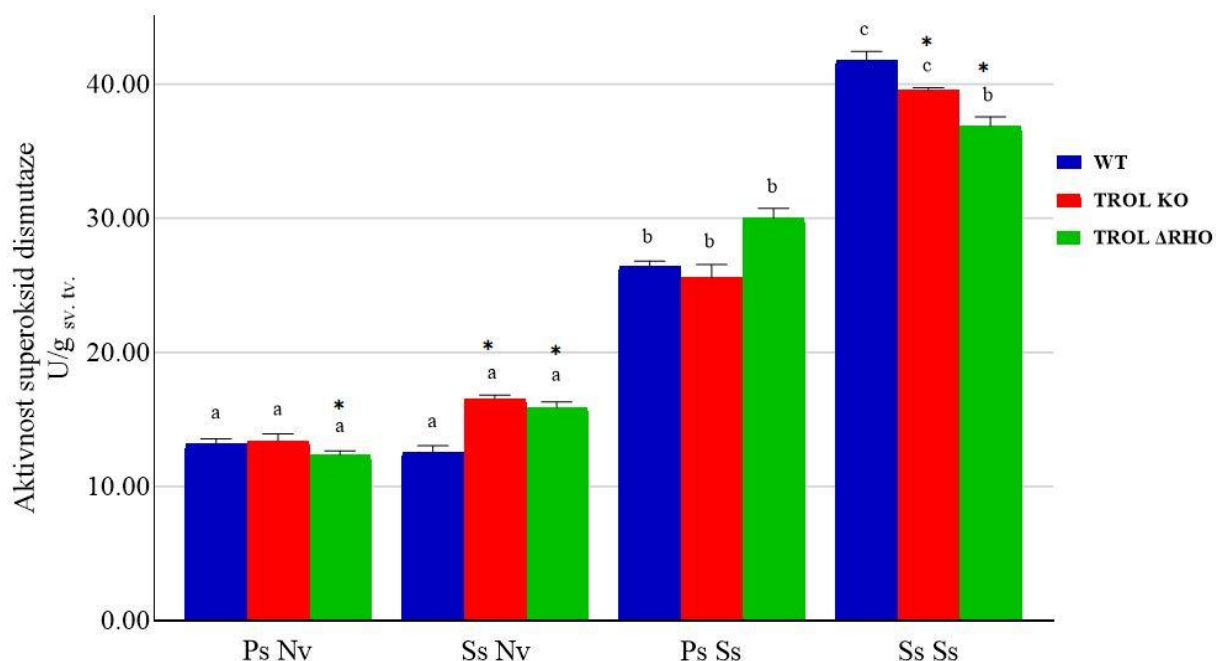
Slika 17. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje SOSG konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).



Slika 18. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje SOSG konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

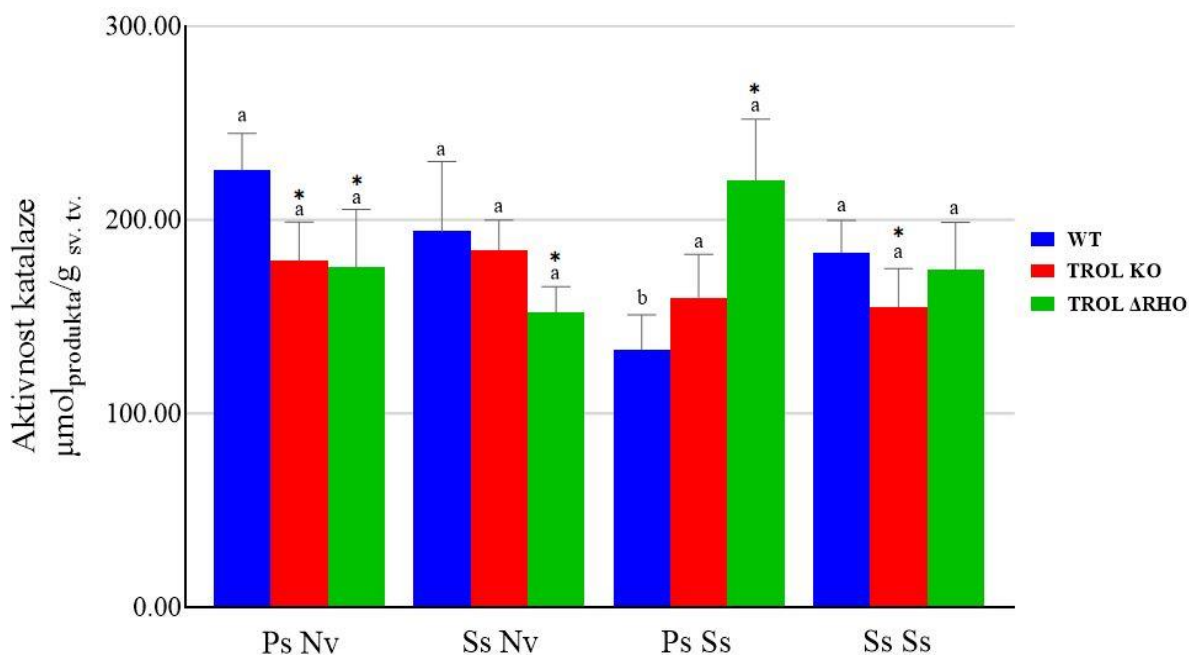
4.1.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima

Uočila sam znatne razlike u aktivnosti SOD-a u mutantnim linijama TROL KO i TROL Δ RHO u odnosu na WT. Znatno povećanje aktivnosti enzima uočila sam kod obje mutantne linije na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi. S druge strane, na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa mutantne linije pokazale su znatno smanjenje aktivnosti enzima. Znatno smanjenje aktivnosti enzima također sam uočila kod linije TROL Δ RHO na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi. Usporedbom linije WT pri različitim uvjetima uzgoja, uočila sam znatno povećanje aktivnosti SOD-a u uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu, pri čemu je povećane bilo izraženije na sušenom supstratu. Isti trend pojavio se i kod mutantnih linija. Aktivnost enzima bila je najveća na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa (Slika 19).



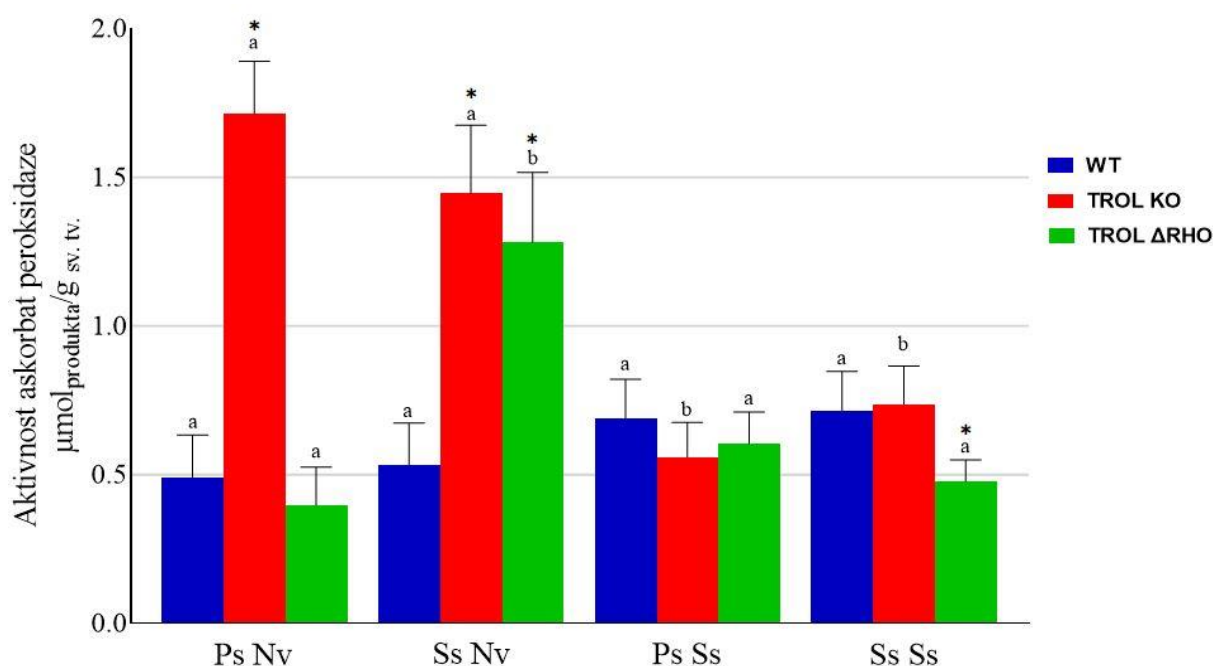
Slika 19. Aktivnost superoksid dismutaze u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju CAT, na oba uvjeta rasta pri normalnoj vlazi, došlo je do pada aktivnosti enzima kod mutanti u odnosu na WT, a nije bilo značajno samo u slučaju linije TROL KO na sušenom supstratu. Pad aktivnosti enzima, u odnosu na WT bio je prisutan i kod biljaka uzgajanih na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa, a značajan je bio kod linije TROL KO. S druge strane, na prosijanom supstratu došlo je do povećanja aktivnosti enzima, koje je bilo značajno kod linije TROL Δ RHO. Usporedbom linije WT pri različitim uvjetima uzgoja, značajan pad aktivnosti uočila sam na prosijanom supstratu pri uvjetima sušnog stresa (Slika 20).



Slika 20. Aktivnost katalaze u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

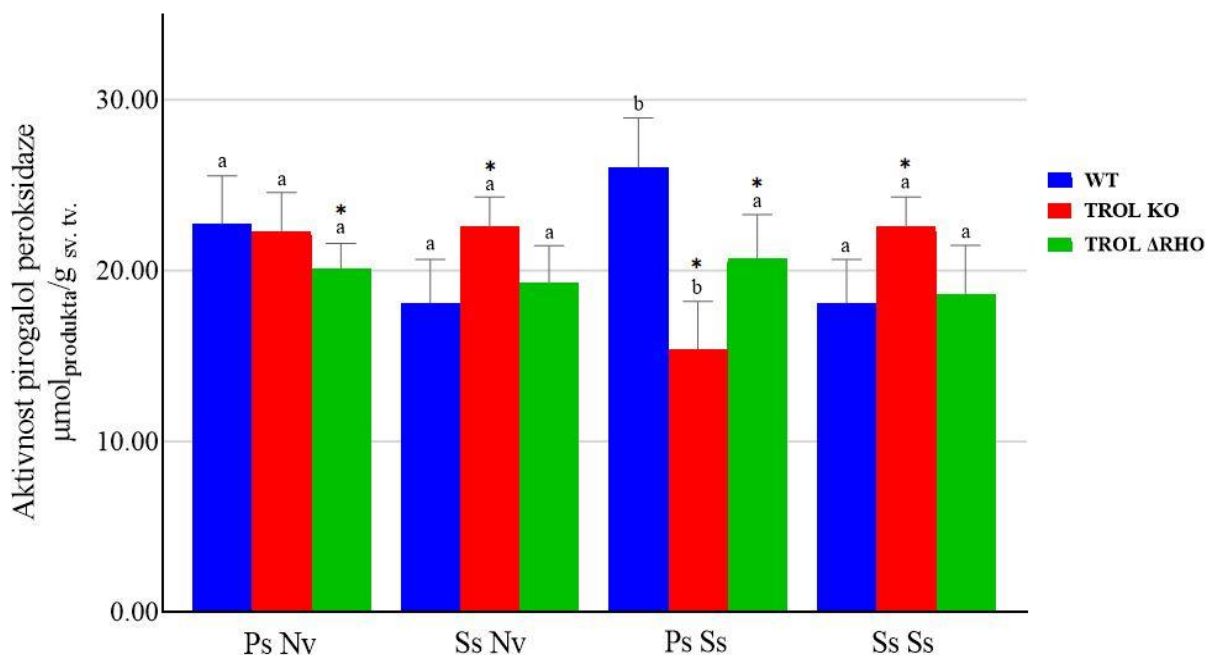
U slučaju APX, u usporedbi s WT-om, uočila sam znatno povećanje aktivnosti kod linije TROL KO na oba tipa supstrata pri normalnoj vlazi, a značajno povećanje sam uočila i kod linije TROL Δ RHO na sušenom supstratu. Na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa linija TROL Δ RHO pokazala je značajan pad aktivnosti enzima. Usporedbom biljaka linije TROL KO pri različitim uvjetima uzgoja, uočila sam značajan pad aktivnosti enzima pri uvjetima sušnog stresa u odnosu na uvjete normalne vlage. Linija TROL Δ RHO pokazala je porast aktivnosti enzima na prosijanom supstratu u uvjetima normalne vlage u usporedbi s ostalim uvjetima uzgoja (Slika 21).



Slika 21. Aktivnosti askorbat peroksidaze u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju PPX, kod linije TROL KO na sušenom supstratu pri oba uvjeta uzgoja uočila sam značajan porast aktivnosti enzima, dok sam na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa uočila značajno smanjenje aktivnosti enzima u odnosu na WT. Linija TROL Δ RHO na prosijanom supstratu pri oba uvjeta uzgoja pokazala je značajan pad aktivnosti enzima u usporedbi s WT. Usporedbom aktivnosti enzima u liniji TORL KO pri različitim uvjetima

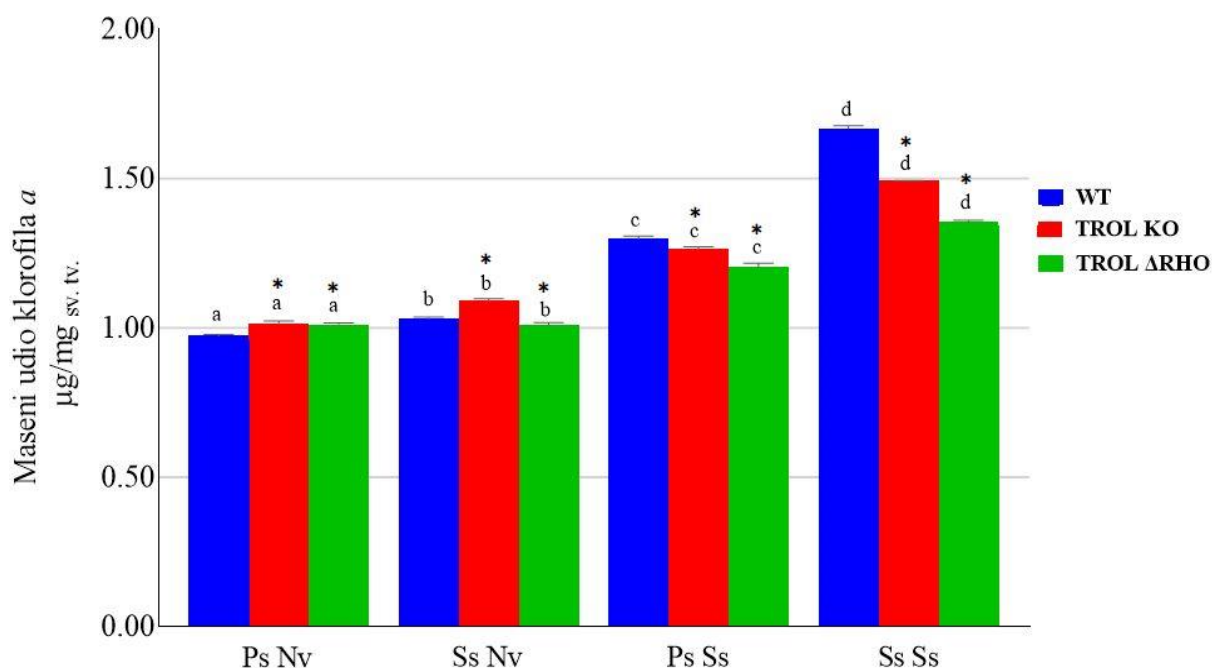
uzgoja, uočila sam značajan pad aktivnosti na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa, dok je linija WT u tim uvjetima pokazala porast aktivnosti (slika 22).



Slika 22. Aktivnosti pirogalol peroksidaze u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

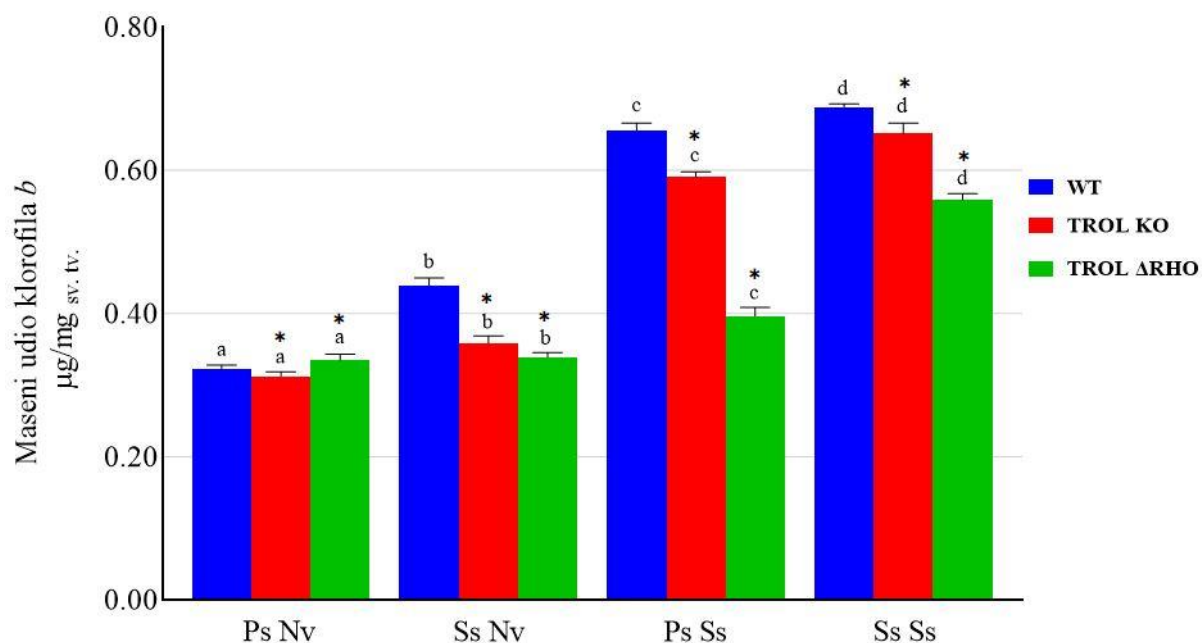
4.1.3. Udio fotosintetskih pigmenata

Spektrofotometrijskom analizom odredila sam udio fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida. Uočila sam da se udjeli klorofila *a* znatno razlikuju kod mutantnih linija TROL KO i TROL ΔRHO u odnosu na WT na svim tretmanima. Za mutantnu liniju TROL KO uočila sam povećanje udjela pri normalnoj vlazi, dok sam u uvjetima sušnog stresa uočila smanjenje udjela. Kod mutantne linije TROL ΔRHO, smanjenje udjela klorofila *a* bilo je prisutno u svim slučajevima osim na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi, gdje je došlo do povećanja udjela u usporedbi s WT-om. Također, među istim linijama značajno se razlikovao udio pigmenta između različitih uvjeta uzgoja, pri čemu je bio veći u uvjetima sušnog stresa (Slika 23).



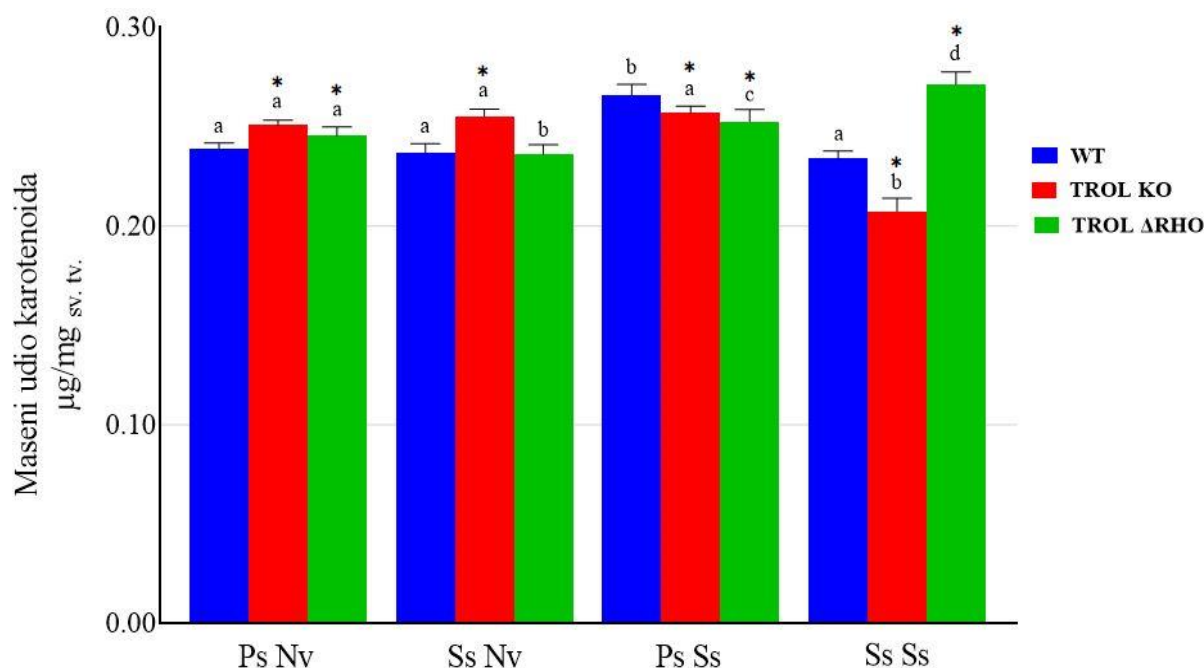
Slika 23. Maseni udio klorofila *a* u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Udjeli klorofila *b* također su se znatno razlikovali kod mutantnih linija TROL KO i TROL ΔRHO u odnosu na WT u svim tretmanima s tim da je mutantna linija TROL KO pokazala smanjenje udjela, dok je mutantna linija TROL ΔRHO smanjeni udio imala u svim tretmanima osim na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi (PsNv), gdje je vrijednost bila povećana. Među istim linijama značajno se razlikovao udio pigmenta s obzirom na različite uvjete uzgoja, pri čemu je bio veći u uvjetima sušnog stresa (Slika 24).



Slika 24. Maseni udio klorofila *b* u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Također, i udjeli ukupnih karotenoida znatno su se razlikovali kod mutantnih linija TROL KO i TROL ΔRHO u odnosu na WT. Za mutantnu liniju TROL KO razliku sam uočila kao povećanje udjela pri uvjetima normalne vlage na oba tipa supstrata, dok je u uvjetima sušnog stresa došlo do smanjenja udjela. Kod mutantne linije TROL ΔRHO razliku sam uočila kao smanjenje udjela na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa, dok je na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa došlo do povećanja udjela, isto kao u slučaju prosijanog supstrata u uvjetima normalne vlage. Kod linije WT došlo je do značajnog povećanja udjela ukuonih karotenoida na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa. Kod linije TROL KO značajan pad udjela uočila sam u uvjetima sušnog stresa na sušenom supstratu u odnosu na ostale uvjete uzgoja, dok je linija TROL ΔRHO pokazala značajne razlike pri svim uvjetima uzgoja, pri čemu je udio ukupnih karotenoida bio veći u uvjetima sušnog stresa (Slika 25).



Slika 25. Maseni udio ukupnih karotenoida u linijama WT, TROL KO i TROL ΔRHO. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), PsNv – prosijani supstrat i normalna vlaga, SsNv – sušeni supstrat i normalna vlaga, PsSs – prosijani supstrat i sušni stres, SsSs – sušeni supstrat i sušni stres.

Uočila sam i promjene udjela ukupnih klorofila, omjera klorofila *a* i klorofila *b*, te omjera ukupnih karotenoida i ukupnih klorofila s obzirom na uzgojne supstrate i uvjete uzgoja. Također, razlike su bile prisutne i između mutantnih linija i u usporedbi s WT-om. Linija TROL KO pokazala je značajno povećanje omjera klorofila u odnosu na WT na svim uvjetima uzgoja osim sušenog supstrata u uvjetima suše, gdje je omjer bio smanjen. Linija TROL ΔRHO pokazala je značajno povećan omjer u odnosu na WT na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi te na prosijanom supstratu u uvjetima suše. Između različitih uvjeta uzgoja linije WT i TROL KO pokazale su pad omjera klorofila u stresnim uvjetima suše na oba tipa supstrata, a linija TROL ΔRHO samo na sušenom supstratu. U uvjetima sušnog stresa omjer klorofila manji je nego pri uvjetima normalne vlage. Mutantne linije pokazale su pad ukupnog klorofila u odnosu na WT u svim uvjetima rasta osim na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi gdje su pokazale povećanje. Između različitih uvjeta uzgoja, jedinu razliku pokazala je mutantna linija TROL ΔRHO. U uvjetima sušnog stresa ukupni klorofil bio je veći nego pri normalnoj vlazi, što je bilo izraženije na sušenom supstratu. Što se tiče omjera ukupnih karotenoida i ukupnog

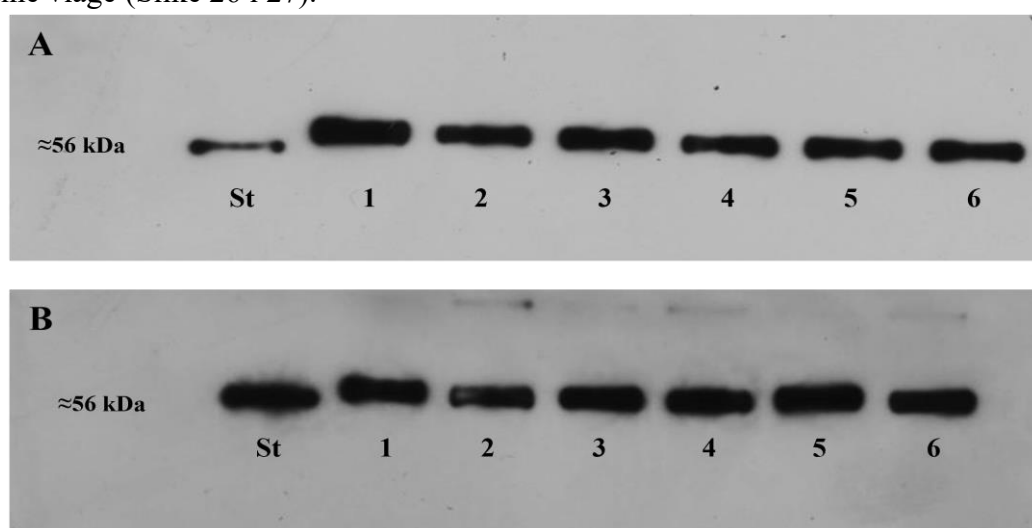
klorofila, linja TROL KO pokazala je povećanje u odnosu na WT pri uvjetima normalne vlage, dok je linija TROL Δ RHO pokazala povećanje u svim uvjetima rasta s iznimkom prosijanog supstrata pri normalnoj vlazi gdje nije bilo značajne razlike. Između različitih uzgojnih uvjeta, mogao se uočiti manji omjer pri uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu (Tablica 3).

Tablica 3. Omjeri fotosintetskih pigmenata i ukupni klorofil za linije WT, TROL KO i TROL Δ RHO na prosijanom i sušenom supstratu te normalnoj vlazi i uvjetima sušnog stresa. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Car – karotenoidi, Chl – klorofil, TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

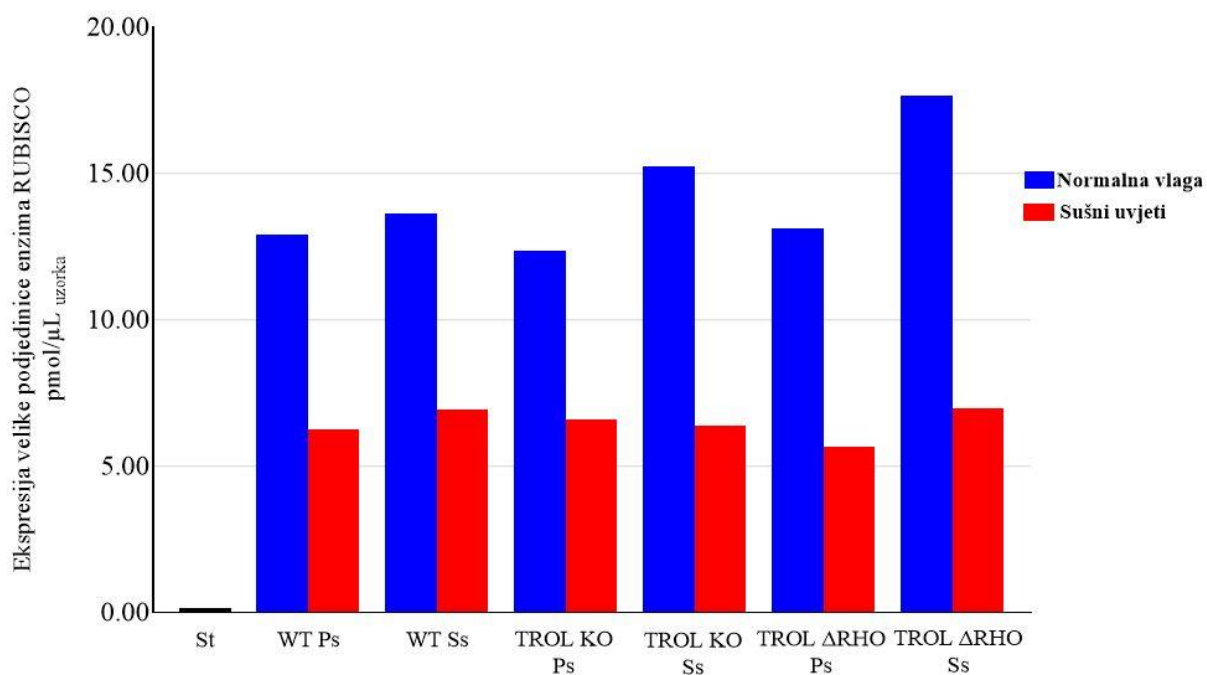
	Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>		Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i> μ g/mg		Car / (Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i>)	
Normalna vlaga						
WT prosijani supstrat	3,022 $\pm$ 0,05	a	1,295 $\pm$ 0,01	a	0,184 $\pm$ 0,01	a
TROL KO prosijani supstrat	3,236 $\pm$ 0,09	*	1,326 $\pm$ 0,01	*	0,189 $\pm$ 0,01	*
TROL Δ RHO prosijani supstrat	3,018 $\pm$ 0,08	a	1,346 $\pm$ 0,01	*	0,182 $\pm$ 0,01	a
WT sušeni supstrat	2,344 $\pm$ 0,07	b	1,468 $\pm$ 0,01	b	0,161 $\pm$ 0,01	b
TROL KO sušeni supstrat	3,036 $\pm$ 0,09	*	1,449 $\pm$ 0,01	*	0,176 $\pm$ 0,01	*
TROL Δ RHO sušeni supstrat	2,976 $\pm$ 0,06	*	1,348 $\pm$ 0,01	*	0,175 $\pm$ 0,01	*
Sušni stres						
WT prosijani supstrat	1,979 $\pm$ 0,04	c	1,954 $\pm$ 0,01	c	0,136 $\pm$ 0,01	c
TROL KO prosijani supstrat	2,137 $\pm$ 0,03	*	1,854 $\pm$ 0,01	*	0,139 $\pm$ 0,01	c
TROL Δ RHO prosijani supstrat	3,035 $\pm$ 0,1	*	1,598 $\pm$ 0,01	*	0,158 $\pm$ 0,01	*
WT sušeni supstrat	2,424 $\pm$ 0,02	d	2,356 $\pm$ 0,01	d	0,099 $\pm$ 0,01	d
TROL KO sušeni supstrat	2,290 $\pm$ 0,05	*	2,142 $\pm$ 0,01	*	0,097 $\pm$ 0,01	d
TROL Δ RHO sušeni supstrat	2,422 $\pm$ 0,04	b	1,913 $\pm$ 0,01	*	0,142 $\pm$ 0,01	*

4.1.4. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO

Westernskom metodom otiska utvrdila sam ekspresiju velike podjedinice enzima RUBISCO u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Pomoću zabilježene razlike u jačini intenziteta obojenja proteinske vrpce standarda poznate koncentracije velike podjedinice enzima RUBISCO i uzoraka odredila sam razlike u ekspresiji velike podjedinice enzima RUBISCO. Kvantifikacija je pokazala jaču ekspresiju velike podjedinice enzima RUBISCO pri uvjetima normalne vlage u odnosu na uvjete sušnog stresa. Mutantne linije pokazale su veću ekspresiju na sušenom supstratu pri uvjetima normalne vlage u odnosu na prosijani supstrat. Također, ekspresija je bila manja na prosijanom supstratu nego na sušenom u odnosu na WT u uvjetima normalne vlage (Slike 26 i 27).



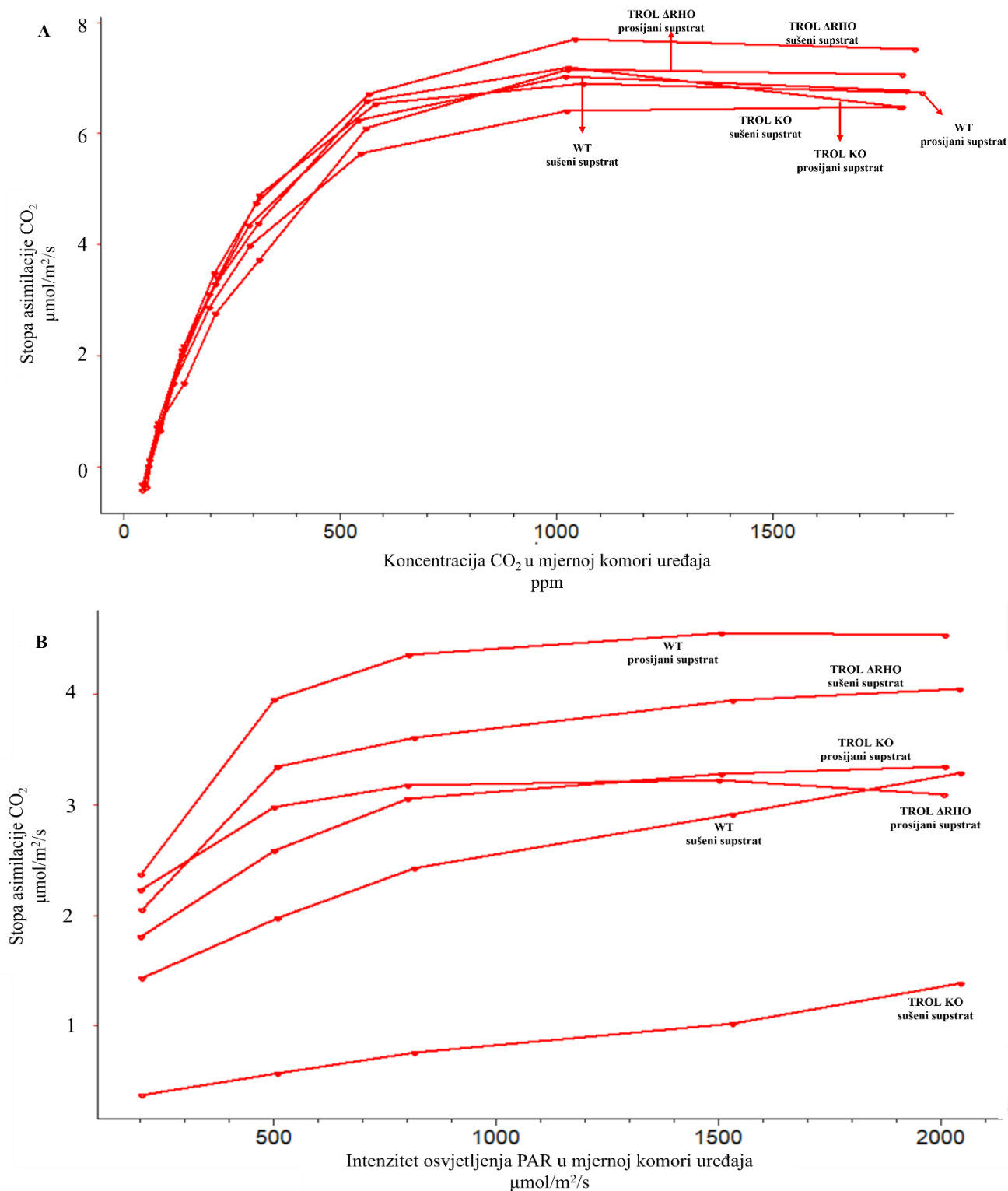
Slika 26. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. A) normalna vlaga; B) uvjeti sušnog stresa. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l, a uzorka 2 μ l. St – standard poznate koncentracije velike podjedinice enzima RUBISCO, 1 – TROL Δ RHO sušeni supstrat, 2 – TROL Δ RHO prosijani supstrat, 3 – TROL KO sušeni supstrat, 4 – TROL KO prosijani supstrat, 5 – WT sušeni supstrat, 6 – WT prosijani supstrat.



Slika 27. Kvantifikacija intenziteta obojenja u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Prikazane su kvantificirane vrijednosti pruga dobivenih na filmu. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l (0,75 pmol), a uzorka 2 μ l. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne ekspirira protein TORL, TROL Δ RHO – mutanta TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps – prosijani supstrat, Ss – sušeni supstrat, RUBISCO – ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza.

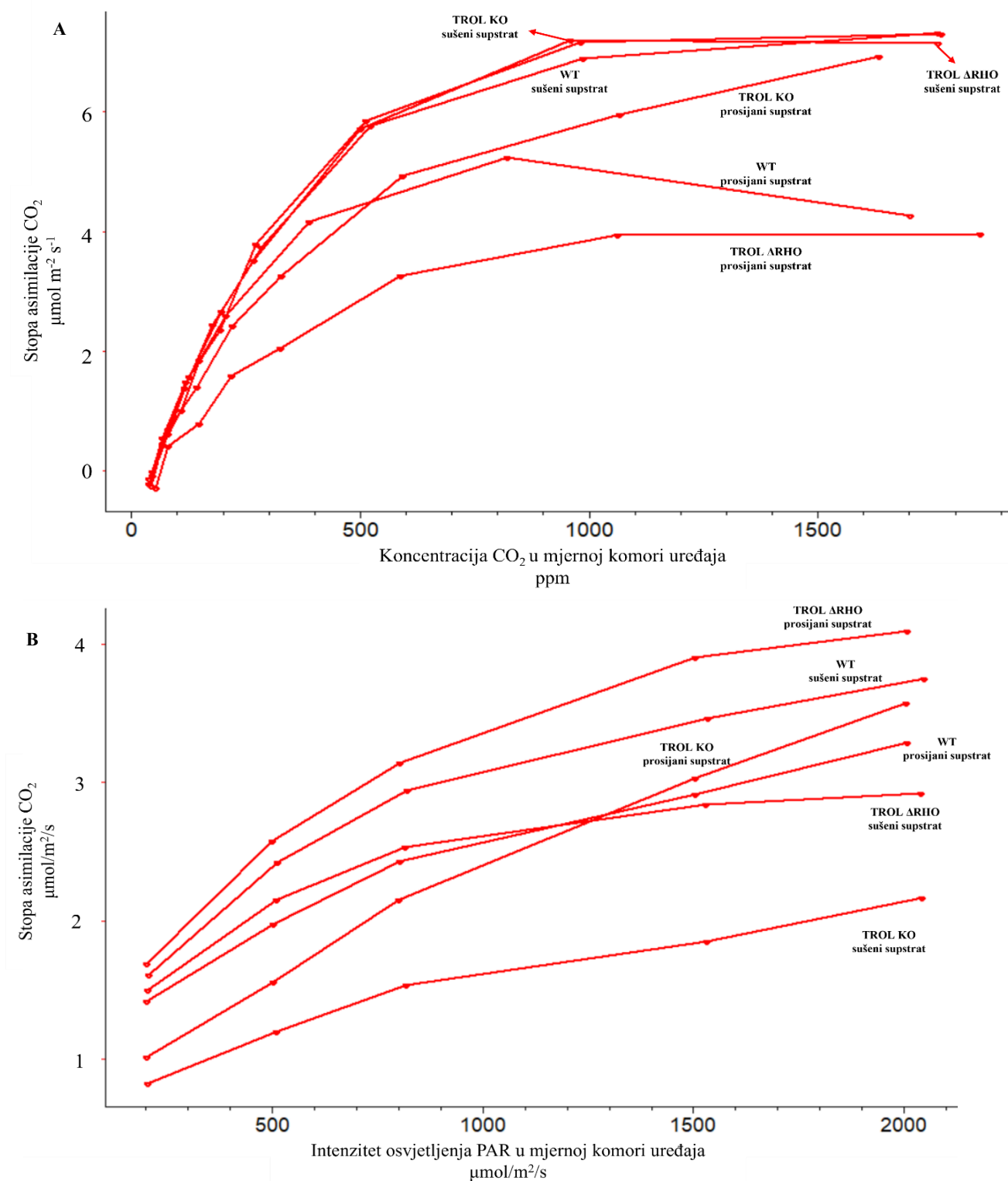
4.1.5. Promjene parametara fotosintetske izmjene plinova

Kod mjerenja stope asimilacije CO_2 u biljkama, u ovisnosti o različitim koncentracijama CO_2 (500, 1000, 1500, 1750 ppm CO_2) u mjernoj komori uređaja, pri uzgoju u uvjetima normalne vlage, mutantna linija TROL Δ RHO pokazala je veću, a TROL KO manju stopu asimilacije CO_2 u odnosu na WT na oba tipa supstrata. Maksimalna stopa asimilacije CO_2 za sve linije bila je postignuta pri koncentraciji $\text{CO}_2 \approx 1000$ ppm u mjernoj komori uređaja, nakon čega je uglavnom uslijedio pad stope asimilacije CO_2 , koji je bio najizraženiji u liniji TROL KO na prosijanom supstratu (Slika 28, A). Kod mjerenja stope asimilacije CO_2 u biljkama, u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja (PAR 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) u mjernoj komori uređaja, pri uzgoju u uvjetima normalne vlage, najnižu vrijednost stope asimilacije CO_2 pokazala je linija TROL KO na sušenom supstratu, ali nije pokazala pad stope asimilacije CO_2 . Pad stope asimilacije CO_2 pokazala je samo linija TROL Δ RHO na prosijanom supstratu pri intenzitetima osvjetljenja višima od 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Na prosijanom supstratu obje mutantne linije imale su manju vrijednost stope asimilacije CO_2 u odnosu na WT, dok je na sušenom supstratu linija TROL KO imala manju, a linija TROL Δ RHO veću stopu asimilacije CO_2 (Slika 28, B).



Slika 28. Izmjerena stopa asimilacije CO₂ u ovisnosti o A) različitim koncentracijama CO₂; B) različitim intenzitetima osvjjetljenja za linije WT, TROL KO i TROL ΔRHO na prosijanom i sušenom supstratu u uvjetima normalne vlage. Navedene vrijednosti koncentracije CO₂ ppm i intenziteta osvjjetljenja (PAR (*eng. photosynthetically active radiation*) μmol/m²/s) na osi X odnose se na uvijete u mjernoj komori uređaja GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Točke na grafu prikazuju prosječne vrijednosti mjerenja stope asimilacije CO₂ na tri različite biljne replike. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta linija TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

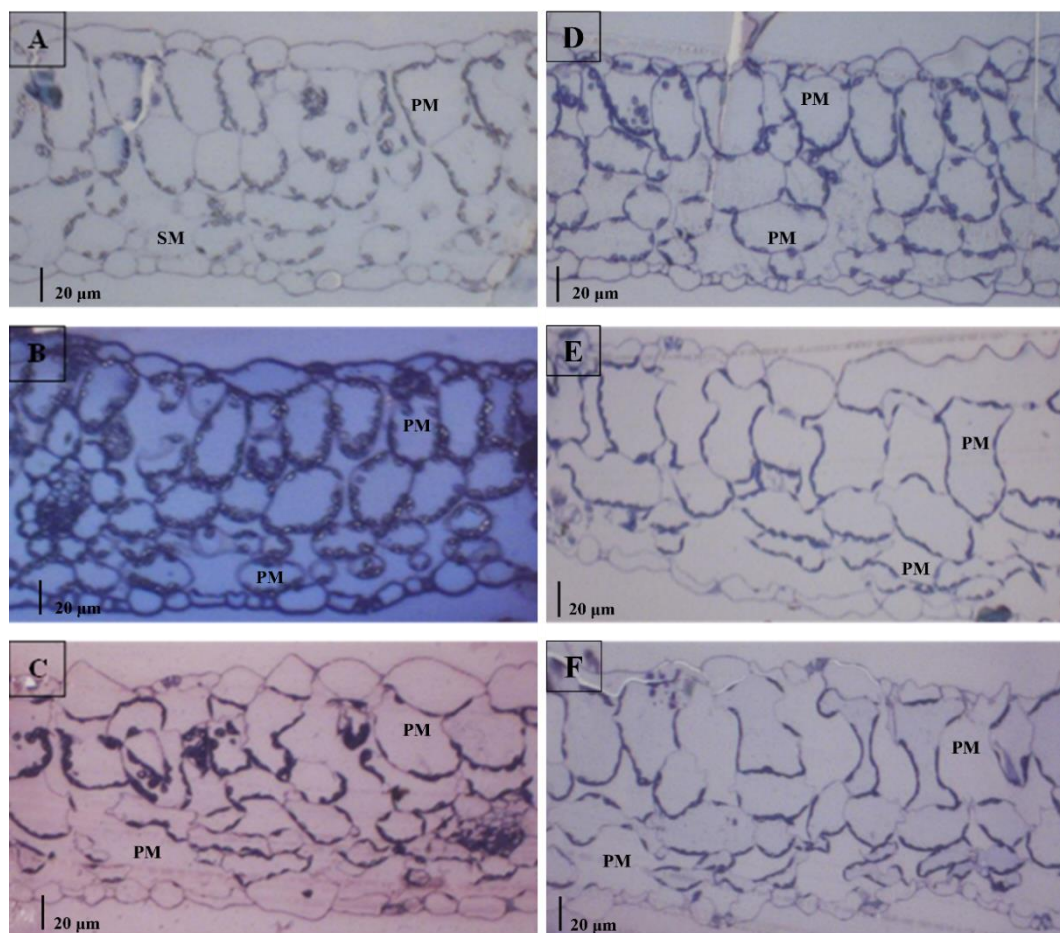
Kod mjerenja stope asimilacije CO₂ u biljkama, u ovisnosti o različitim koncentracijama CO₂ u mjernoj komori uređaja, pri uvjetima sušnog stresa, linija TROL ΔRHO imala je manju, a linija TROL KO veću stopu asimilacije CO₂ od WT na prosijanom supstratu, pri čemu mutantne linije nisu pokazale pad stope asimilacije CO₂. Na sušenom supstratu obje mutantne linije pokazale su nešto veću stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT, pri čemu je linija TROL ΔRHO pokazala pad vrijednosti stope asimilacije CO₂ kada je koncentracija CO₂ u mjernoj komori uređaja bila viša od ≈1000 ppm. Biljke na prosijanom supstratu generalno su imale manju stopu asimilacije CO₂ u odnosu na biljke na sušenom supstratu (Slika 29, A). Kod mjerenja stope asimilacije CO₂ u biljkama, u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja u mjernoj komori uređaja, u uvjetima sušnog stresa, najmanju stopu asimilacije CO₂ imala je linija TROL KO na sušenom supstratu. Na oba tipa supstrata obje mutantne linije imale su manju stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT te nijedna linija nije pokazala pad vrijednosti stope asimilacije CO₂ (Slika 29, B). Usporedbom biljaka uzgajanih na normalnoj vlazi i u uvjetima sušnog stresa, stopa asimilacije CO₂ bila je manja u uvjetima sušnog stresa pri različitim koncentracijama CO₂ u mjernoj komori uređaja. Pri mjerenju stope asimilacije CO₂ u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja, biljke su pokazale podjednaku stopu asimilacije CO₂ na oba uvjeta uzgoja (Slike 28 i 29).



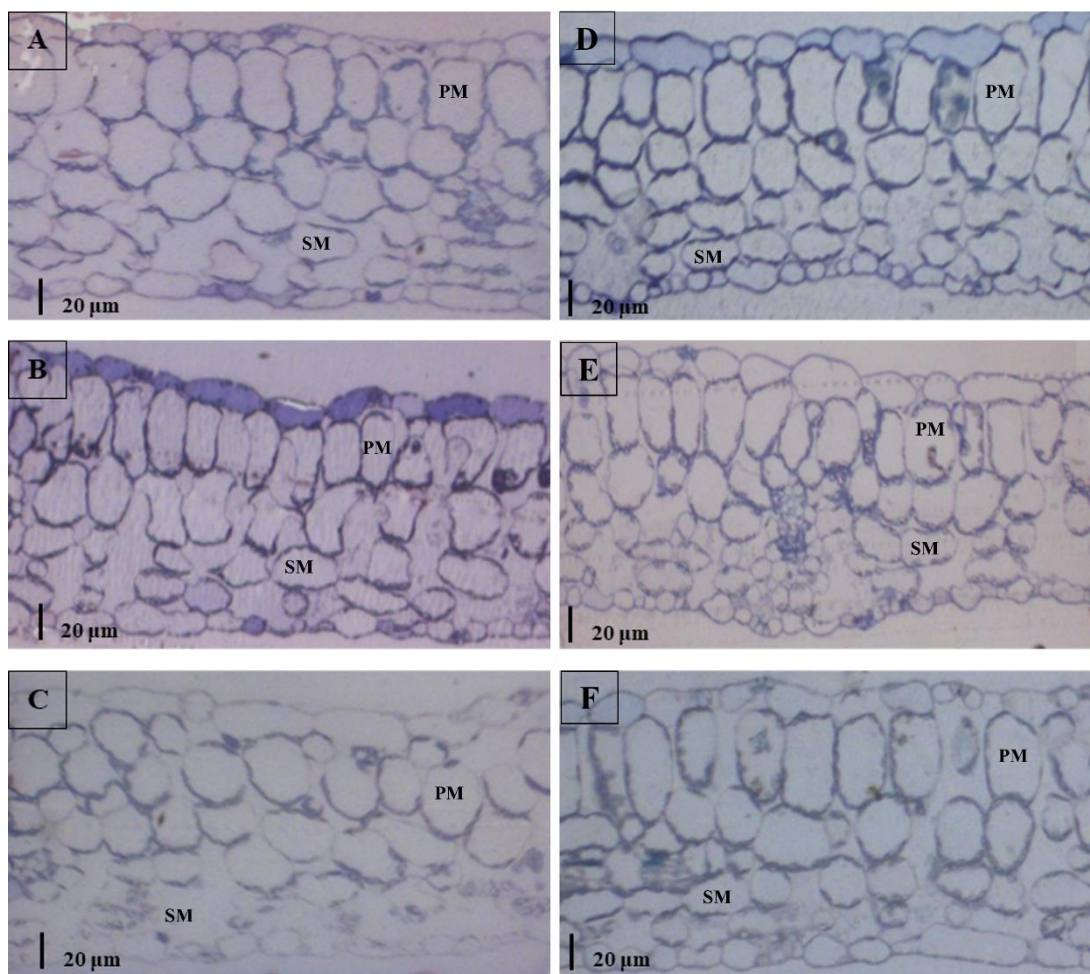
Slika 29. Izmjerena stopa asimilacije CO₂ u ovisnosti o A) različitim koncentracijama CO₂; B) različitim intenzitetima osvjetljenja za linije WT, TROL KO i TROL ΔRHO na prosijanom i sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. Navedene vrijednosti koncentracije CO₂ ppm i intenziteta osvjetljenja (PAR (*eng. photosynthetically active radiation*) μmol/m²/s) na osi X odnose se na uvijete u mjernoj komori uređaja GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Točke na grafu prikazuju prosječne vrijednosti mjerenja stope asimilacije CO₂ na tri različite biljne replike. TROL KO – mutanta TROL *knoc kout* koja ne eksprimira protein TORL, TROL ΔRHO – mutanta linija TROL s delecijom 13 AK domene RHO, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

4.1.6. Promjene u anatomiji lista

Promatranjem poludebelih prereza lista invertnim svjetlosnim mikroskopom uočila sam razlike strukture palisadnog i spužvastog mezofila lista. Pri uvjetima normalne vlage kod linije TROL Δ RHO uočila sam nepravilne stanice mezofila na oba tipa uzgojnog supstrata, dok je kod linije TROL KO to bio slučaj samo na sušenom supstratu. U obje mutantne linije biljaka uzgajanih na sušenom supstratu uočila sam kloroplaste koji su bili sitniji i prisutni u manjem broju u odnosu na WT i na mutantne linije uzgajane na prosijanom supstratu. Stanice spužvastog mezofila su bile manje na oba tipa supstrata kod mutantnih linija u usporedbi s WT-om koji ima normalno razvijen mezofil (Slika 30). U uvjetima sušnog stresa u spužvastom mezofilu lista bilo je manje međustaničnog prostora, te su stanice bile manje i zbijenije kod sve tri linije na oba tipa supstrata u usporedbi s uvjetima normalne vlage. U liniji TROL Δ RHO, na prosijanom supstratu stanice palisadnog mezofila lista bile su okruglaste, dok stanice linije TROL KO pokazuju manje nepravilnosti (Slika 31).



Slika 30. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Normalna vlaga A) WT prosijani supstrat; B) TROL KO prosijani supstrat; C) TROL Δ RHO prosijani supstrat; D) WT sušeni supstrat; E) TROL KO sušeni supstrat; F) TROL Δ RHO sušeni supstrat. PM – palisadni mezofil, SM – spužvasti mezofil. Mjerna oznaka 20 μ m.

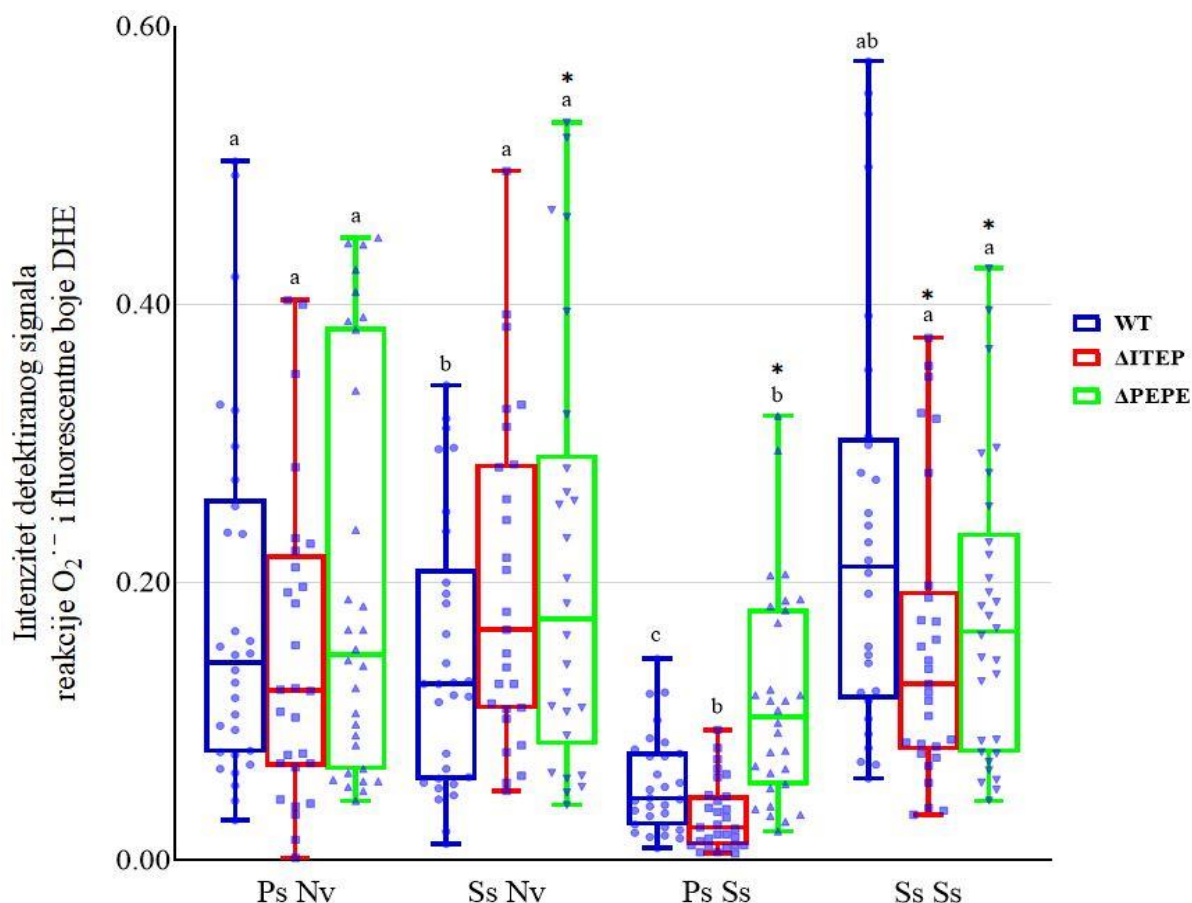


Slika 31. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista u linijama WT, TROL KO i TROL Δ RHO. Sušni stres A) WT prosijani supstrat; B) TROL KO prosijani supstrat; C) TROL Δ RHO prosijani supstrat; D) WT sušeni supstrat; E) TROL KO sušeni supstrat; F) TROL Δ RHO sušeni supstrat. PM – palisadni mezofil, SM – spužvasti mezofil. Mjerna oznaka 20 μ m.

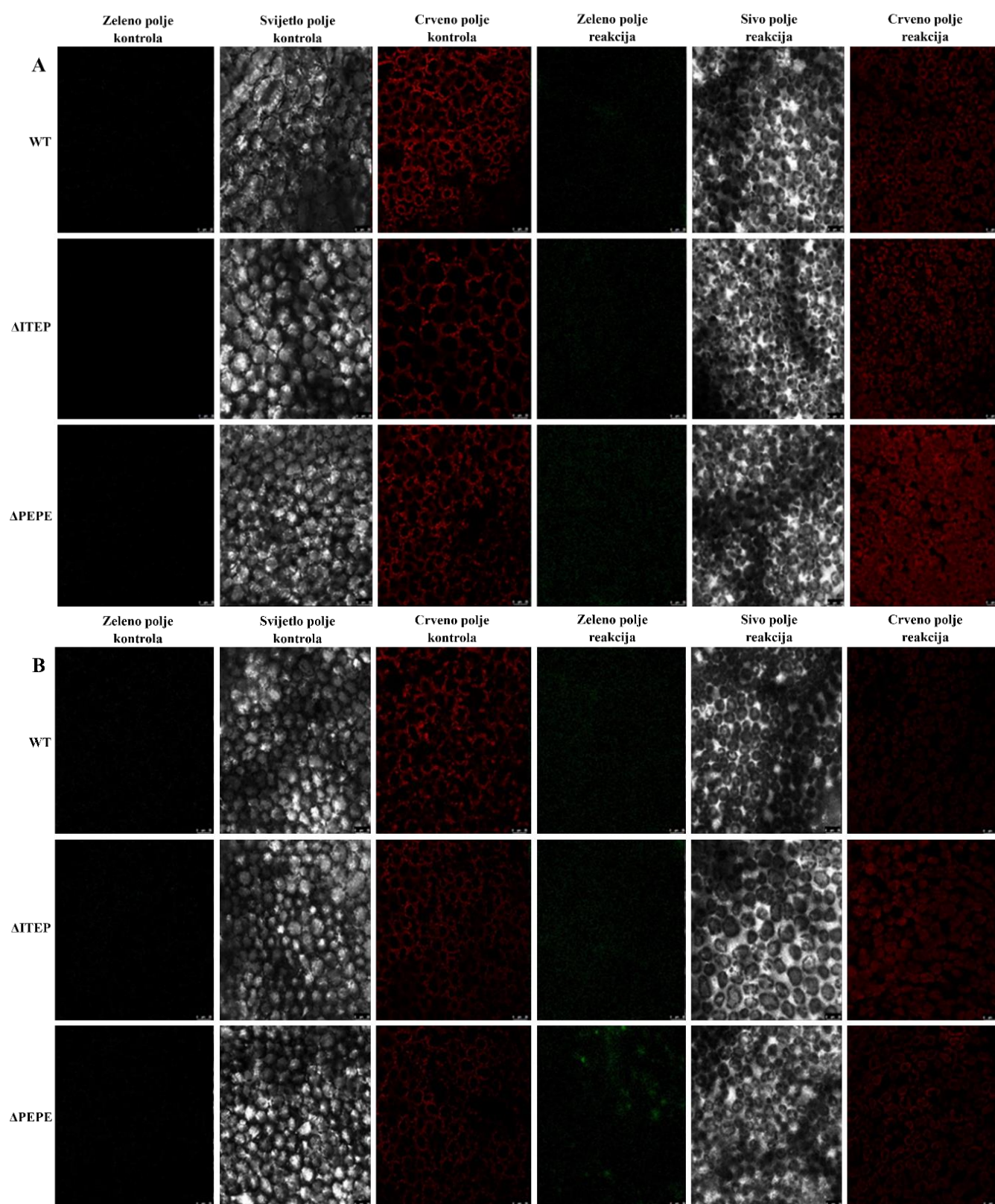
4.2. Funkcionalna analiza utjecaja delecije domena ITEP i PEPE na interakciju FNR-a i strukturnu dinamiku proteina TROL tijekom sušnog stresa

4.2.1. Utjecaj sušnog stresa na akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta

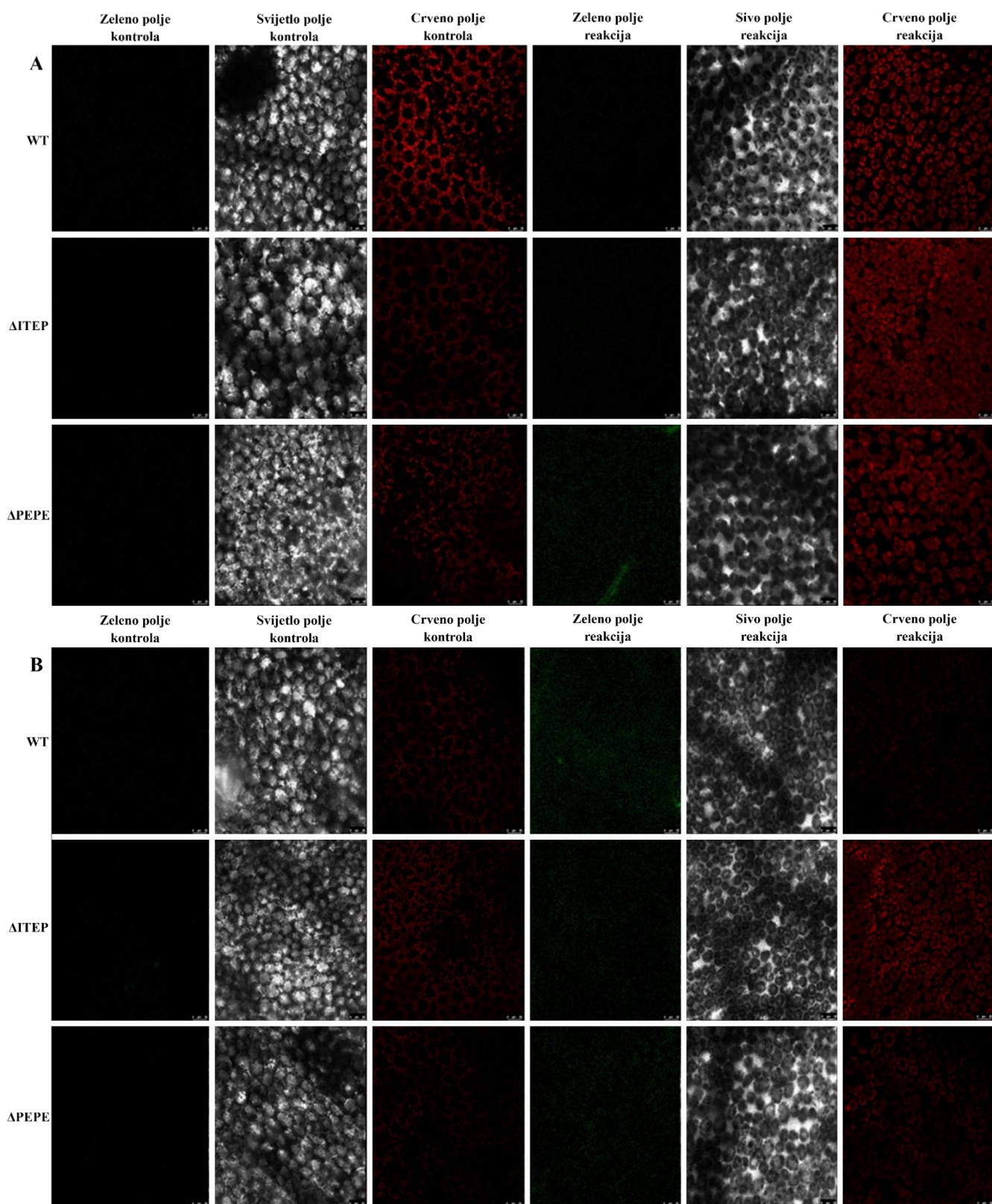
Do značajnog smanjenja signala $O_2^{\cdot-}$ došlo je u biljaka uzgajanih na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa kod obje mutantne linije. Do značajnog povećanja signala došlo je kod linije Δ PEPE na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi i na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na WT. Međusobnom usporedbom linija uočila sam kod obje mutantne linije značajan pad signala na prosijanom supstratu pri uvjetima sušnog stresa. To je bio slučaj i kod linije WT, koja se dodatno razlikovala i pri ostalim uzgojnim uvjetima (Slike 32, 33, 34).



Slika 32. Jačina signala fluorescentne boje DHE detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. DHE – dihidroetidij, $O_2^{\bullet-}$ – superoksidni radikal, Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

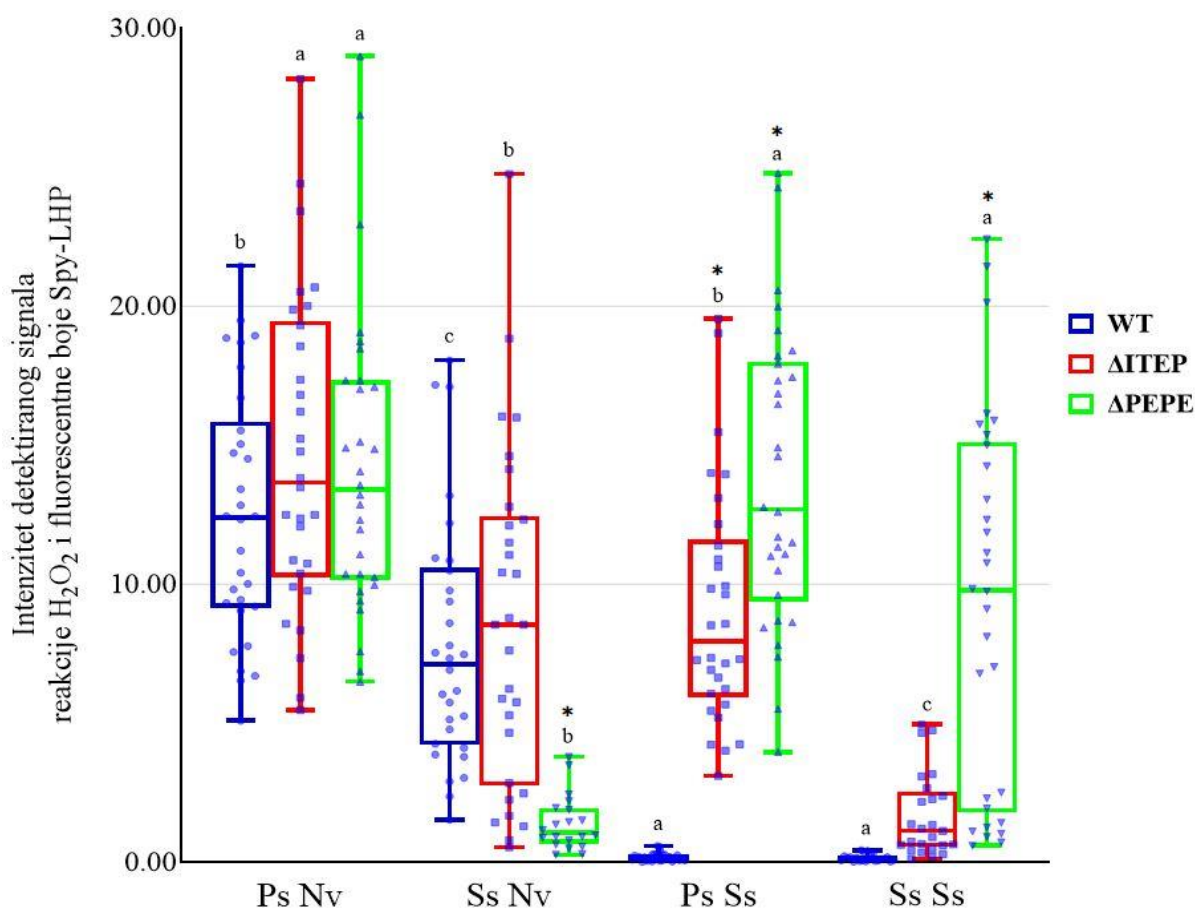


Slika 33. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje DHE konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

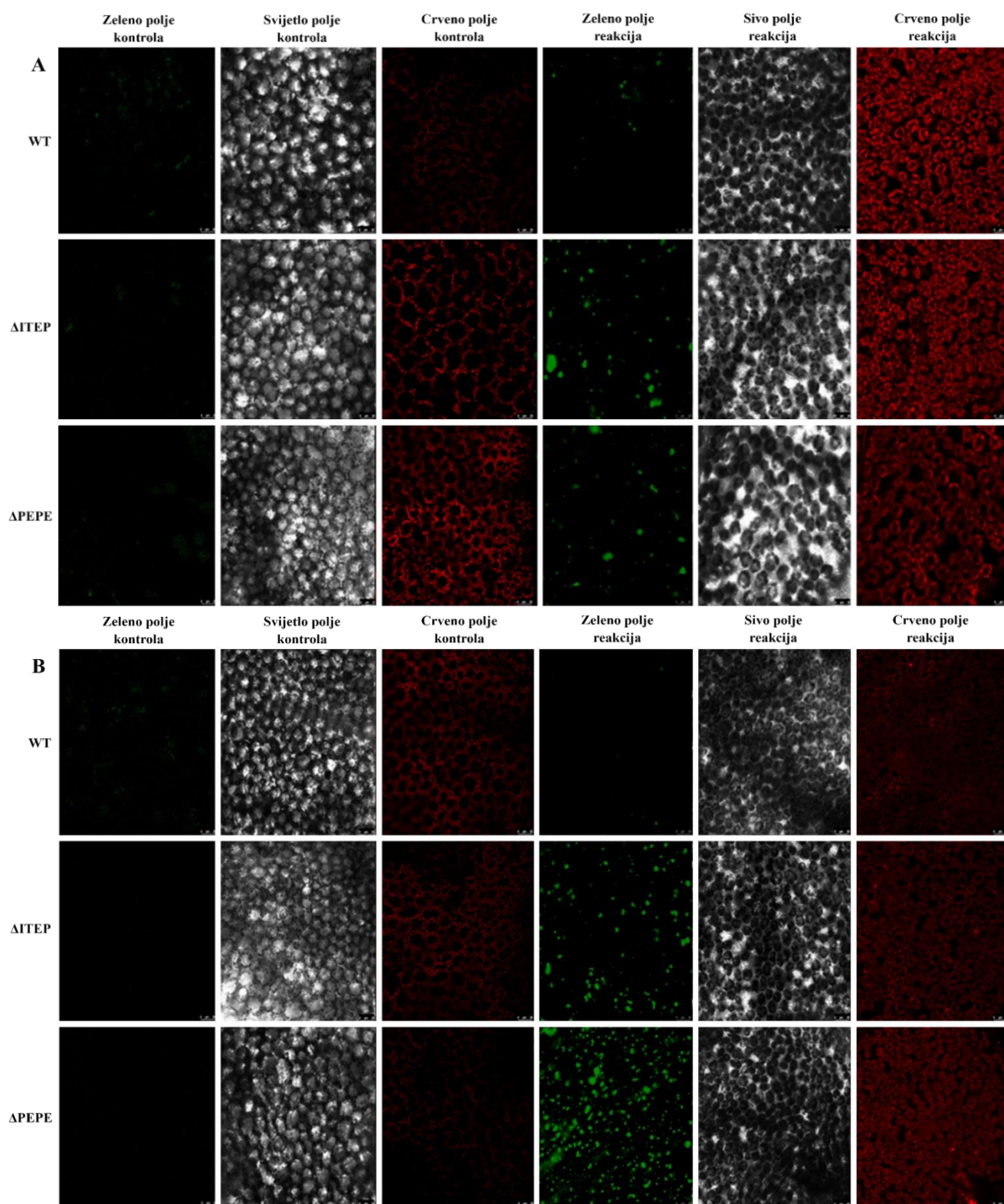


Slika 34. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje DHE konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

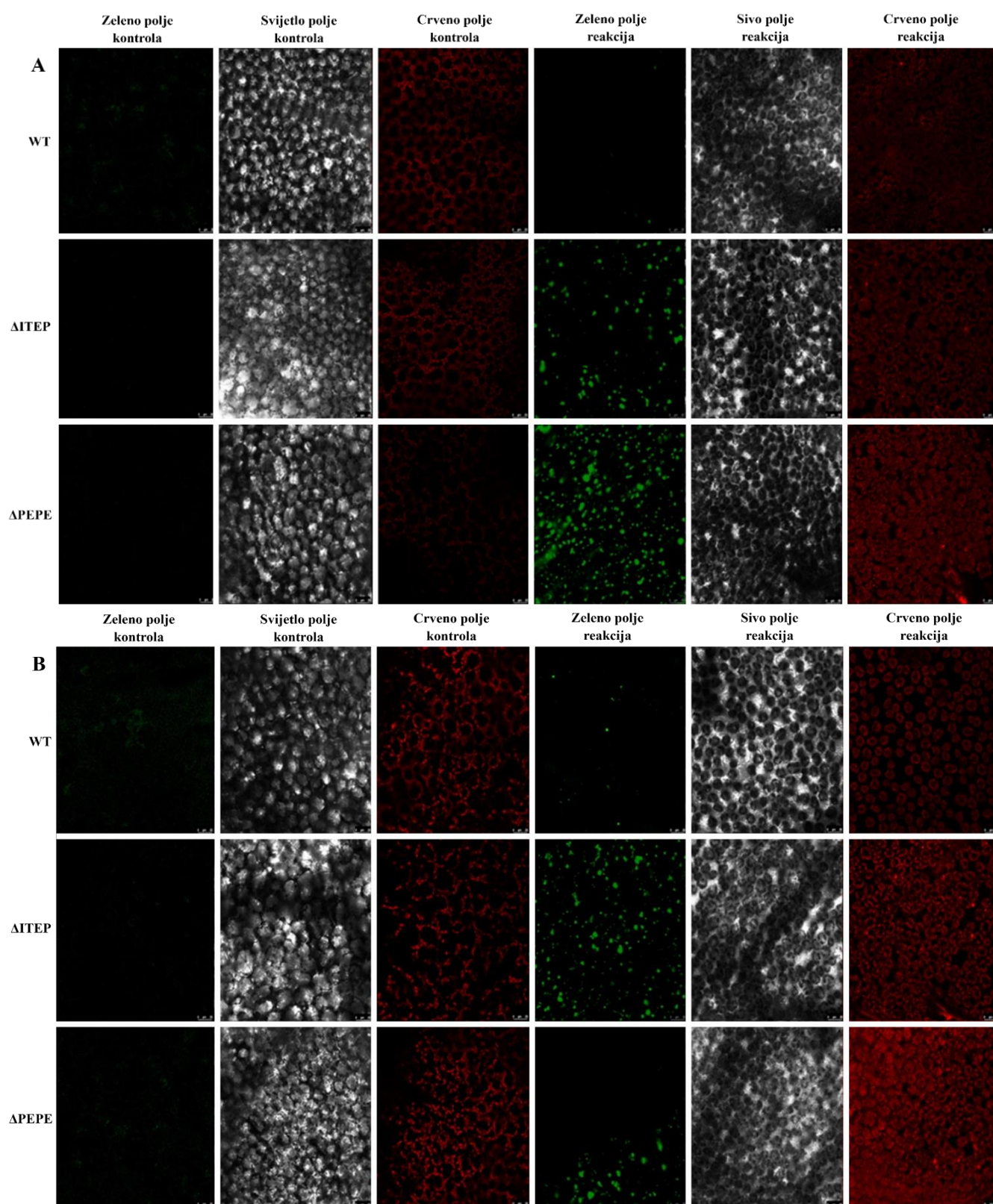
U slučaju H_2O_2 , u uvjetima sušnog stresa došlo je do značajnog povećanja signala na prosijanom supstratu kod obje mutantne linije, a na sušenom supstratu do povećanja je došlo samo kod linije Δ PEPE, u odnosu na WT. Međusobnom usporedbom linija na različitim uzgojnim supstratima uočila sam razliku između linija WT na različitim supstratima pri normalnoj vlazi, te u odnosu na uvjete sušnog stresa. Kod linije Δ ITEP uočila sam razlikovanje signala na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi i sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa međusobno i u odnosu na ostale uvjete uzgoja. Linija Δ PEPE pokazala je značajno smanjenje signala na sušenom supstratu pri uvjetima normalne vlage u odnosu na ostale uvjete uzgoja (Slike 35, 36, 37).



Slika 35. Jačina signala fluorescentne boje Spy-LHP detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka. $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Spy-LHP – eng. *swallow-tailed perylene derivative for detecting lipid hydroperoxides*, H_2O_2 – vodikov peroksid, $O_2^{\cdot -}$ – superoksidni radikal, Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (eng. *wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

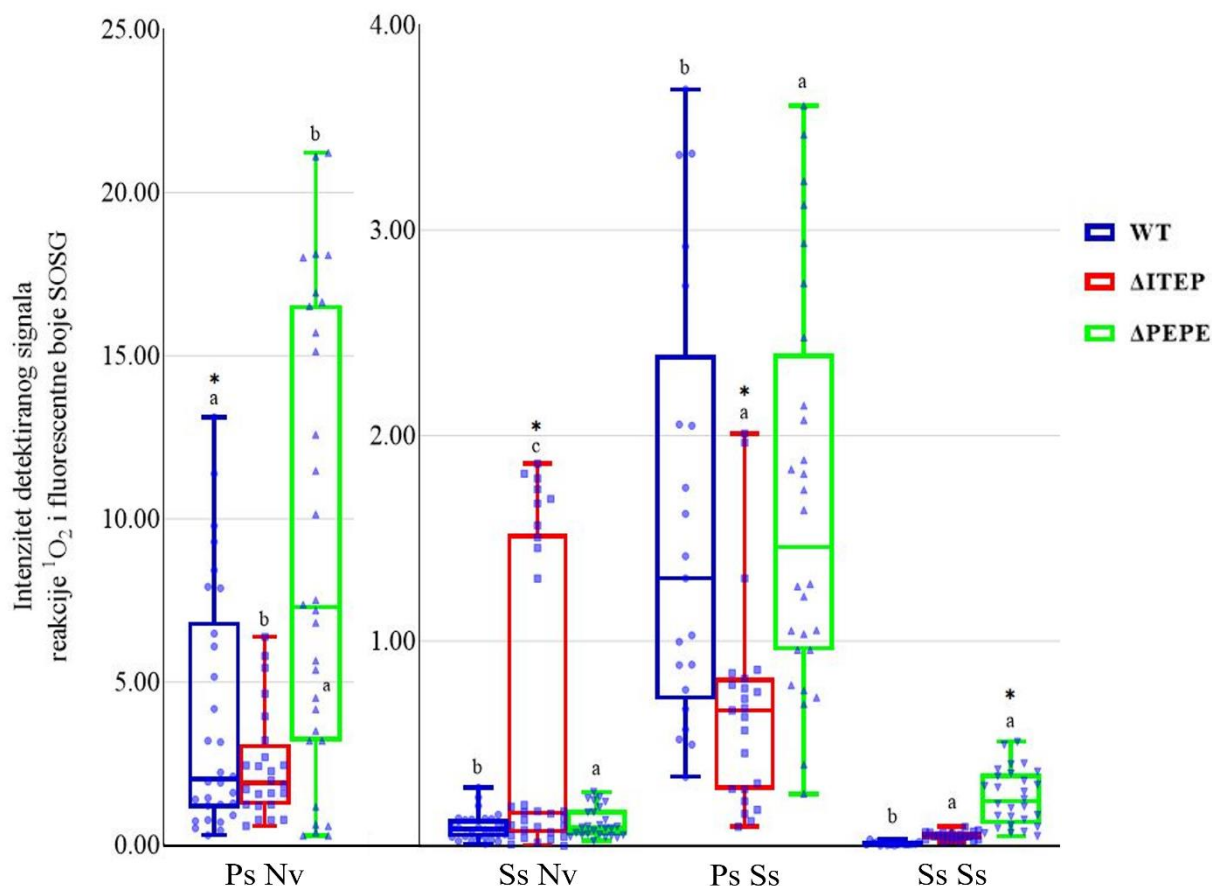


Slika 36. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje Spy-LHP konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

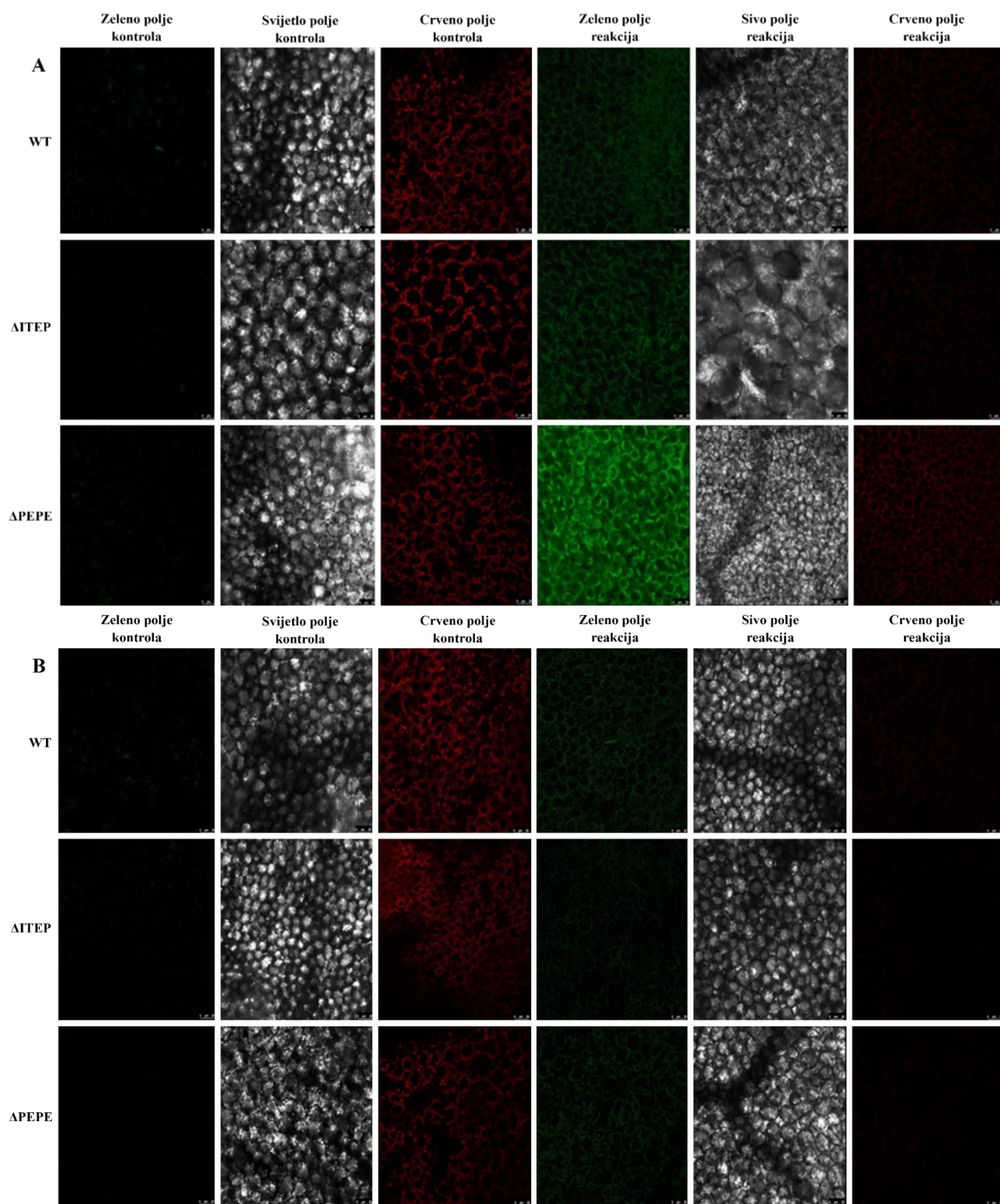


Slika 37. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje Spy-LHP konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

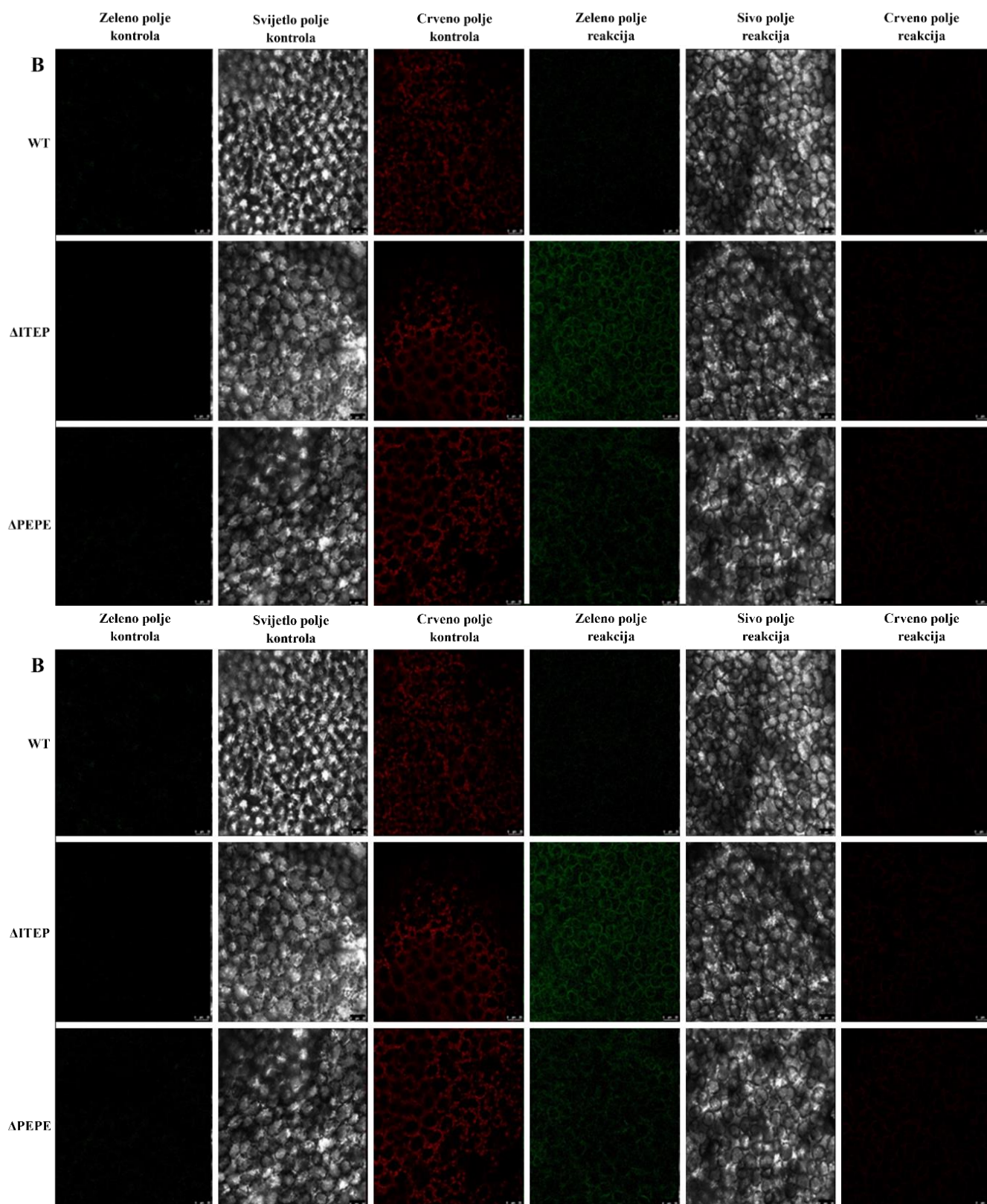
U slučaju $^1\text{O}_2$ do značajnog povećanja signala pri normalnoj vlazi došlo je na prosijanom supstratu za liniju ΔPEPE i na sušenom supstratu za liniju ΔITEP . U uvjetima sušnog stresa došlo je do značajnog smanjenja signala na prosijanom supstratu za liniju ΔITEP , a na sušenom supstratu došlo je do povećanja za liniju ΔPEPE . Sve tri linije pokazale su značajno povećanje signala na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi u odnosu na ostale uvjete uzgoja (Slike 38, 39, 40).



Slika 38. Jačina signala fluorescentne boje SOSG detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, ΔITEP i ΔPEPE . Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. SOSG – Singlet Oxygen Sensor Green, $^1\text{O}_2$ – singletni kisik, ΔITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, ΔPEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres. Zbog razlika vrijednosti detekcije signala i bolje preglednosti, grafovi su prikazani odvojeno.



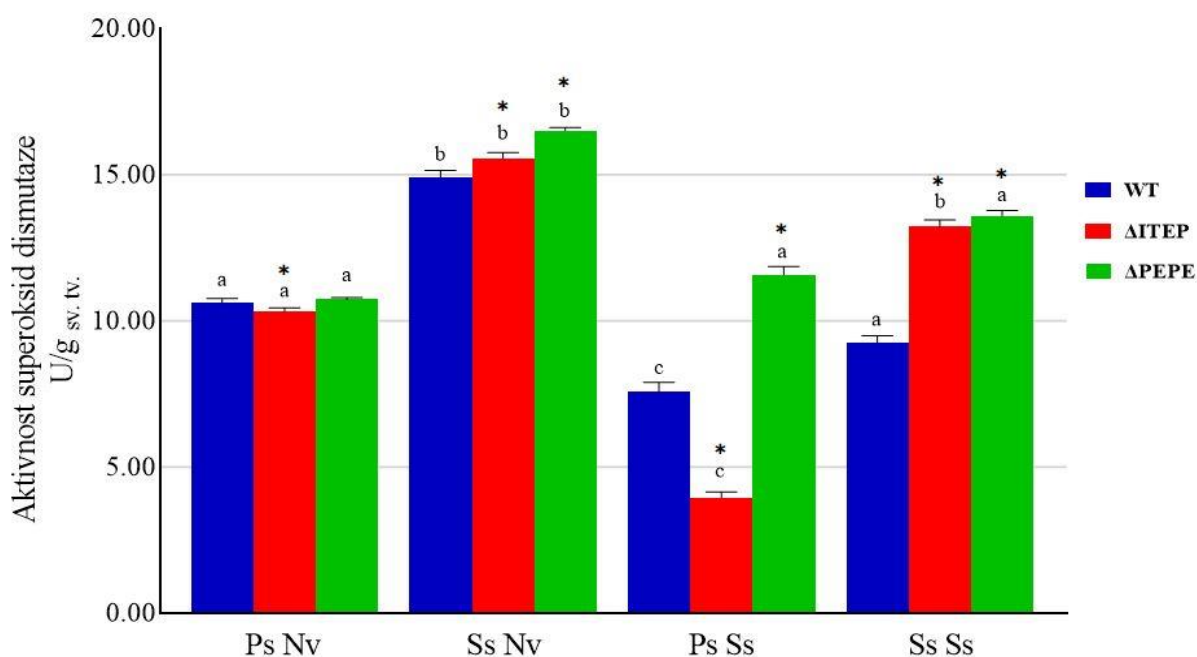
Slika 39. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje SOSG konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).



Slika 40. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje SOSG konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μ m. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

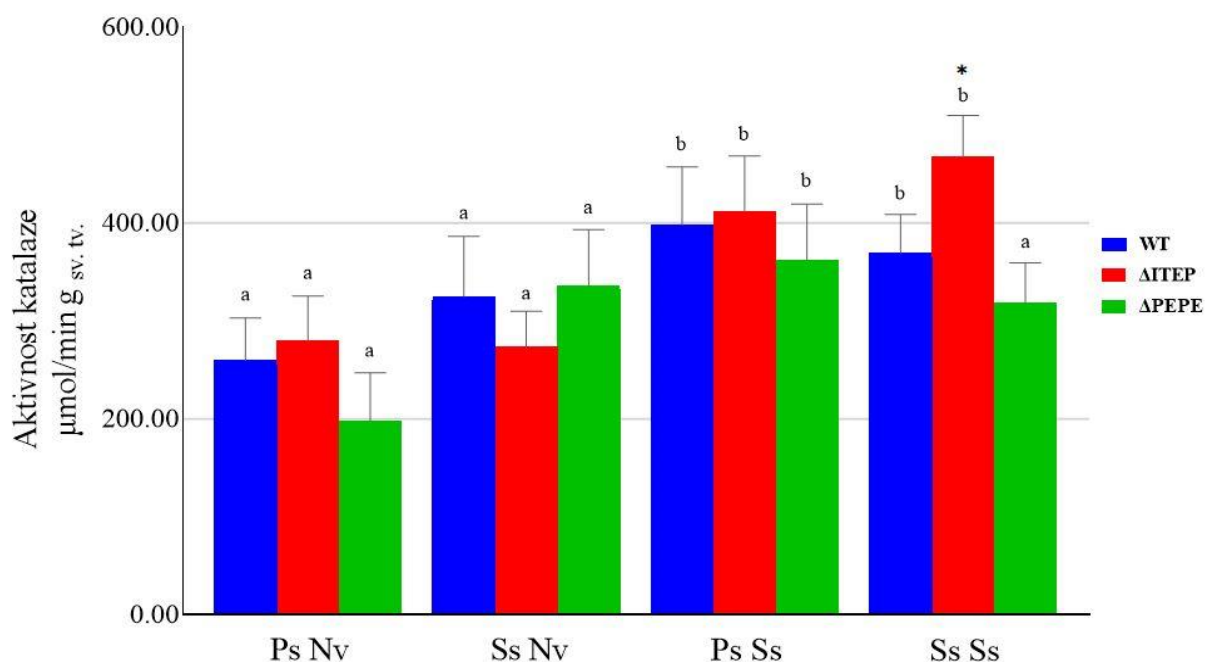
4.2.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima

Spektrofotometrijskom analizom odredila sam aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX. Uočila sam značajne razlike u aktivnosti SOD-a u mutantnim linijama Δ ITEP i Δ PEPE u odnosu na WT. Linija Δ ITEP pokazala je značajno smanjenje aktivnosti enzima u slučaju prosijanog supstrata, te povećanje u slučaju sušenog supstrata pri oba uvjeta uzgoja u usporedbi s WT-om. Kod linije Δ PEPE znatno povećanje aktivnosti enzima uočila sam u svim slučajevima s izuzetkom prosijanog supstrata u uvjetima normalne vlage gdje povećanje aktivnosti enzima nije bilo značajno. Usporedbom aktivnosti enzima kod linije WT, uočila sam smanjenje aktivnosti enzima u uvjetima sušnog stresa. Obje mutantne linije pokazale su na sušenom supstratu pri oba uvjeta uzgoja povećanje aktivnosti u odnosu na prosijani supstrat. Najveća aktivnost enzima kod svih linija bila je na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi (Slika 41).



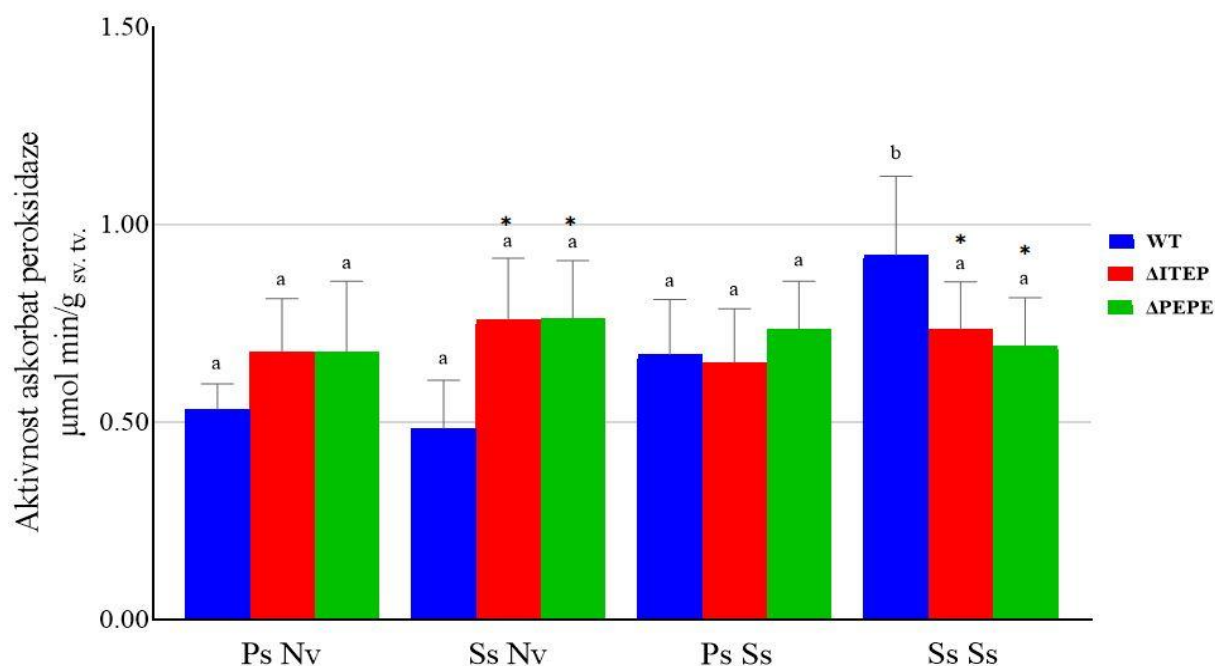
Slika 41. Aktivnost superoksid dismutaze u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (eng. *wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju enzima CAT, u usporedbi s WT-om došlo je do značajnog povećanja aktivnosti enzima kod linije Δ ITEP na sušenom supstratu pri uvjetima sušnog stresa. Linije WT i Δ ITEP pri različitim uvjetima uzgoja pokazale su značajno povećanje aktivnosti enzima u uvjetima sušnog stresa usporedbom s uvjetima normalne vlage. S druge strane, linija Δ PEPE pokazala je značajno povećanje aktivnosti enzima samo na prosijanom supstratu pri uvjetima sušnog stresa u odnosu na ostale uvjete uzgoja (Slika 42).



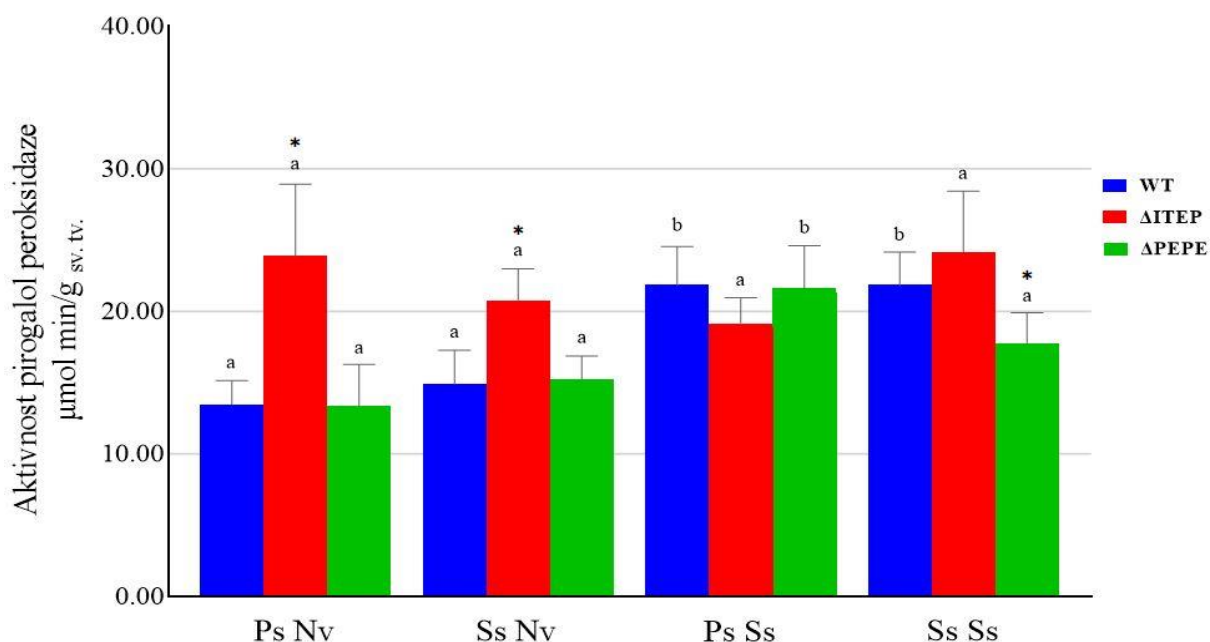
Slika 42. Aktivnost katalaze u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Enzim APX pokazao je značajno povećanje aktivnosti na sušenom supstratu za obje mutantne linije pri normalnoj vlazi, a u uvjetima sušnog stresa smanjenje aktivnosti enzima na sušenom supstratu u odnosu na WT. Usporedbom različitih uvjeta uzgoja, linija WT pokazala je povećanje aktivnosti enzima na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa (Slika 43).



Slika 43. Aktivnost askorbat peroksidaze u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

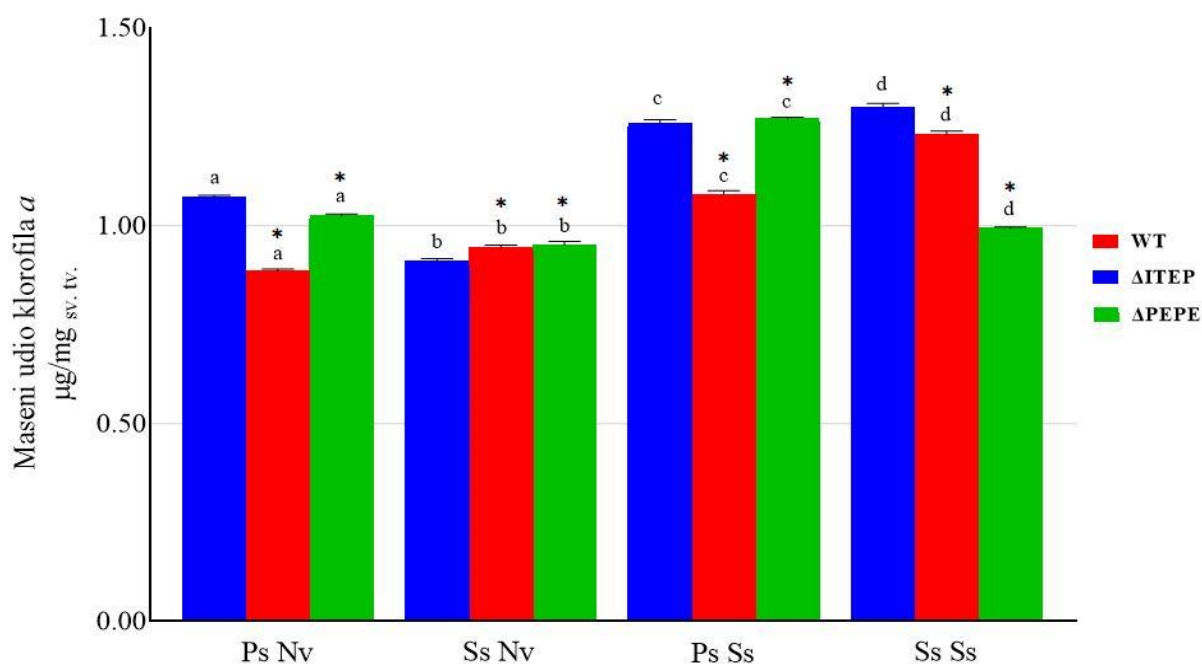
U slučaju PPX pri uvjetima normalne vlage došlo je do značajnog povećanja aktivnosti enzima kod linije Δ ITEP na oba tipa supstrata. U uvjetima sušnog stresa, kod linije Δ PEPE na sušenom supstratu došlo je do značajnog pada aktivnosti enzima usporedbi s WT-om. Linija WT pokazala je značajan porast aktivnosti enzima u uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu. Linija Δ PEPE pokazala je značajan porast aktivnosti enzima u uvjetima sušnog stresa na prosijanom supstratu u odnosu na normalnu vlagu (Slika 44).



Slika 44. Aktivnost pirogalol peroksidaze u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

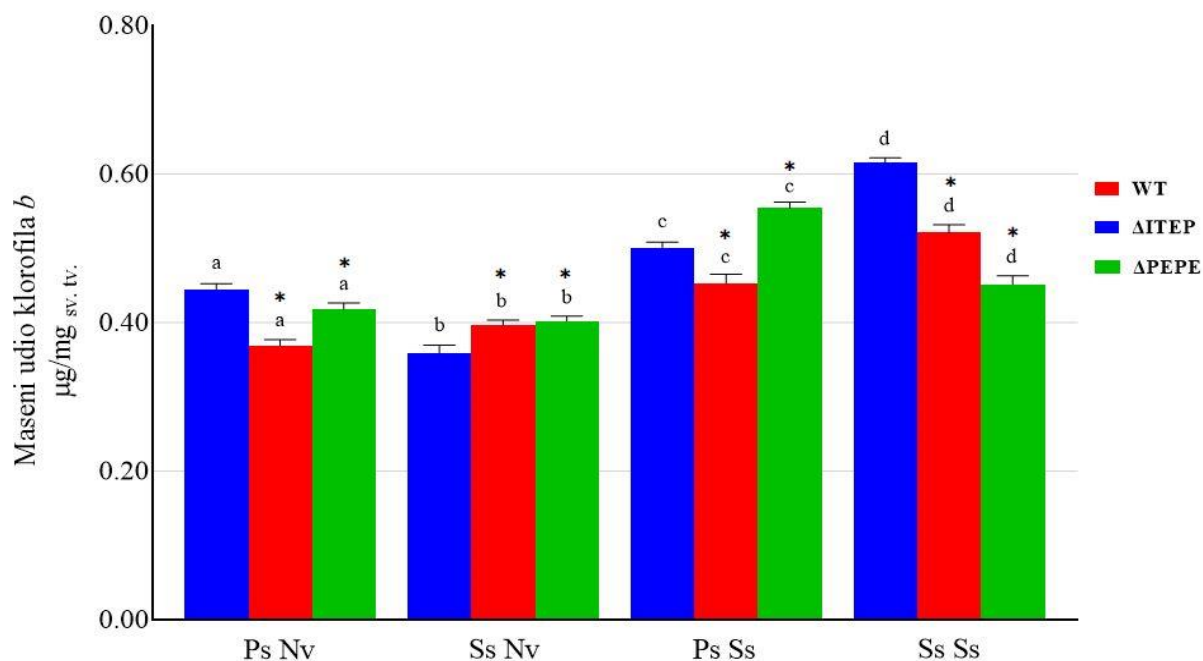
4.2.3. Udio fotosintetskih pigmenata

Spektrofotometrijskom analizom odredila sam udio fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida. Udio klorofila *a* za liniju Δ ITEP bio je značajno smanjen u svim slučajevima osim na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi gdje je bio povećan. U slučaju linije Δ PEPE do značajnog smanjenja udjela došlo je na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi i sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa, dok je na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi i prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa došlo do značajnog povećanja udjela klorofila *a* u odnosu na WT. Međusobnom usporedbom različitih uvjeta uzgoja uočila sam kod sve tri linije značajne razlike, pri čemu je udio klorofila *a* bio uglavnom veći u uvjetima sušnog stresa (Slika 45).



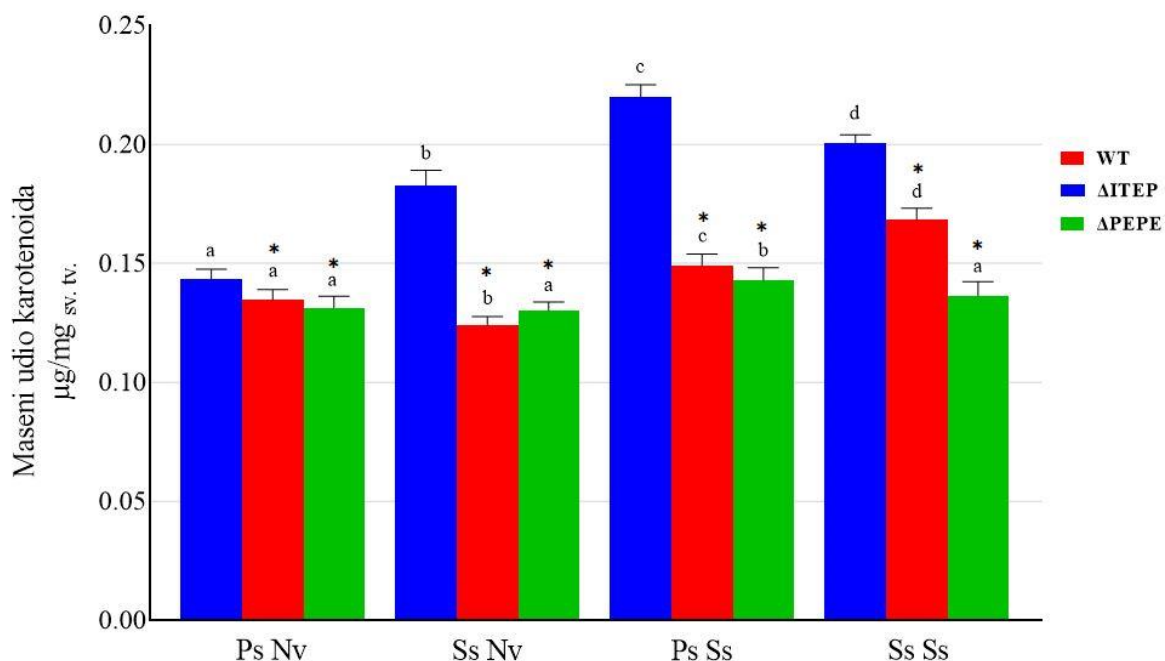
Slika 45. Maseni udio klorofila *a* u linijama WT, ΔITEP i ΔPEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. ΔITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, ΔPEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju klorofila *b* pri normalnoj vlazi došlo je do značajnog smanjenja udjela na prosijanom supstratu i do značajnog povećanja udjela na sušenom supstratu za obje mutantne linije. U uvjetima sušnog stresa došlo je do značajnog smanjenja udjela klorofila *b* za obje linije na sušenom supstratu, te za liniju ΔITEP na prosijanom supstratu, dok je linija ΔPEPE na prosijanom supstratu pokazala značajno povećanje udjela u odnosu na WT. Međusobnom usporedbom različitih uvjeta uzgoja uočila sam kod sve tri linije značajne razlike, pri čemu je udio klorofila *b* uglavnom bio veći u uvjetima sušnog stresa (Slika 46).



Slika 46. Maseni udio klorofila *b* u linijama WT, ΔITEP i ΔPEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. ΔITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, ΔPEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju ukupnih karotenoida došlo je do značajnog smanjenja udjela na oba tipa supstrata i oba uvjeta uzgoja za obje mutantne linije u odnosu na WT. Međusobnom usporedbom različitih uvjeta uzgoja uočila sam kod linija WT i ΔITEP značajne razlike na svakom uvjetu uzgoja, dok je linija ΔPEPE značajnu razliku pokazala samo na prosijanom supstratu pri uvjetima sušnog stresa. Veći udio karotenoida uočila sam u uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu (Slika 47).



Slika 47. Maseni udio ukupnih karotenoida u linijama WT, ΔITEP i ΔPEPE. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka ± standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. ΔITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, ΔPEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Uočila sam promjene udjela ukupnih klorofila, omjera klorofila *a* i klorofila *b*, te omjera ukupnih karotenoida i ukupnih klorofila s obzirom na uzgojne supstrate i uvjete uzgoja. Također, razlike su bile prisutne i između mutantnih linija i u usporedbi s WT-om. Obje mutantne linije pokazale su značajan pad omjera ukupnog klorofila na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi te na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa, dok su na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa pokazale porast omjera. Usporedbom različitih uvjeta uzgoja, WT je pokazao značajno manji omjer klorofila na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na ostale uvjete uzgoja. U slučaju ukupnog klorofila, linija ΔITEP pokazala je značajan pad pri svim uvjetima uzgoja osim kod sušenog supstrata na normalnoj vlazi gdje je pokazala rast u odnosu na WT. Linija ΔPEPE pokazala je značajan pad ukupnog klorofila na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi i na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa, dok je na ostalim uvjetima pokazala značajan rast. Više ukupnog klorofila zabilježila sam kod biljaka u uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu. Kod omjera ukupnih karotenoida i ukupnog klorofila mutantne linije pokazale su pad omjera kod svih uvjeta uzgoja osim na

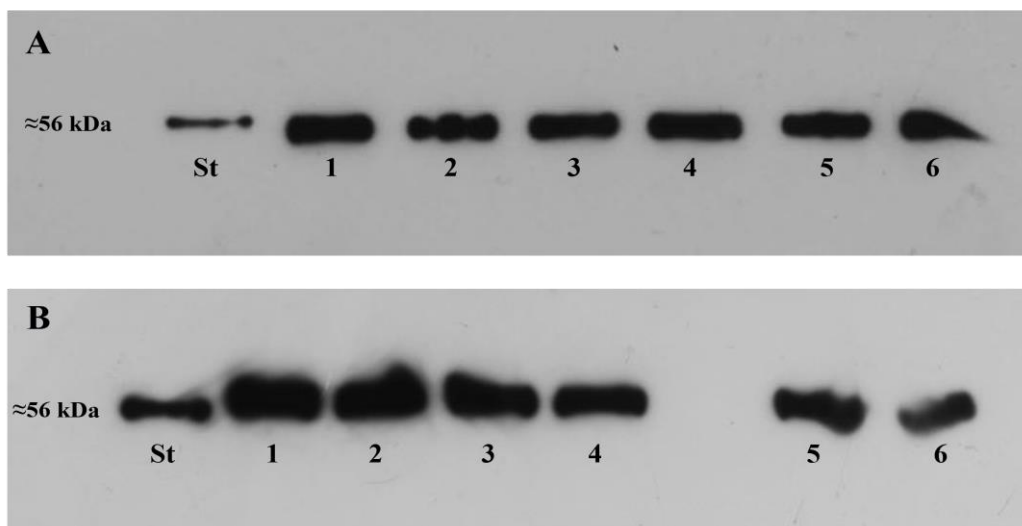
prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi gdje je linija Δ ITEP pokazala porast, a linija Δ PEPE nije pokazala razliku u odnosu na WT. Usporedbom različitih uvjeta uzgoja linija Δ ITEP pokazala je značajno veći omjer na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi u odnosu na ostale uvjete uzgoja. Linija Δ PEPE pokazala je značajno manji omjer na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na ostale uvjete uzgoja (Tablica 4).

Tablica 4. Omjeri fotosintetskih pigmenata i ukupni klorofil za linije WT, Δ ITEP i Δ PEPE na prosijanom i sušenom supstratu te normalnoj vlazi i uvjetima sušnog stresa. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Car – karotenoidi, Chl – klorofil, Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

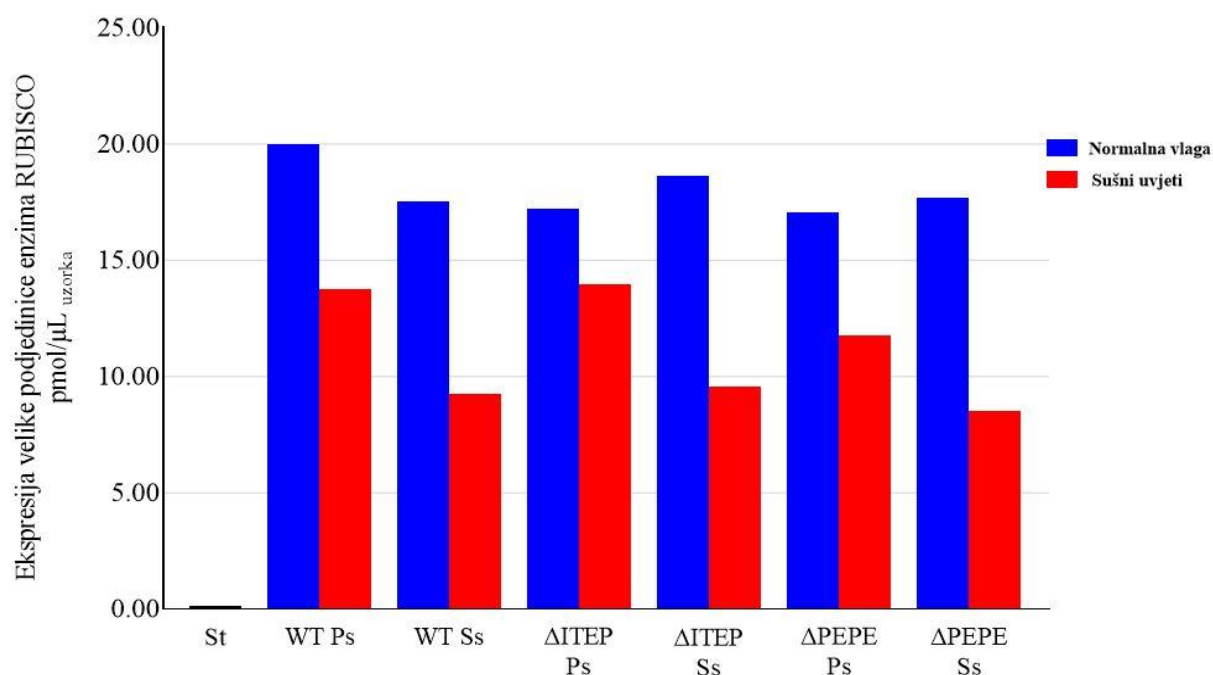
	Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>		Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i> μ g/mg		Car / (Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i>)	
Normalna vlaga						
WT prosijani supstrat	2,407 $\pm$ 0,04	a	1,516 $\pm$ 0,01	a	0,095 $\pm$ 0,01	a
Δ ITEP prosijani supstrat	2,401 $\pm$ 0,06	a	1,255 $\pm$ 0,01	* a	0,107 $\pm$ 0,01	* b
Δ PEPE prosijani supstrat	2,452 $\pm$ 0,05	a	1,443 $\pm$ 0,01	* a	0,091 $\pm$ 0,01	a
WT sušeni supstrat	2,539 $\pm$ 0,09	b	1,267 $\pm$ 0,01	b	0,144 $\pm$ 0,01	b
Δ ITEP sušeni supstrat	2,383 $\pm$ 0,05	* a	1,343 $\pm$ 0,01	* b	0,092 $\pm$ 0,01	* a
Δ PEPE sušeni supstrat	2,363 $\pm$ 0,06	* b	1,352 $\pm$ 0,01	* b	0,096 $\pm$ 0,01	* a
Sušni stres						
WT prosijani supstrat	2,520 $\pm$ 0,05	b	1,760 $\pm$ 0,01	c	0,125 $\pm$ 0,01	c
Δ ITEP prosijani supstrat	2,382 $\pm$ 0,07	* a	1,532 $\pm$ 0,01	* c	0,097 $\pm$ 0,01	* a
Δ PEPE prosijani supstrat	2,294 $\pm$ 0,04	* c	1,825 $\pm$ 0,01	* c	0,078 $\pm$ 0,01	* b
WT sušeni supstrat	2,114 $\pm$ 0,03	c	1,915 $\pm$ 0,01	d	0,105 $\pm$ 0,01	d
Δ ITEP sušeni supstrat	2,365 $\pm$ 0,05	* a	1,753 $\pm$ 0,01	* d	0,096 $\pm$ 0,01	* a
Δ PEPE sušeni supstrat	2,393 $\pm$ 0,06	* d	1,408 $\pm$ 0,01	* a	0,094 $\pm$ 0,01	* a

4.2.4. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO

Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO bila je veća u uvjetima normalne vlage u odnosu na uvjete sušnog stresa. Mutante su u uvjetima normalne vlage na prosijanom supstratu pokazale manju ekspresiju u odnosu na WT. U uvjetima sušnog stresa ekspresija enzima bila je manja na sušenom supstratu u odnosu na prosijani supstrat (Slike 48 i 49).



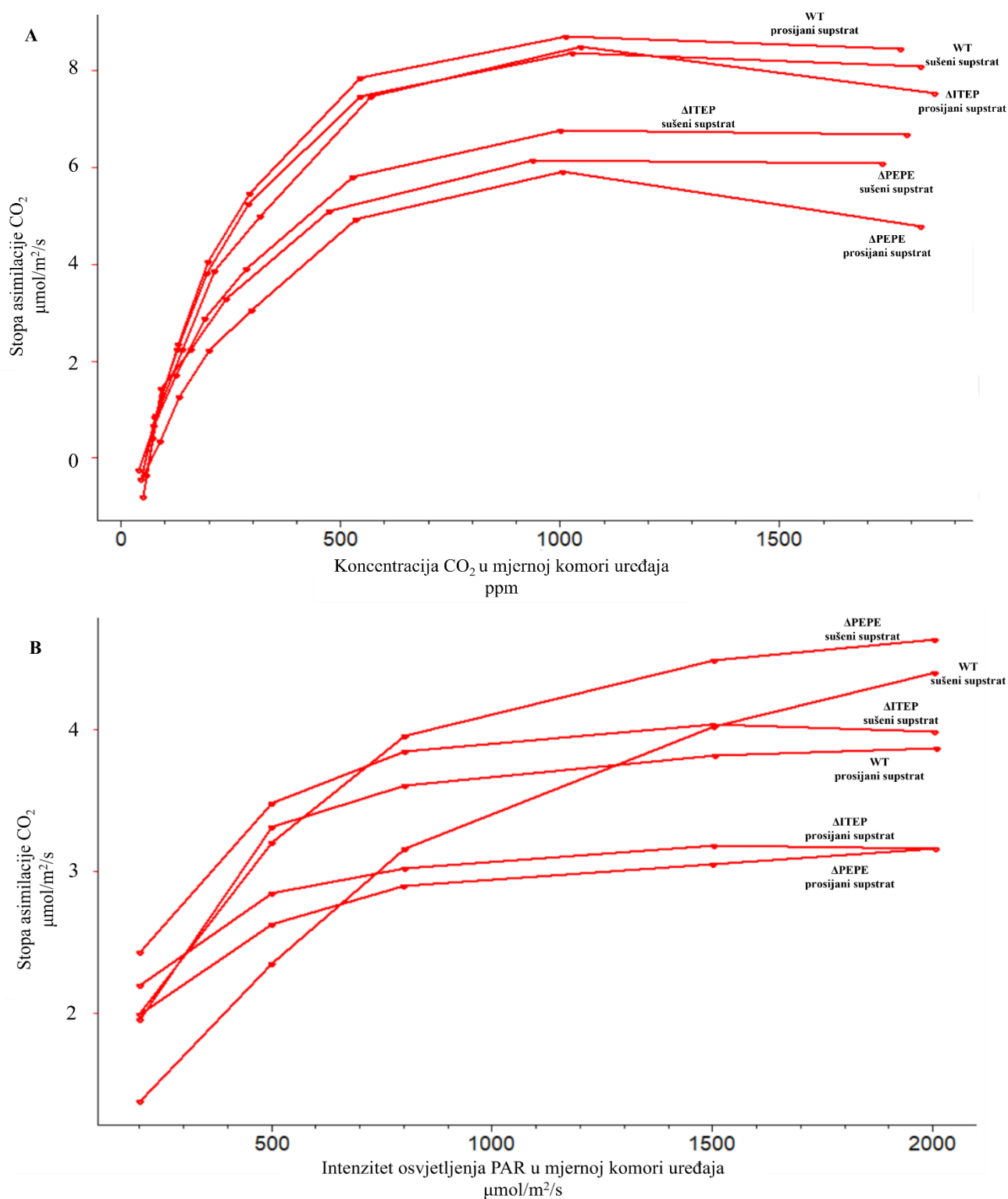
Slika 48. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO u linijama WT, Δ ITEP, Δ PEPE. A) normalna vlaga, B) uvjeti sušnog stresa. St – standard, 1 – WT prosijani supstrat, 2 – WT sušeni supstrat, 3 – Δ ITEP prosijani supstrat, 4 – Δ ITEP sušeni supstrat, 5 – Δ PEPE prosijani supstrat, 6 – Δ PEPE sušeni supstrat; St – standard poznate koncentracije velike podjedinice enzima RUBISCO, 1 – WT prosijani supstrat, 2 – Δ ITEP prosijani supstrat, 3 – Δ PEPE prosijani supstrat, 4 – WT sušeni supstrat, 5 – Δ ITEP sušeni supstrat, 6 – Δ PEPE sušeni supstrat. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l, a uzorka 2 μ l.



Slika 49. Kvantifikacija intenziteta obojenja u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Prikazane su kvantificirane vrijednosti pruga dobivenih na filmu. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l (0,75 pmol), a uzorka 2 μ l. Δ ITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, Δ PEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps – prosijani supstrat, Ss – sušeni supstrat.

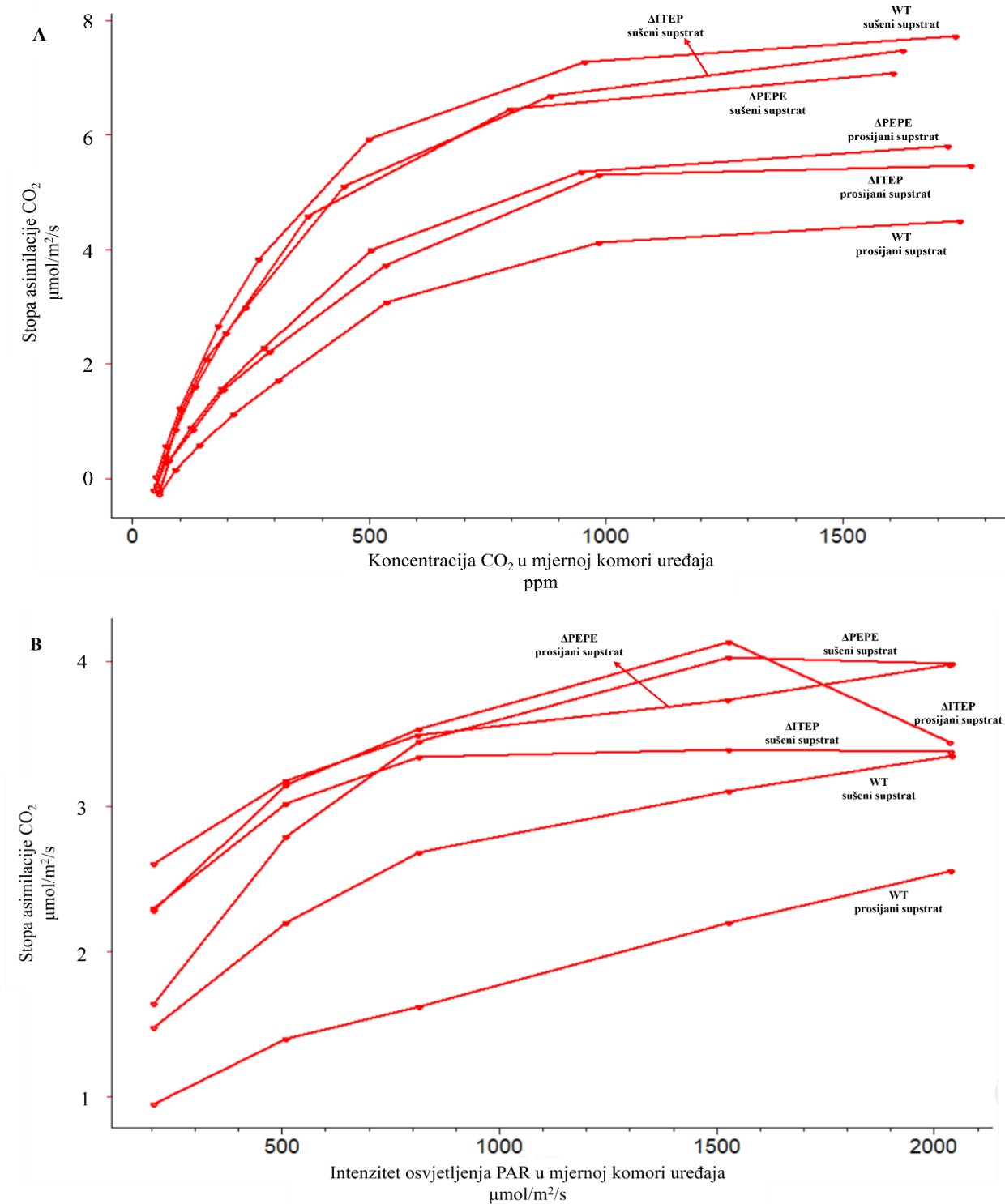
4.2.5. Promjene parametara fotosintetske izmjene plinova

Kod mjerenja stope asimilacije CO_2 u biljkama, u ovisnosti o različitim koncentracijama CO_2 (500, 1000, 1500, 1750 ppm CO_2) u mjernoj komori uređaja, u uvjetima normalne vlage, mutantne linije imale su manju stopu asimilacije CO_2 u odnosu na WT na oba tipa supstrata. Također, sve linije na oba tipa supstrata pokazale su uglavnom pad stope asimilacije CO_2 pri koncentracijama CO_2 u mjernoj komori većim od 1000 ppm (Slika 50, A). Kod mjerenja stope asimilacije CO_2 u biljkama, u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja (PAR 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) u mjernoj komori uređaja, u uvjetima normalne vlage, na prosijanom supstratu mutantne linije pokazale su manju stopu asimilacije CO_2 u odnosu na WT. Na sušenom supstratu linija Δ ITEP pokazala je manju, a Δ PEPE veću stopu asimilacije CO_2 u odnosu na WT. Na intenzitetima osvjetljenja većima od 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ došlo je do pada stope asimilacije CO_2 kod linije Δ ITEP. Stopa asimilacije CO_2 generalno je bila veća kod biljaka na sušenom supstratu nego kod biljaka na prosijanom supstratu (Slika 50, B).



Slika 50. Izmjerena stopa asimilacije CO₂ u ovisnosti o A) različitim koncentracijama CO₂; B) različitim intenzitetima osvjetljenja za linije WT, ΔITEP i ΔPEPE na prosijanom i sušenom supstratu u uvjetima normalne vlage. Navedene vrijednosti koncentracije CO₂ ppm i intenziteta osvjetljenja (PAR (*eng. photosynthetically active radiation*) μmol/m²/s) na osi X odnose se na uvijete u mjernoj komori uređaja GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Točke na grafu prikazuju prosječne vrijednosti mjerenja stope asimilacije CO₂ na tri različite biljne replike. ΔITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, ΔPEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

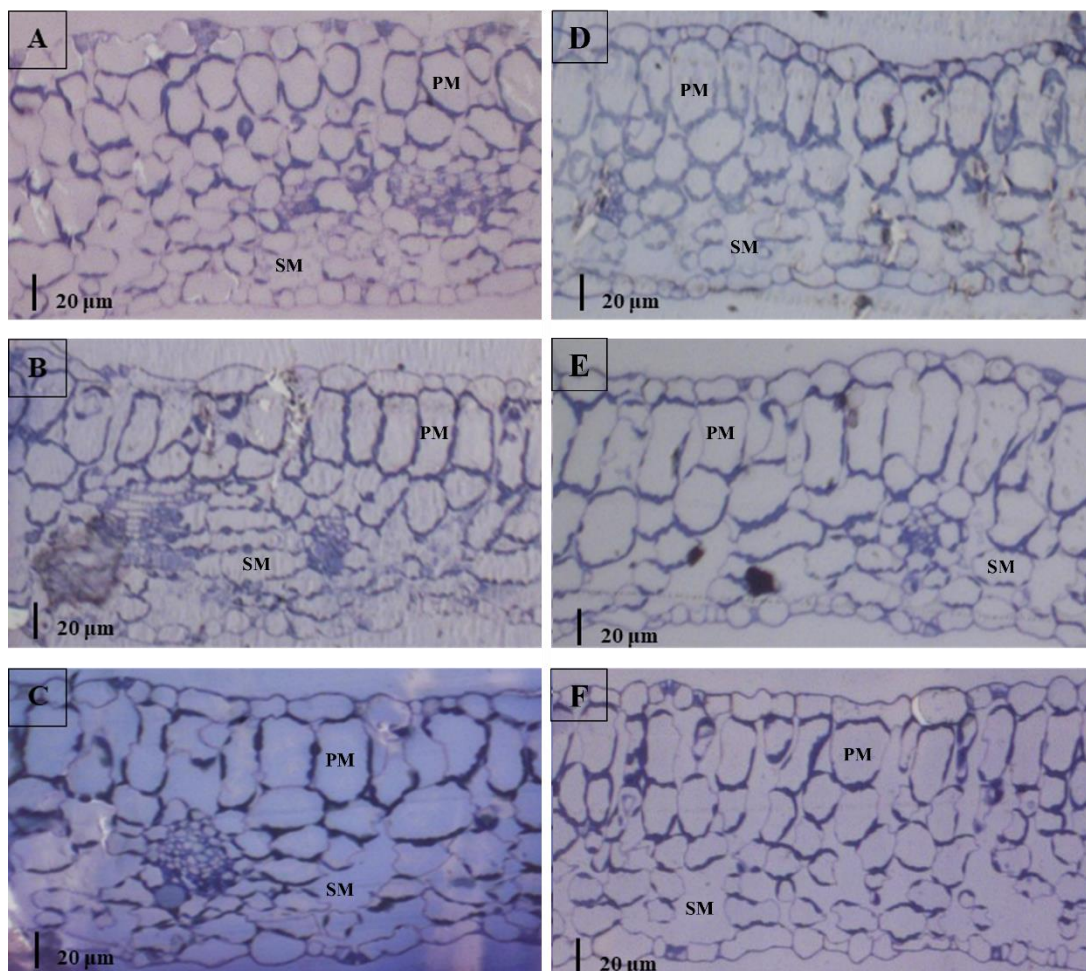
Kod mjerenja stope asimilacije CO₂ u biljkama, u ovisnosti o različitim koncentracijama CO₂ u mjernoj komori uređaja, u uvjetima sušnog stresa, mutantne linije imale su veću stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT na prosijanom, a manju na sušenom supstratu. Pad vrijednosti stope asimilacije CO₂ nije se pojavio. Kod biljaka na prosijanom supstratu stopa asimilacije CO₂ bila je generalno manja nego na sušenom supstratu (Slika 51, A). Kod mjerenja stope asimilacije CO₂ u biljkama, u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja, u uvjetima sušnog stresa, na oba tipa supstrata mutantne linije pokazale su veću stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT. Nagli pad stope asimilacije CO₂ mogla sam uočiti kod linije ΔITEP na prosijanom supstratu na intenzitetima osvjetljenja višima od 1500 μmol/m²/s (Slika 51, B).



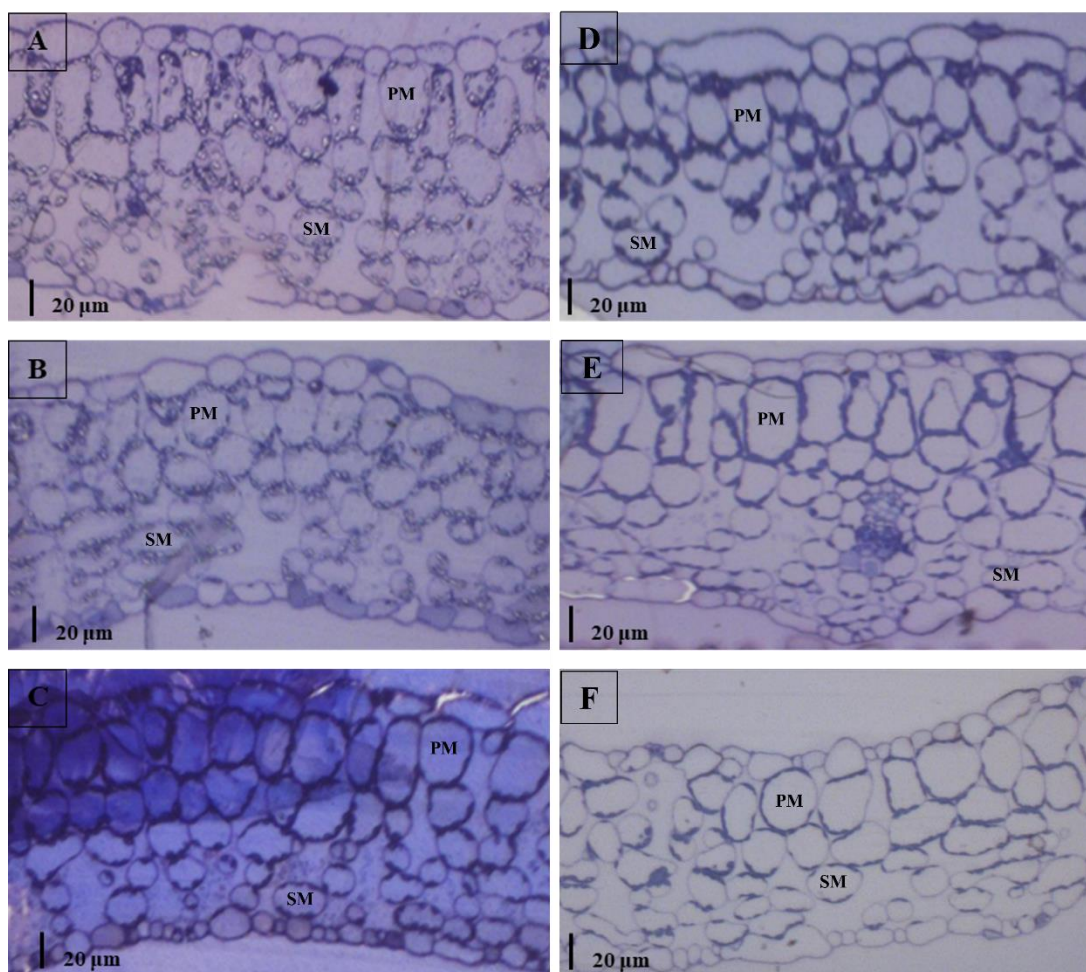
Slika 51. Izmjerena stopa asimilacije CO₂ u ovisnosti o A) različitim koncentracijama CO₂; B) različitim intenzitetima osvjetljenja za linije WT, ΔITEP i ΔPEPE na prosijanom i sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. Navedene vrijednosti koncentracije CO₂ ppm i intenziteta osvjetljenja (PAR (*eng. photosynthetically active radiation*) μmol/m²/s) na osi X odnose se na uvijete u mjernoj komori uređaja GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Točke na grafu prikazuju prosječne vrijednosti mjerenja stope asimilacije CO₂ na tri različite biljne replike. ΔITEP – mutanta u kojoj je uklonjeno 17 AK domene ITEP, ΔPEPE – mutanta u kojoj su uklonjene 23 AK domene PEPE, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

4.2.6. Promjene u anatomiji lista

U uvjetima normalne vlage broj slojeva spužvastog mezofila bio je povećan kod svih linija. Stanice palisadnog mezofila bile su veće kod mutantnih linija te su varirale u obliku (Slika 52). U uvjetima sušnog stresa stanice su većinom bile ovalnog oblika, a mogla sam uočiti i veći broj većih kloroplasta, posebno u listovima biljaka uzgajanih na prosijanom supstratu (Slika 53).



Slika 52. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Normalna vlaga A) WT prosijani supstrat; B) Δ ITEP prosijani supstrat; C) Δ PEPE prosijani supstrat; D) WT sušeni supstrat; E) Δ ITEP sušeni supstrat; F) Δ PEPE sušeni supstrat. PM – palisadni mezofil, SM – spužvasti mezofil. Mjerna oznaka 20 μ m.

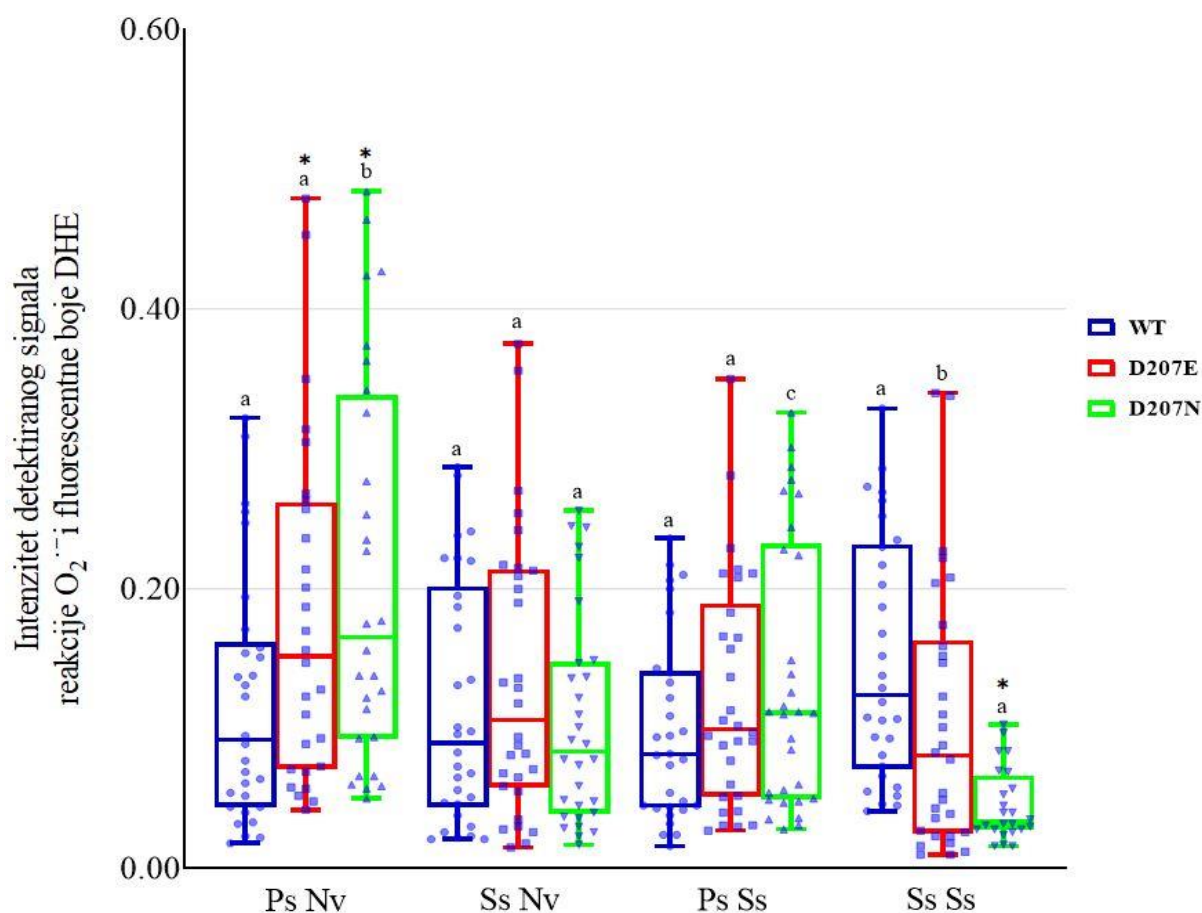


Slika 53. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista u linijama WT, Δ ITEP i Δ PEPE. Sušni stres A) WT prosijani supstrat; B) Δ ITEP prosijani supstrat; C) Δ PEPE prosijani supstrat; D) WT sušeni supstrat; E) Δ ITEP sušeni supstrat; F) Δ PEPE sušeni supstrat. PM – palisadni mezofil, SM – spužvasti mezofil. Mjerna oznaka 20 μ m.

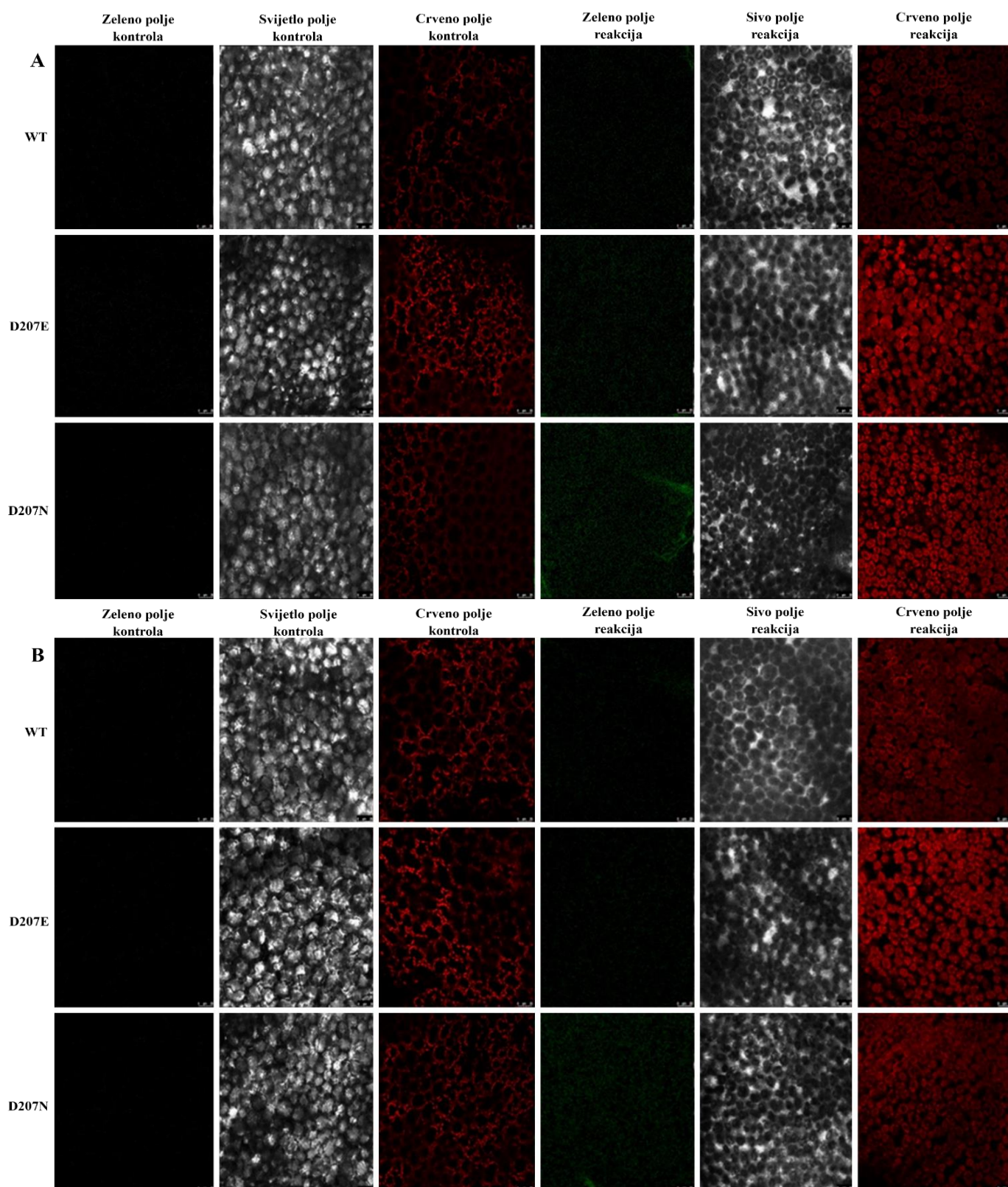
4.3. Funkcionalna analiza uloge aminokiseline 207 u rodanaznoj domeni proteina TROL tijekom sušnog stresa

4.3.1. Utjecaj sušnog stresa na akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta

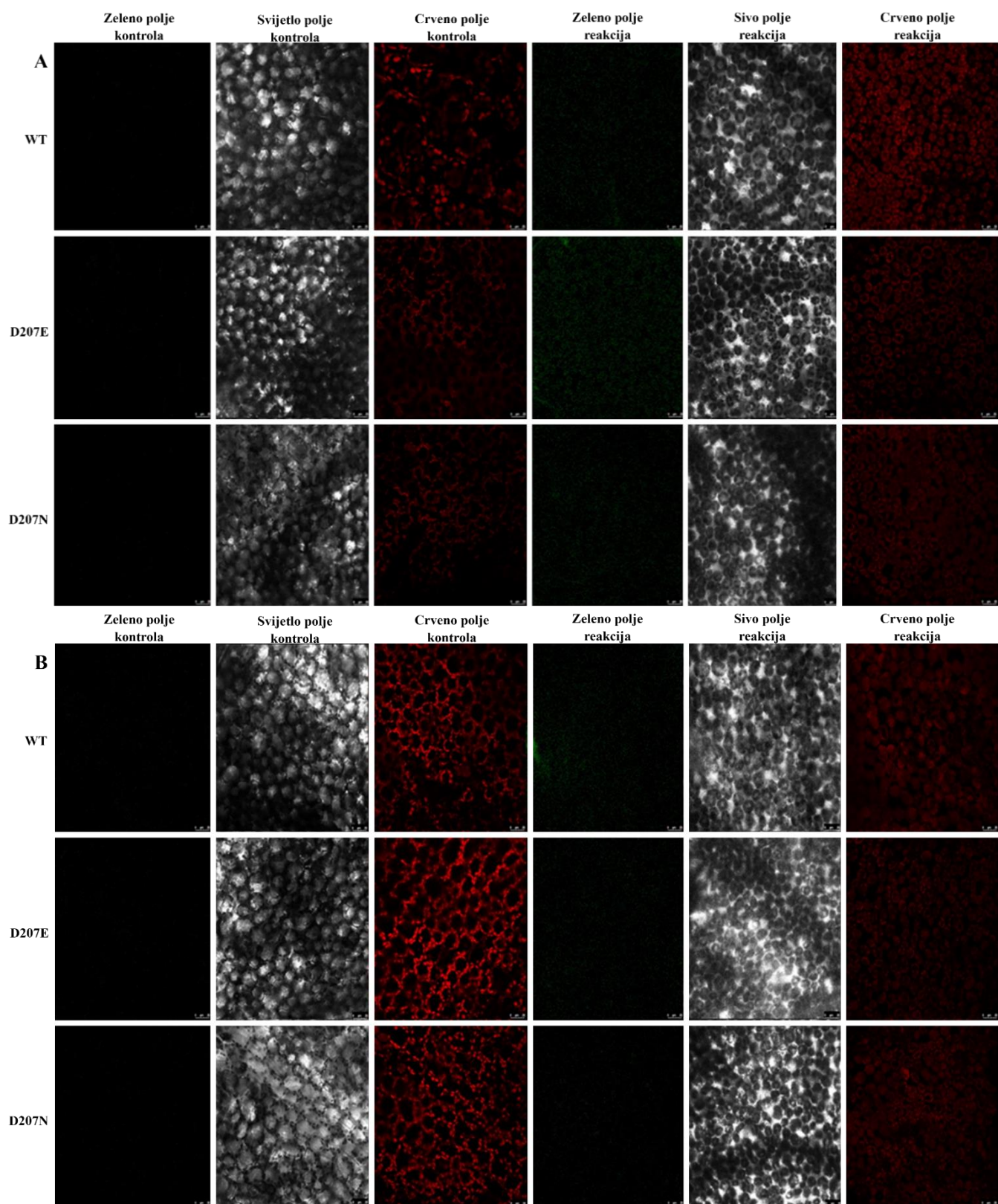
U slučaju $O_2^{\cdot -}$ do značajnog smanjenja signala došlo je na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa kod mutantne linije D207N. Pri normalnoj vlazi do značajnog povećanja signala došlo je kod obje mutantne linije na prosijanom supstratu u odnosu na WT. Linija D207E pokazala je značajno smanjenje signala na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na ostale uvjete uzgoja. Linija D207N pokazala je razliku između prosijanih supstrata i u odnosu na sušene supstrate na oba uvjeta uzgoja (Slike 54, 55, 56).



Slika 54. Jačina signala fluorescentne boje DHE detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutančnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. DHE – dihidroetidij, $O_2^{\bullet-}$ – superoksidni radikal, D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

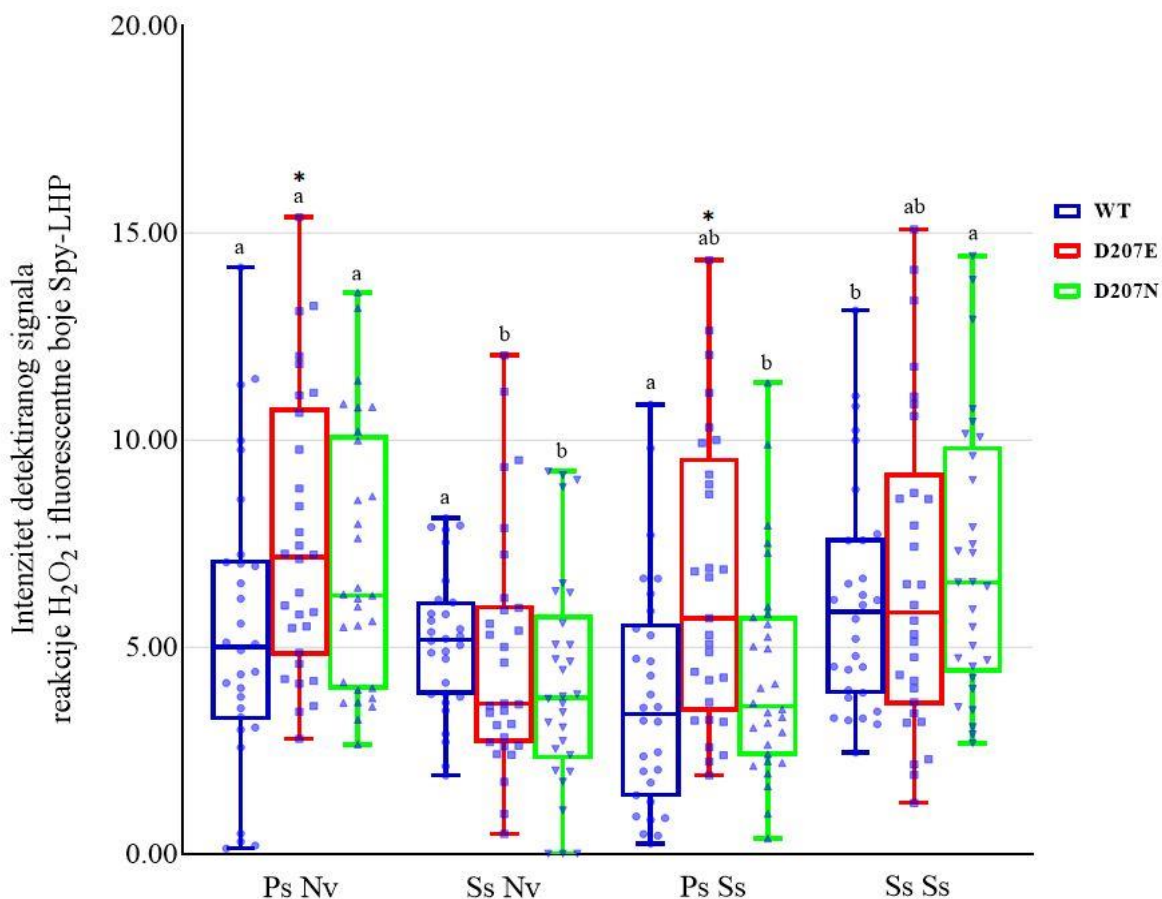


Slika 55. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje DHE konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm . D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

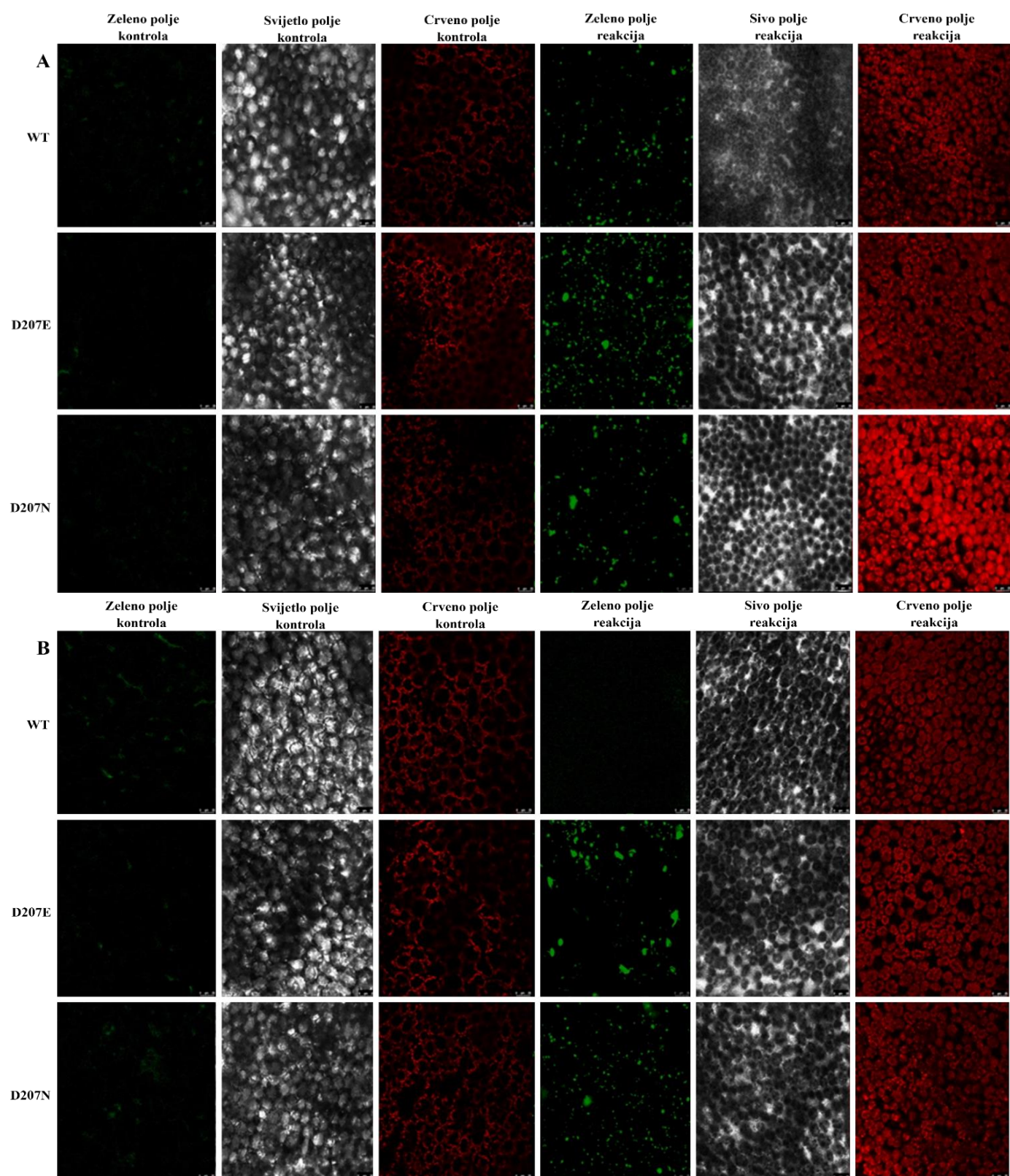


Slika 56. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje DHE konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm . D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

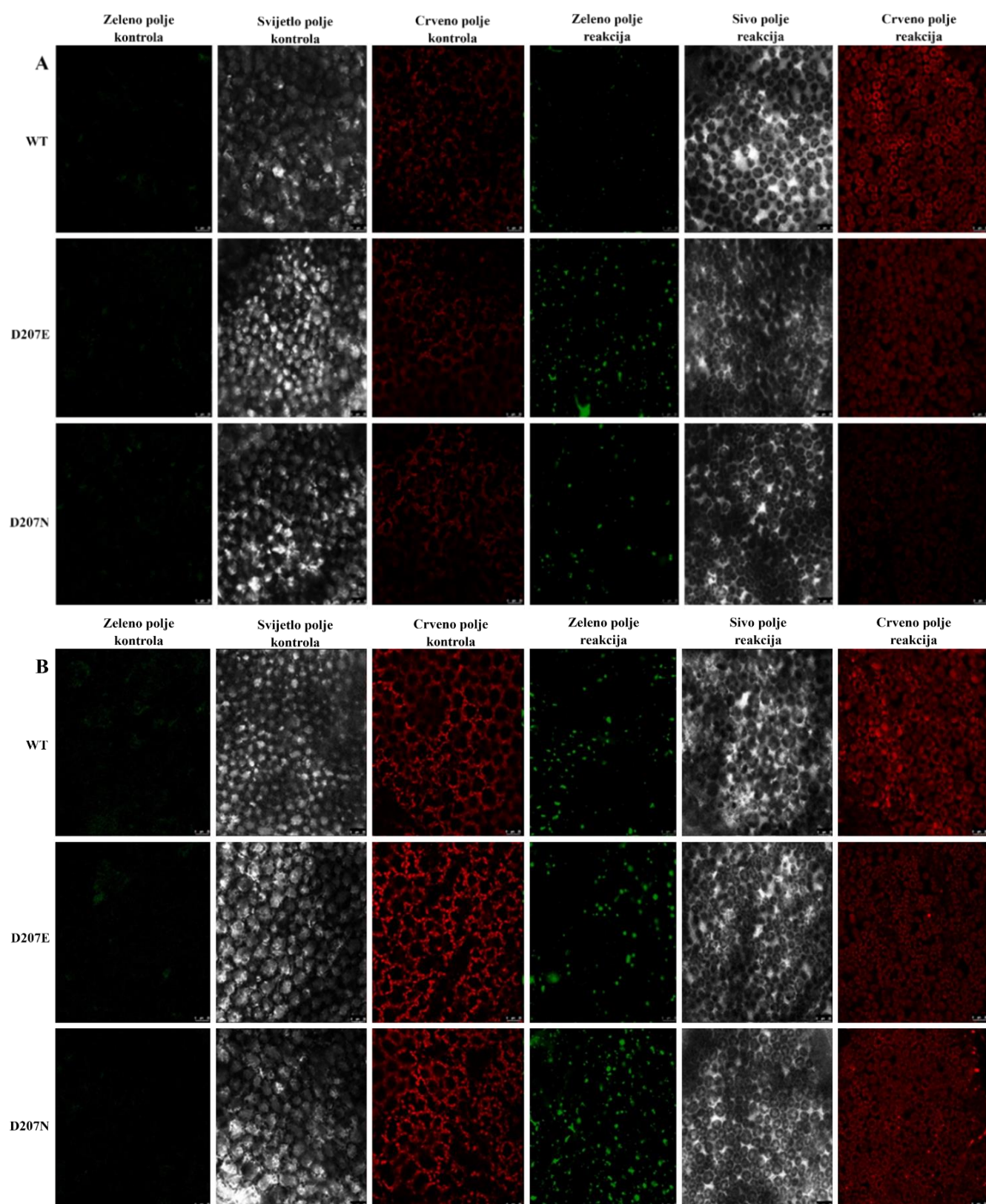
U slučaju H_2O_2 za liniju D207E došlo je do značajnog povećanja signala na prosijanim supstratima za oba uvjeta uzgoja. Linija WT razlikovala se na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na druge uvjete uzgoja. Linija D207E razlikovala se između supstrata pri uvjetima normalne vlage. Za liniju D207N nije bilo razlike između biljaka uzgajanih na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi i prosijanom supstratu pri uvjetima suše, te između biljaka uzgajanih na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi i sušenom supstratu pri uvjetima sušnog stresa (Slike 57, 58, 59).



Slika 57. Jačina signala fluorescentne boje Spy-LHP detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E, D207N. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Spy-LHP – eng. *swallow-tailed perylene derivative for detecting lipid hydroperoxides*, H_2O_2 – vodikov peroksid, D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (eng. *wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

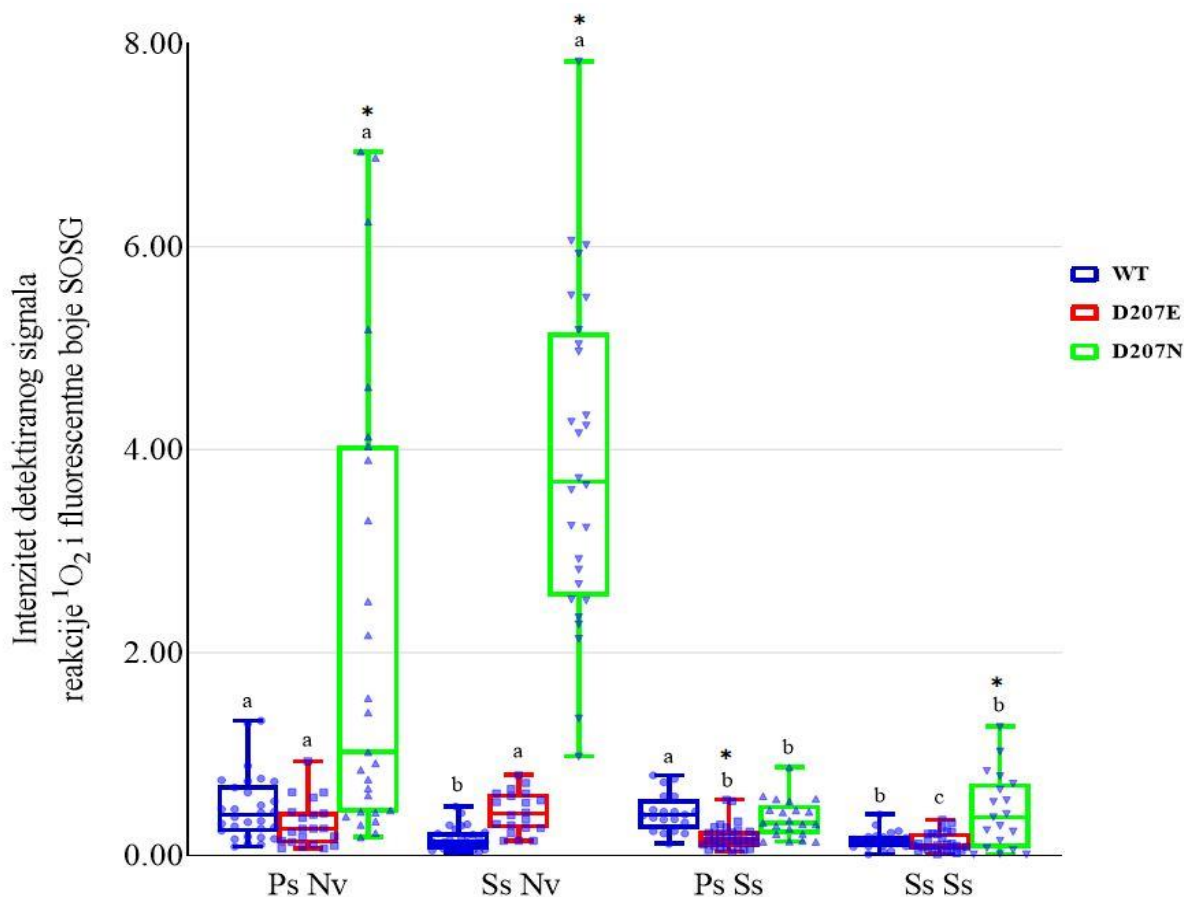


Slika 58. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje Spy-LHP konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. A) prosijani supstrat normalna vlaga; B) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm . D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

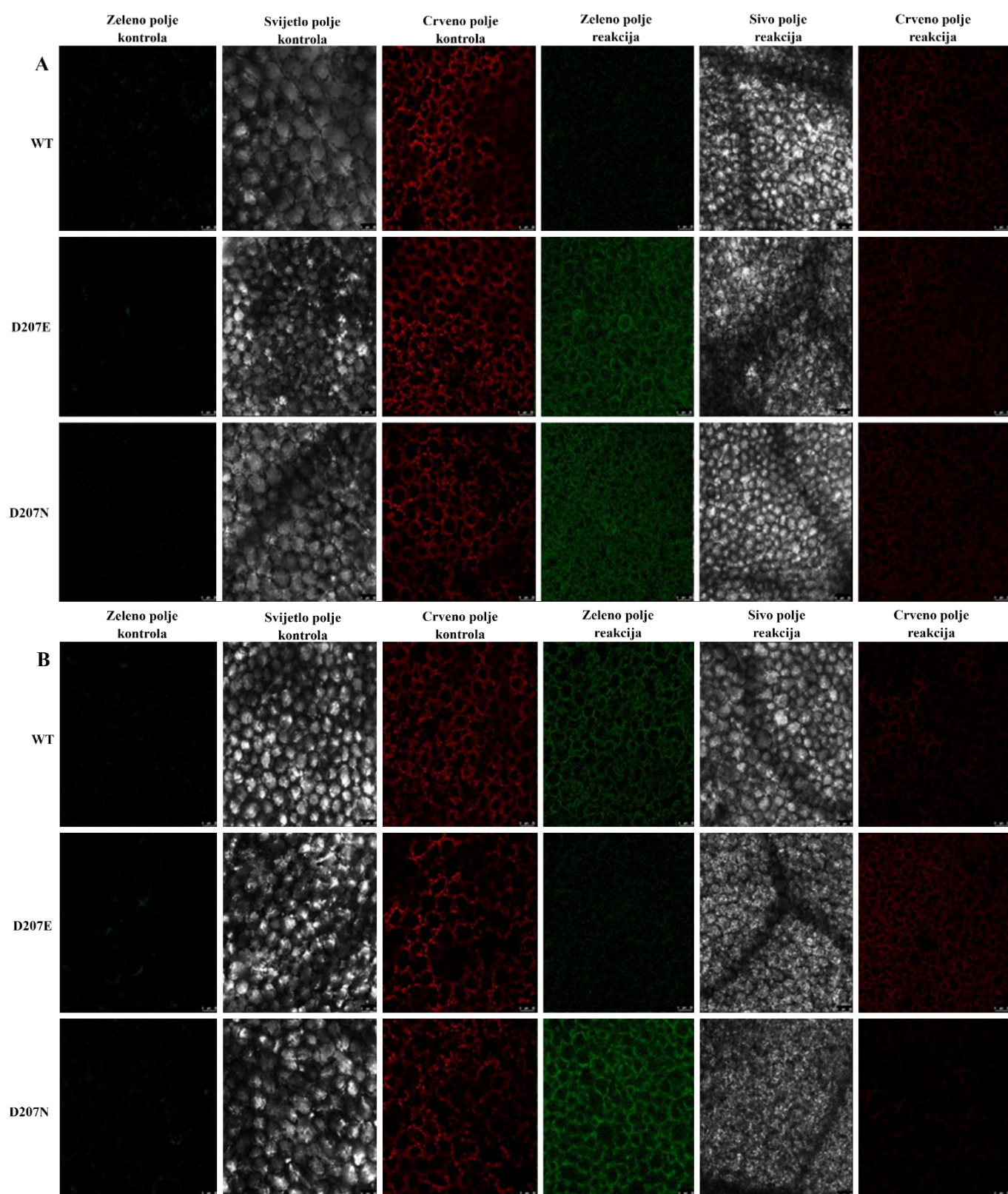


Slika 59. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje Spy-LHP konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm . D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

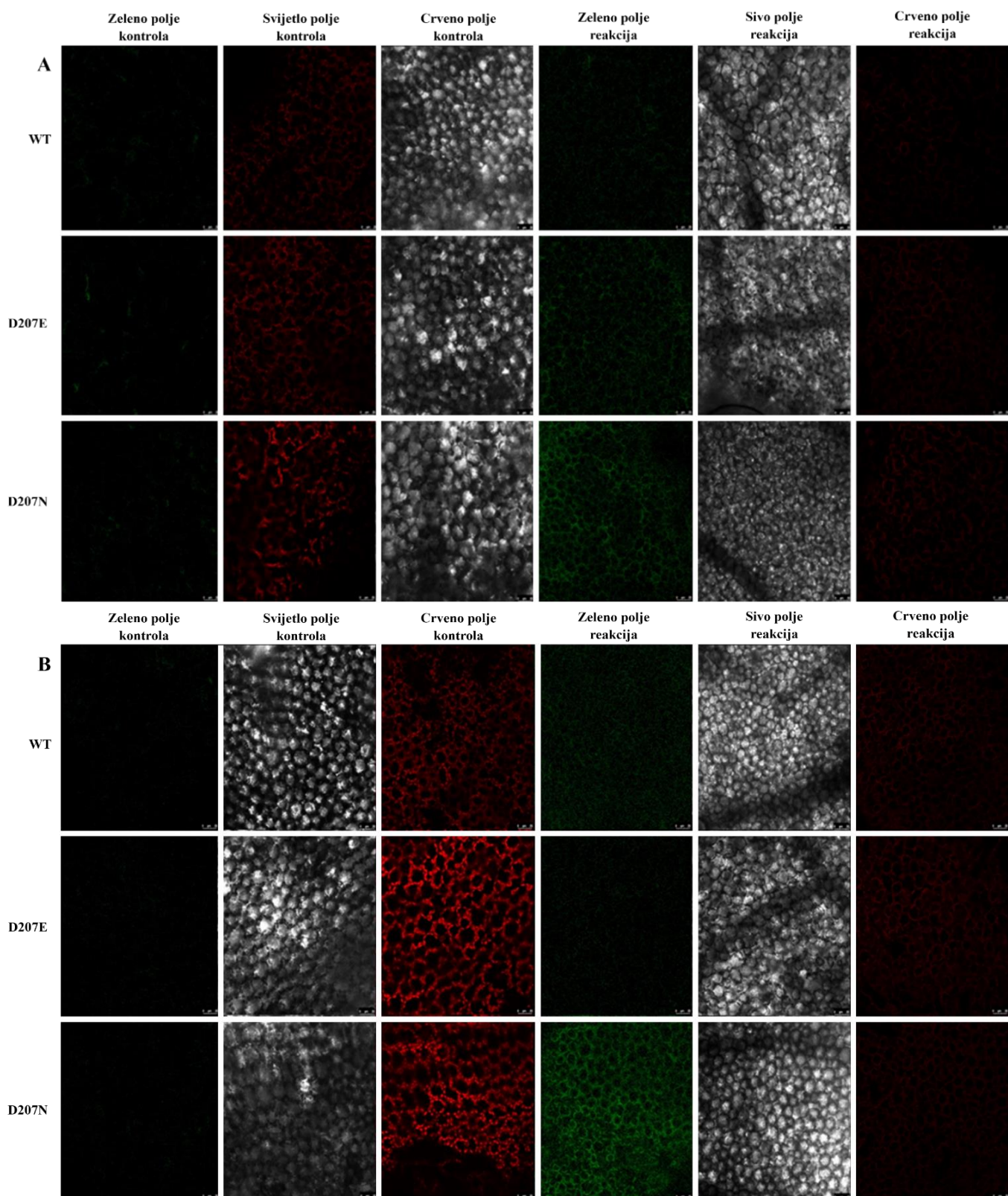
U slučaju $^1\text{O}_2$ za liniju D207N došlo je do značajnog povećanja signala na oba tipa supstrata pri normalnoj vlazi i kod sušenog supstrata u uvjetima sušnog stresa. Kod linije D207E došlo je do značajnog smanjenja signala na prosijanom supstratu pri uvjetima sušnog stresa u usporedbi s WT. Za liniju WT razliku sam uočila kod biljaka uzgajanih na prosijanim supstratima u odnosu na sušene supstrate. Linija D207E razlikovala se među različitim supstratima pri uvjetima sušnog stresa, te u odnosu na uzgoj pri normalnoj vlazi. Linija D207N imala je veći detektirani signal pri normalnoj vlazi nego u uvjetima sušnog stresa (Slike 60, 61, 62).



Slika 60. Jačina signala fluorescentne boje SOSG detektirana konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost $30 \pm$ standardna devijacija. Prikazana je srednja vrijednost 30 snimaka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutančnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. SOSG – Singlet Oxygen Sensor Green, $^1\text{O}_2$ – singletni kisik, D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.



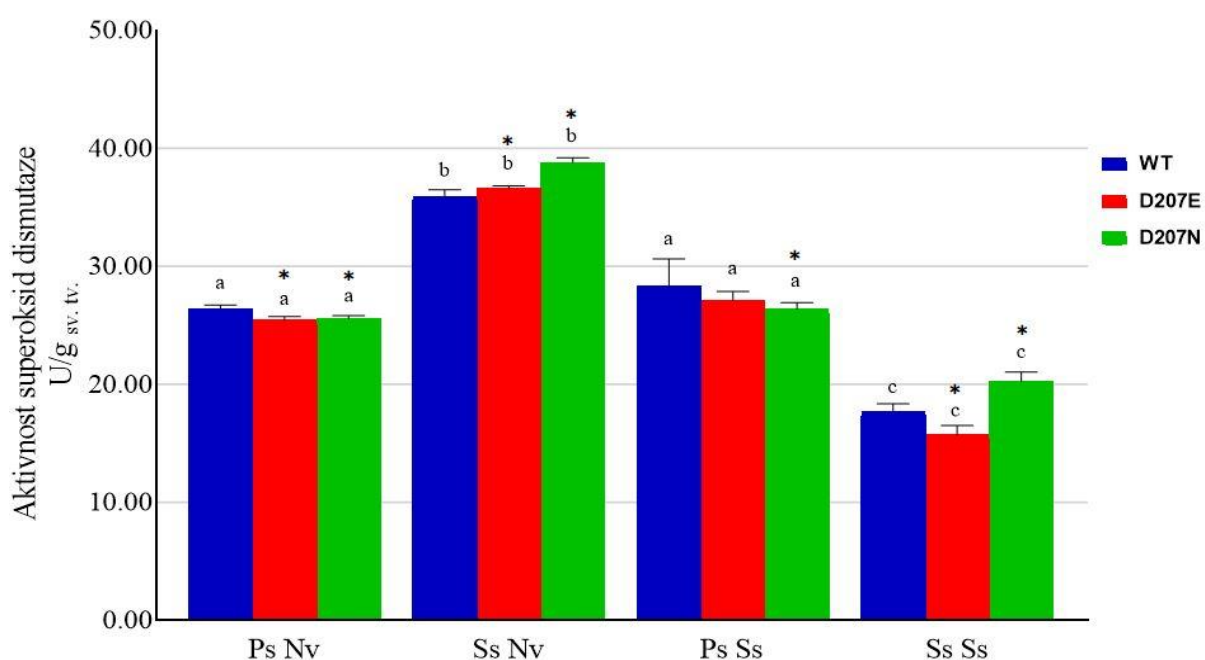
Slika 61. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje SOSG konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. a) prosijani supstrat normalna vlaga b) prosijani supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm . D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).



Slika 62. Mikrografije detektiranog signala fluorescentne boje SOSG konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom u linijama WT, D207E i D207N. A) sušeni supstrat normalna vlaga; B) sušeni supstrat sušni stres. Uvjeti snimanja bili su identični u svim pokusima. Prikazane su reprezentativne snimke. Mjerilo 25 μm . D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

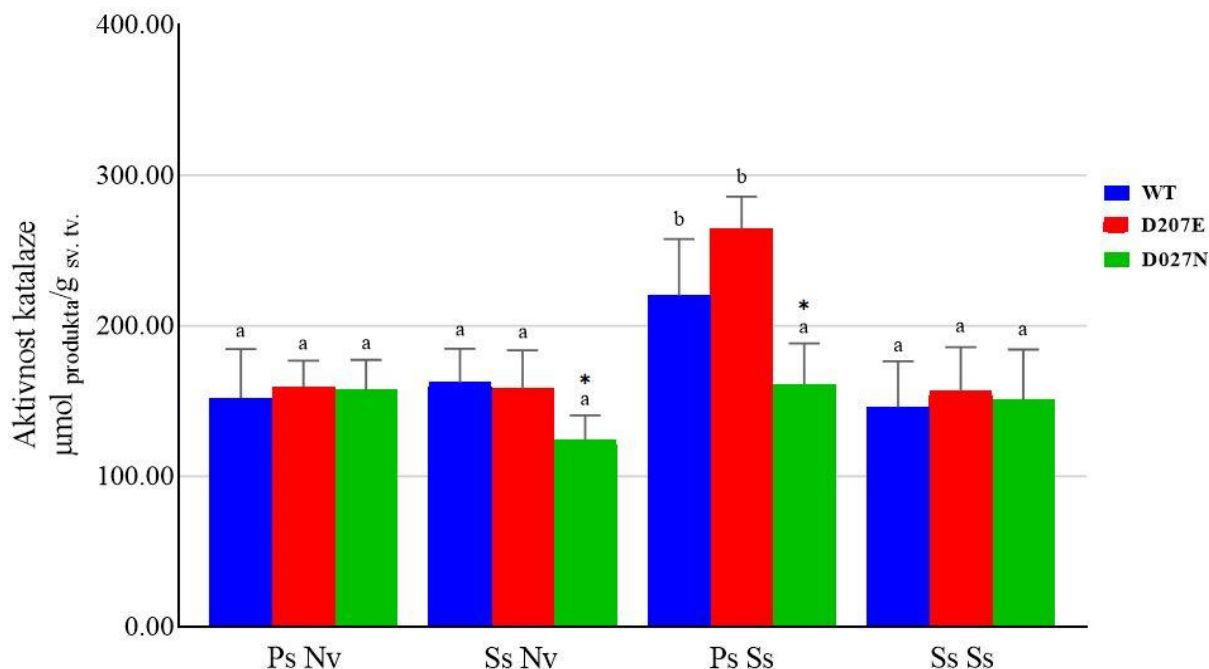
4.3.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima

Spektrofotometrijskom analizom odredila sam aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX. Pri normalnoj vlazi obje mutantne linije pokazale su značajno smanjenje aktivnosti SOD-a na prosijanom supstratu, a povećanje aktivnosti enzima na sušenom supstratu. Pri uvjetima sušnog stresa došlo je do povećanja aktivnosti enzima za liniju D207N na sušenom supstratu, te do smanjenja aktivnosti na prosijanom supstratu u odnosu na WT. Linija D207E pokazala je pad aktivnosti na sušenom supstratu. Aktivnost enzima bila je manja u uvjetima sušnog stresa, što je bilo izraženije na sušenom supstratu nego na prosijanom. Najveća aktivnost enzima bila je prisutna na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi (Slika 63).



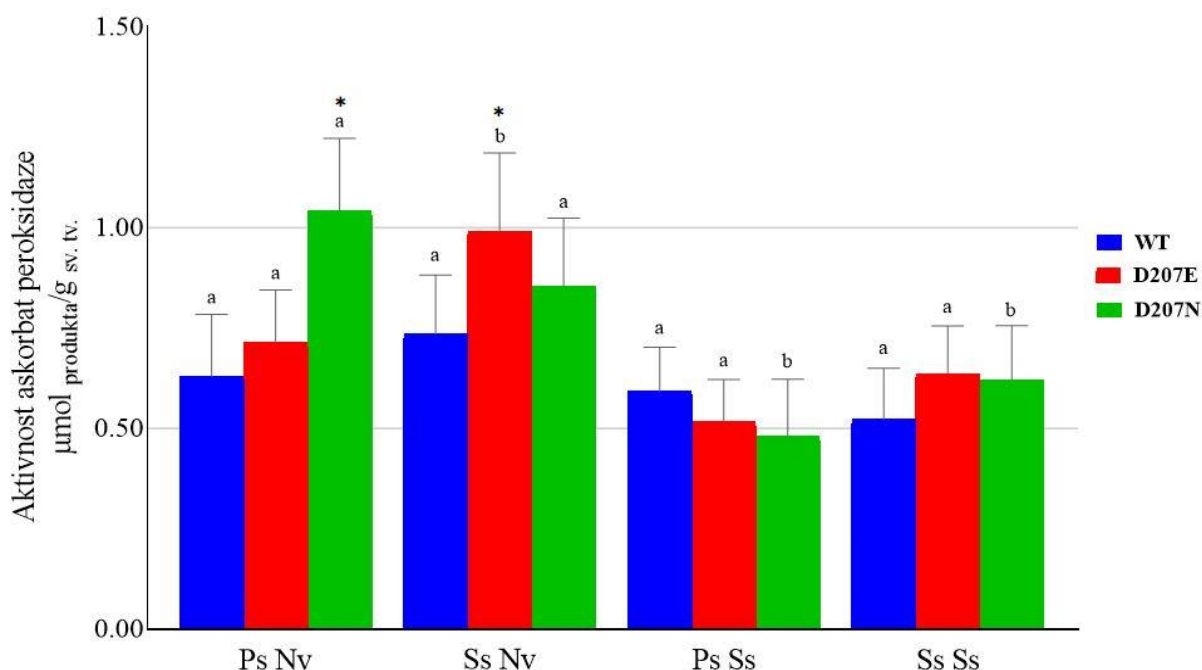
Slika 63. Aktivnost superoksid dismutaze u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju CAT došlo je do značajnih promjena aktivnosti enzima za liniju D207E u vidu pada na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi i prosijanom supstratu pri uvjetima sušnog stresa. Na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa linije WT i D207E pokazale su značajan porast aktivnosti enzima u odnosu na ostale uvjete uzgoja (Slika 64).



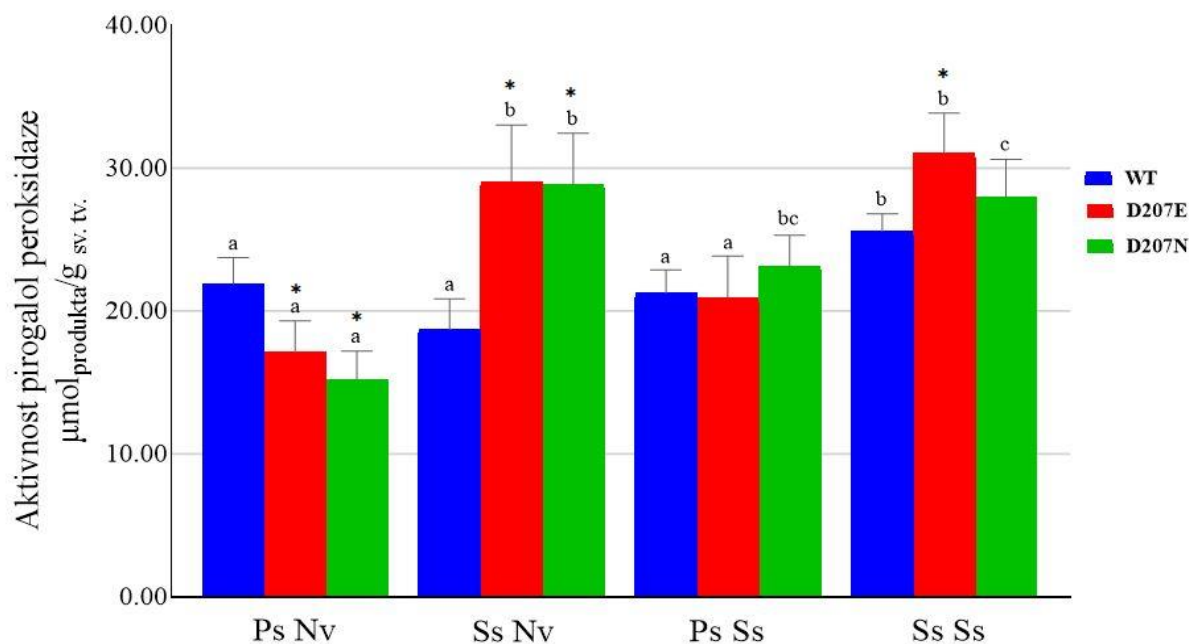
Slika 64. Aktivnost katalaze u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutančnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

U slučaju APX pri normalnoj vlazi došlo je do značajnog povećanja aktivnosti enzima za liniju D207N na prosijanom supstratu i za liniju D207E na sušenom supstratu u odnosu na WT. Linija D207E pokazala je i značajno povećanje aktivnosti na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi u odnosu na ostale uvjete uzgoja. Linija D207N pokazala je značajno povećanje aktivnosti u uvjetima normalne vlage u odnosu na uvjete sušnog stresa. Aktivnost enzima bila je veća kod biljaka uzgajanih u uvjetima normalne vlage u usporedbi s uvjetima sušnog stresa (Slika 65).



Slika 65. Aktivnost askorbat peroksidaze u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

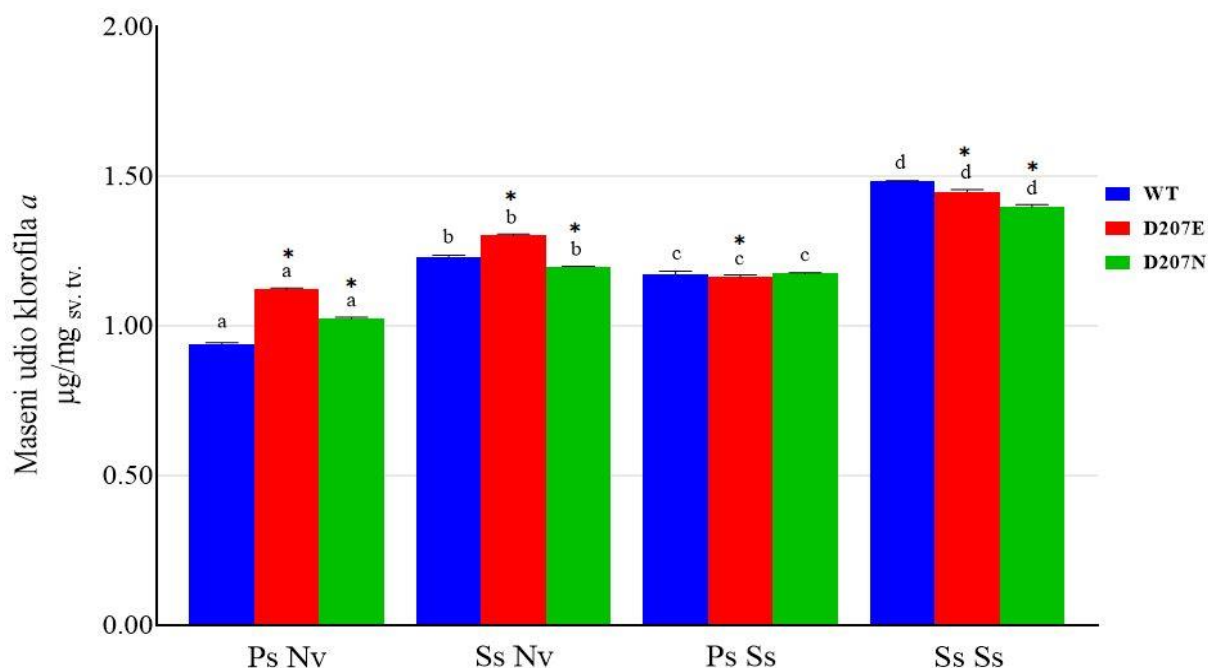
U slučaju PPX došlo je do značajnog povećanja aktivnosti enzima kod obje mutantne linije na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi, te za liniju D207E na sušenom supstratu pri uvjetima sušnog stresa. Na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi došlo je do značajnog pada aktivnosti enzima za obje mutantne linije u odnosu na WT. Linija WT pokazala je značajno povećanje aktivnosti na sušenom supstratu pri uvjetima sušnog stresa u odnosu na ostale uvjete uzgoja. Linija D207E pokazala je manju aktivnost enzima na prosijanim supstratima u odnosu na sušene supstrate na oba uvjeta uzgoja (Slika 66).



Slika 66. Aktivnost pirogalol peroksidaze u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

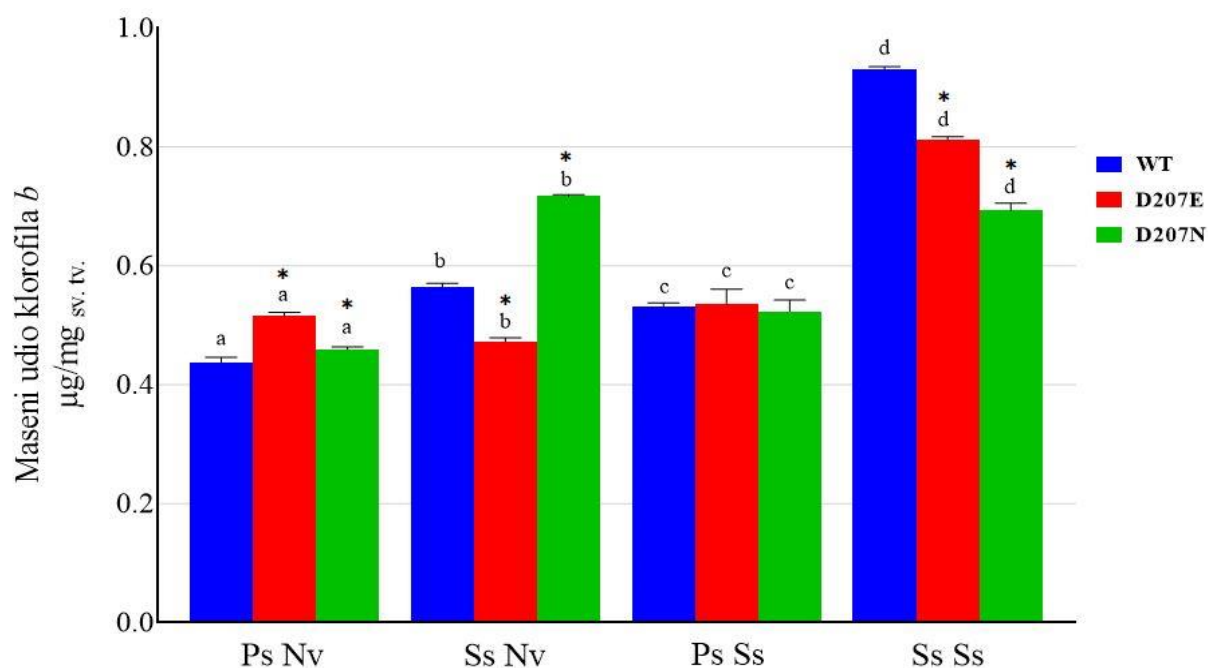
4.3.3. Udio fotosintetskih pigmenata

Spektrofotometrijskom analizom odredila sam udio fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida. Kod obje mutantne linije udio klorofila *a* pri normalnoj vlazi bio je značajno povećana, osim u slučaju linije D207N na sušenom supstratu gdje je bio smanjen u odnosu na WT. S druge strane, u uvjetima sušnog stresa udio je bio značajno smanjen, također s iznimkom linije D207N na prosijanom supstratu gdje nije bilo značajne razlike u usporedbi s WT. Sve linije su pokazale razlike u udjelu klorofila *a* između uvjeta uzgoja, s najvećim udjelom na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa (Slika 67).



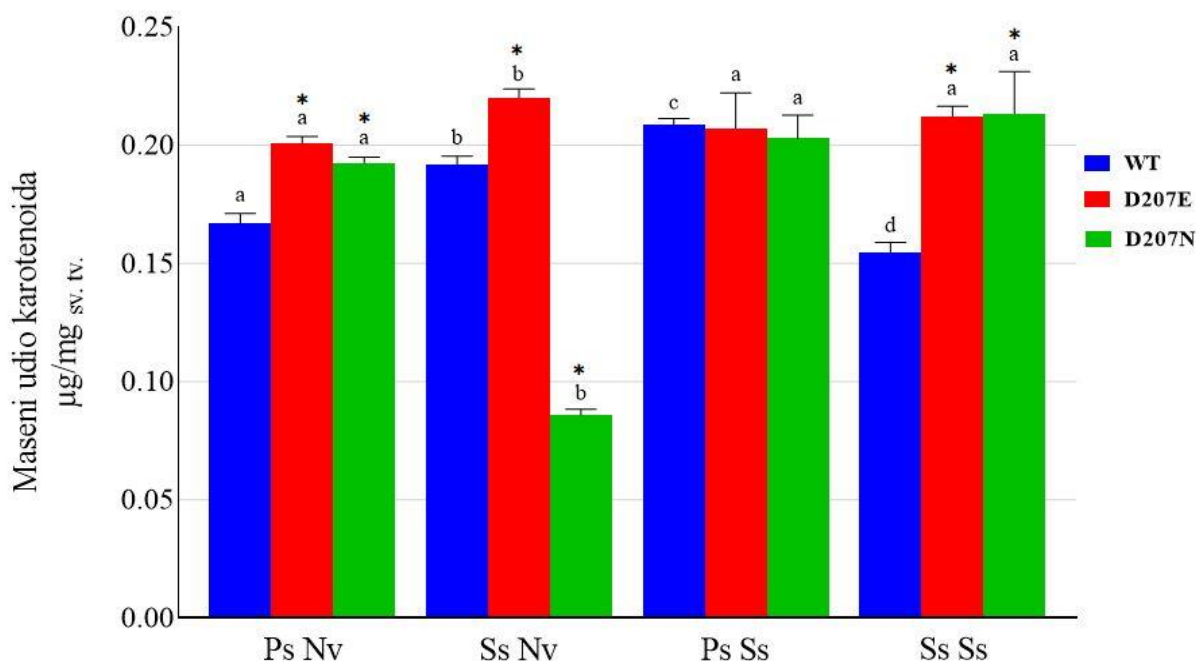
Slika 67. Maseni udio klorofila *a* u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Udio klorofila *b* bio je pri normalnoj vlazi značajno povećana u mutantnim linijama s iznimkom linije D207E na sušenom supstratu gdje je bio smanjen. U uvjetima sušnog stresa došlo je do značajnog smanjenja udjela klorofila *b* na sušenom supstratu za obje mutantne linije u odnosu na WT. Sve linije pokazale su razlike u udjelu klorofila *b* između uvjeta uzgoja, s najvećim udjelom na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa (Slika 68).



Slika 68. Maseni udi klorofila *b* u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Udio ukupnih karotenoida bio je pri normalnoj vlazi značajno povećana u svim slučajevima s iznimkom mutantne linije D207N na sušenom supstratu gdje je bio smanjen. U uvjetima sušnog stresa došlo je do povećanja udjela na sušenom supstratu za obje mutantne linije u odnosu na WT. Linija WT pokazala je razlike u udjelu karotenoida između svih uvjeta uzgoja, dok su mutantne linije pokazale razliku samo na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi, pri čemu je linija D207E pokazala povećanje, a linija D207N smanjenje udjela (Slika 69).



Slika 69. Maseni udio ukupnih karotenoida u linijama WT, D207E i D207N. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), Ps Nv – prosijani supstrat i normalna vlaga, Ss Nv – sušeni supstrat i normalna vlaga, Ps Ss – prosijani supstrat i sušni stres, Ss Ss – sušeni supstrat i sušni stres.

Uočila sam promjene udjela ukupnog klorofila, omjera klorofila *a* i klorofila *b*, te omjera ukupnih karotenoida i ukupnog klorofila s obzirom na uzgojne supstrate i uvjete uzgoja. Udio ukupnih klorofila u odnosu na WT za mutantne linije bio je veći na prosijanom supstratu pri uvjetima normalne vlage, a manji na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. Na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi, u usporedbi WT-om, linija D207E je pokazala smanjenje udjela ukupnih klorofila, a linija D207N povećanje. Između uvjeta uzgoja sve linije pokazale su najveći porast ukupnih klorofila na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. U slučaju omjera klorofila obje mutantne linije pokazale su povećanje na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi i na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na WT, a linija D207N i smanjenje na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi. Omjer ukupnih karotenoida i ukupnog klorofila kod obje je mutantne linije bio veći u usporedbi s linijom WT na prosijanom supstratu pri uvjetima normalne vlage i na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa, a kod

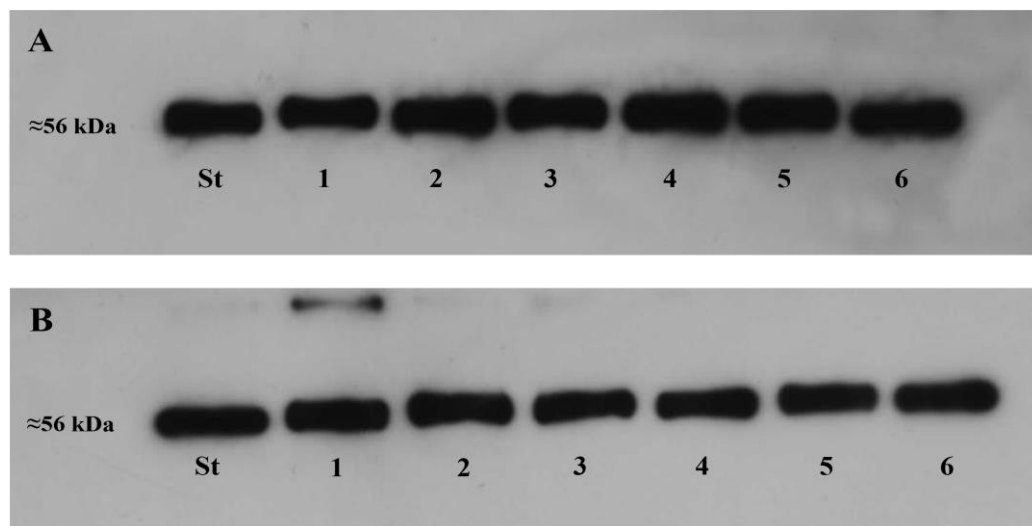
linije D207N i manji na sušenom supstratu pri uvjetima normalne vlage. Omjeri su varirali između uvjeta uzgoja (Tablica 5).

Tablica 5. Omjer fotosintetskih pigmenata i ukupni klorofil za linije WT, D207E i D207N na prosijanom i sušenom supstratu te normalnoj vlazi i uvjetima sušnog stresa. Prikazana je srednja vrijednost 9 uzoraka $\pm$ standardna devijacija. Pokus je proveden tri puta s tri različite replike. Statistički značajna razlika u usporedbi mutantnih linija s WT označena je * pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Dunnettovoj statističkoj analizi. Statistički značajna razlika između istih linija pri različitim uvjetima uzgoja označena je različitim slovima pri vrijednosti $P < 0,05$ prema ANOVA testu i Tukey statističkoj analizi. Car – karotenoidi, Chl – klorofil, D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

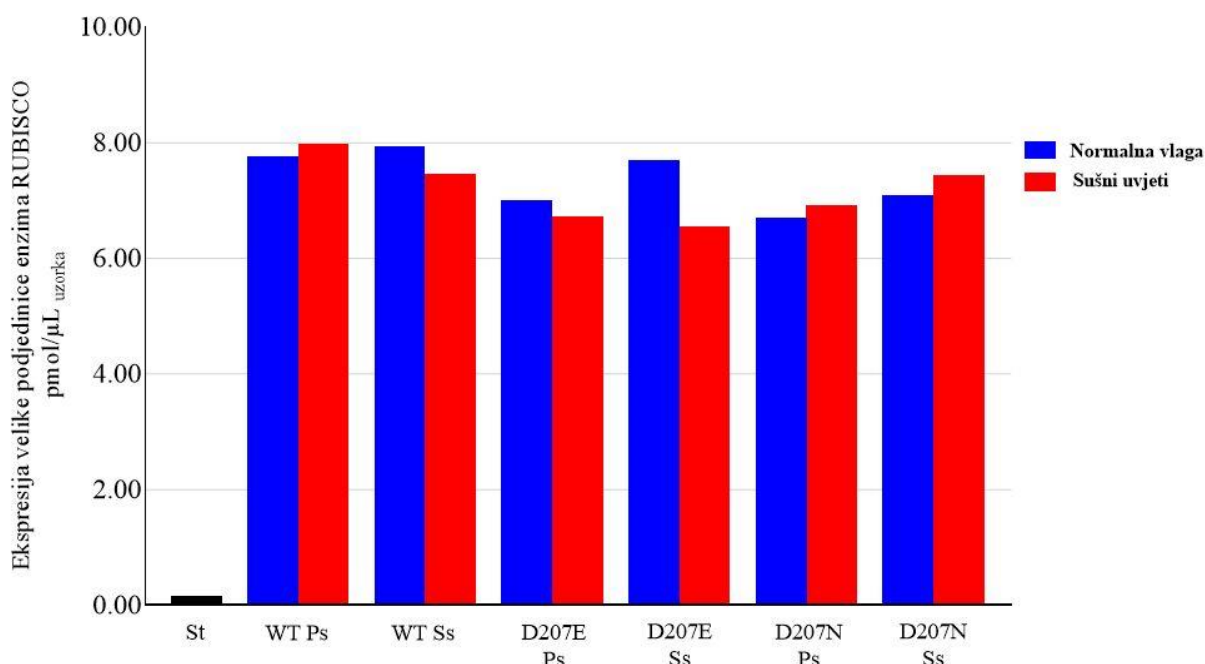
	Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>		Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i> $\mu\text{g}/\text{mg}$		Car / (Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i>)	
Normalna vlaga						
WT	2,151 $\pm$ 0,05	a	1,377 $\pm$ 0,01	a	0,121 $\pm$ 0,01	a
prosijani supstrat						
D207E	2,174 $\pm$ 0,03	a	1,638 $\pm$ 0,01	*	0,123 $\pm$ 0,01	a
prosijani supstrat				a		
D207N	2,231 $\pm$ 0,03	*	1,483 $\pm$ 0,01	*	0,130 $\pm$ 0,01	*
prosijani supstrat		a		a		a
WT	2,183 $\pm$ 0,03	b	1,795 $\pm$ 0,01	b	0,107 $\pm$ 0,01	b
sušeni supstrat						
D207E	2,755 $\pm$ 0,04	*	1,776 $\pm$ 0,01	*	0,124 $\pm$ 0,01	*
sušeni supstrat		b		b		a
D207N	1,669 $\pm$ 0,01	*	1,914 $\pm$ 0,01	*	0,045 $\pm$ 0,01	*
sušeni supstrat		b		b		b
Sušni stres						
WT	2,205 $\pm$ 0,02	c	1,705 $\pm$ 0,01	c	0,064 $\pm$ 0,01	c
prosijani supstrat						
D207E	2,172 $\pm$ 0,1	a	1,697 $\pm$ 0,02	c	0,094 $\pm$ 0,01	b
prosijani supstrat						
D207N	2,240 $\pm$ 0,09	a	1,698 $\pm$ 0,02	c	0,102 $\pm$ 0,01	c
prosijani supstrat						
WT	1,592 $\pm$ 0,01	d	2,413 $\pm$ 0,01	d	0,122 $\pm$ 0,01	a
sušeni supstrat						
D207E	1,783 $\pm$ 0,02	*	2,260 $\pm$ 0,01	*	0,122 $\pm$ 0,01	*
sušeni supstrat		c		d		a
D207N	2,016 $\pm$ 0,04	*	2,090 $\pm$ 0,01	*	0,120 $\pm$ 0,01	*
sušeni supstrat		c		d		d

4.3.4. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO

Mutantna linija D207N pokazala je veću ekspresiju enzima RUBISCO u uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu. Mutantne linije su pokazale manju ekspresiju enzima RUBISCO u odnosu na WT pri svim uvjetima uzgoja. U uvjetima sušnog stresa, linija D207N pokazala je nešto veću ekspresiju od linije D207E (Slike 70 i 71).



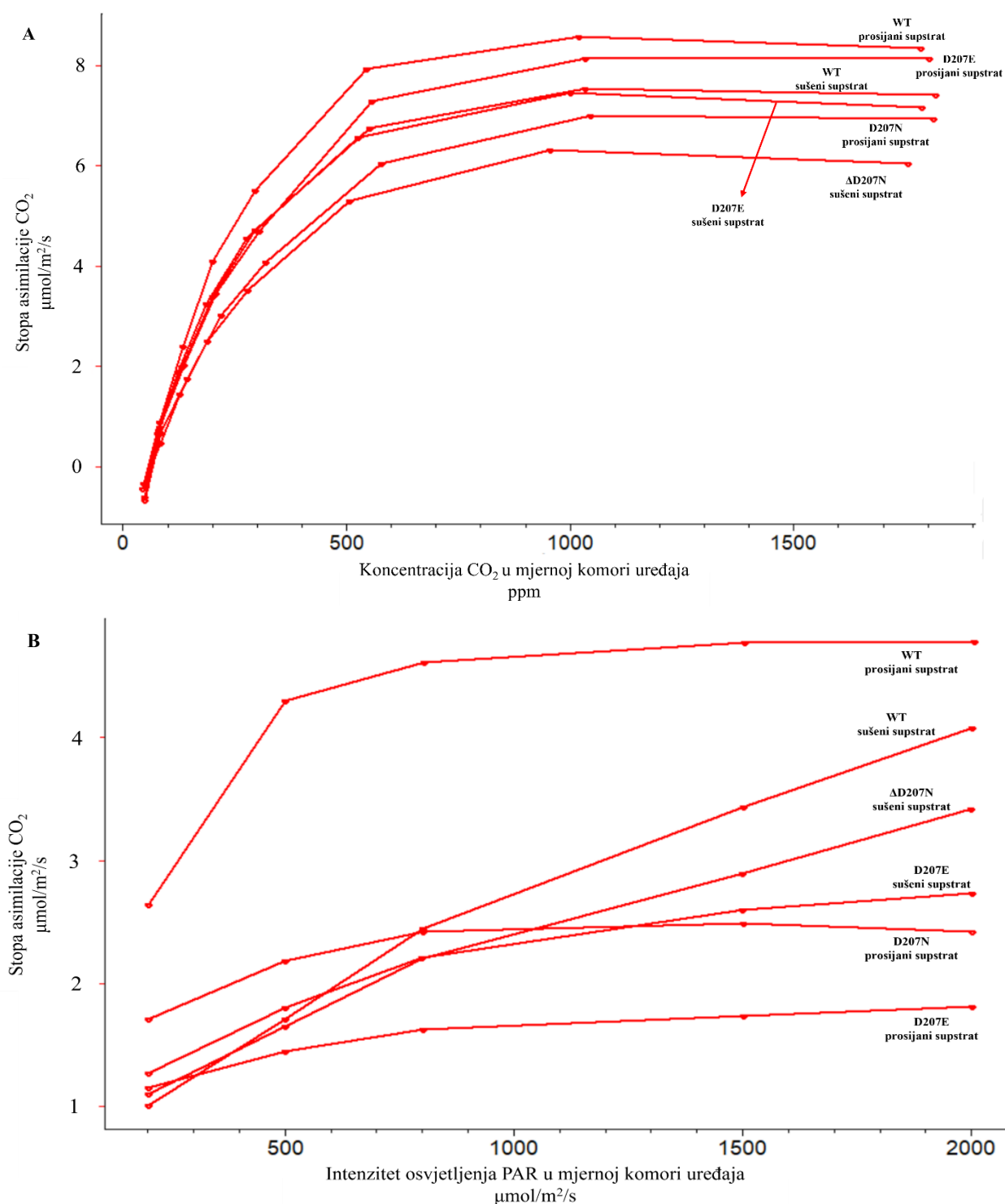
Slika 70. Ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO u linijama WT, D207E i D207N. A) normalna vlaga. St – standard, 1 – D207N sušeni supstrat, 2 – D207N prosijani supstrat, 3 – D207E sušeni supstrat, 4 – D207E prosijani supstrat, 5 – WT sušeni supstrat, 6 – WT prosijani supstrat. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l, a uzorka 2 μ l; B) sušni stres. St – standard poznate koncentracije velike podjedinice enzima RUBISCO, 1 – WT prosijani supstrat, 2 – WT sušeni supstrat, 3 – D207E prosijani supstrat, 4 – D207E sušeni supstrat, 5 – D207N prosijani supstrat, 6 – D207N sušeni supstrat. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l, a uzorka 2 μ l.



Slika 71. Kvantifikacija intenziteta obojenja u linijama WT, D207E i D207N. Prikazane su kvantificirane vrijednosti pruga dobivenih na filmu. Volumen nanesenog standarda je 5 μ l (0,75pmol), a uzorka 2 μ l. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*), PsNv – prosijani supstrat i normalna vlaga, SsNv – sušeni supstrat i normalna vlaga, PsSs – prosijani supstrat i sušni stres, SsSs – sušeni supstrat i sušni stres.

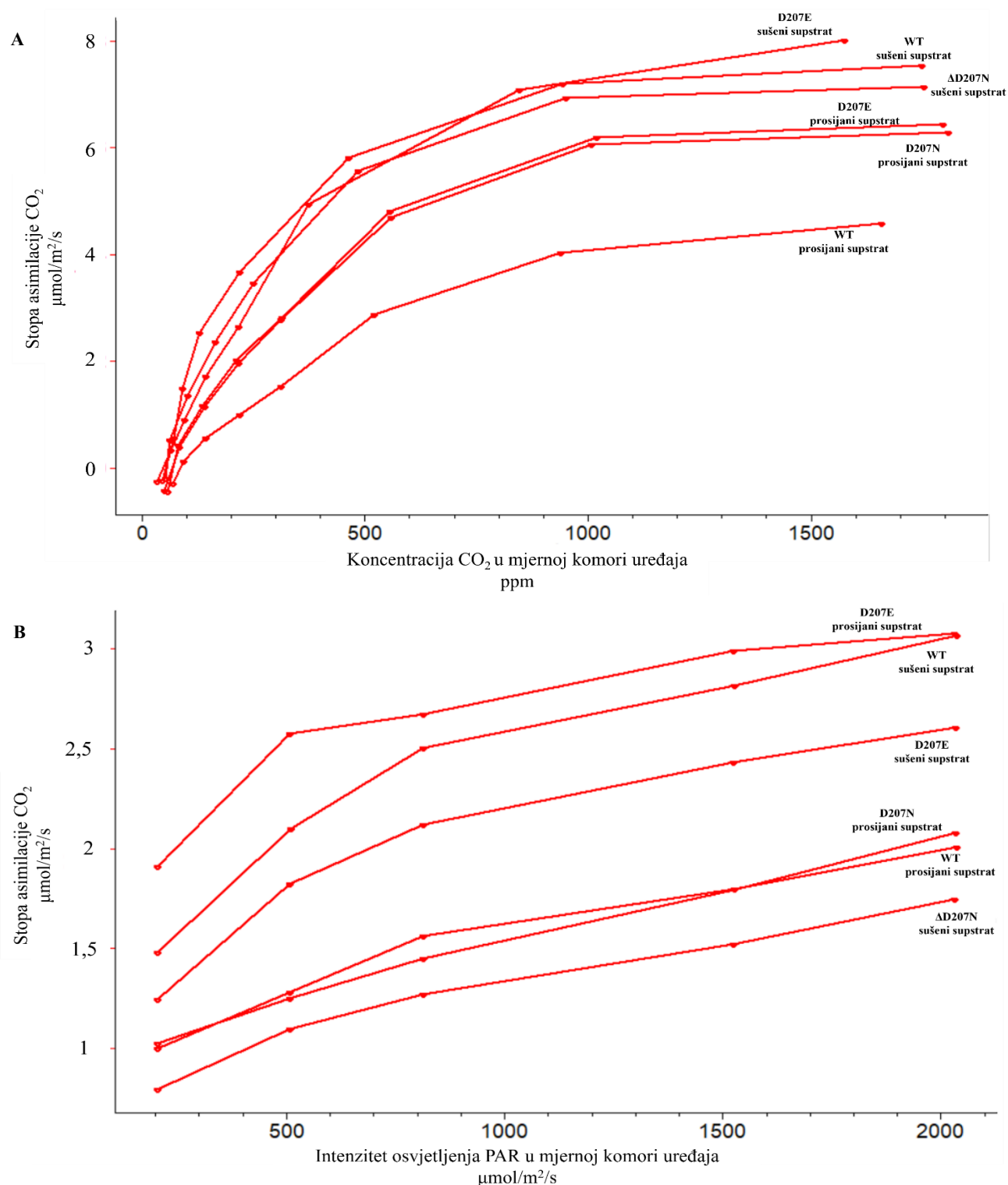
4.3.5. Promjene parametara fotosintetske izmjene plinova

Kod mjerenja stope asimilacije CO_2 u biljkama, u ovisnosti o različitim koncentracijama CO_2 (500, 1000, 1500, 1750 ppm CO_2) u mjernoj komori uređaja, u uvjetima normalne vlage mutantne linije na oba tipa supstratu imale su manju stopu asimilacije CO_2 u odnosu na WT. Uglavnom sam mogla primijetiti pad stope asimilacije CO_2 na koncentracijama CO_2 u mjernoj komori uređaja višima od ≈ 1000 ppm (Slika 72, A). Kod mjerenja stope asimilacije CO_2 , u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja (PAR 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) u mjernoj komori uređaja, u uvjetima normalne vlage, mutantne linije također su imale manju stopu asimilacije CO_2 u odnosu na WT na oba tipa supstrata. Pad stope asimilacije CO_2 mogla sam uočiti kod mutantne linije D207N na prosijanom supstratu (Slika 72, B).



Slika 72. Izmjerena stopa asimilacije CO₂ u ovisnosti o A) različitim koncentracijama CO₂; B) različitim intenzitetima osvjjetljenja za linije WT, D207E i D207N na prosijanom i sušenom supstratu u uvjetima normalne vlage. Navedene vrijednosti koncentracije CO₂ ppm i intenziteta osvjjetljenja (PAR (*eng. photosynthetically active radiation*) μmol/m²/s) na osi X odnose se na uvijete u mjernoj komori uređaja GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Točke na grafu prikazuju prosječne vrijednosti mjerenja stope asimilacije CO₂ na tri različite biljne replike. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

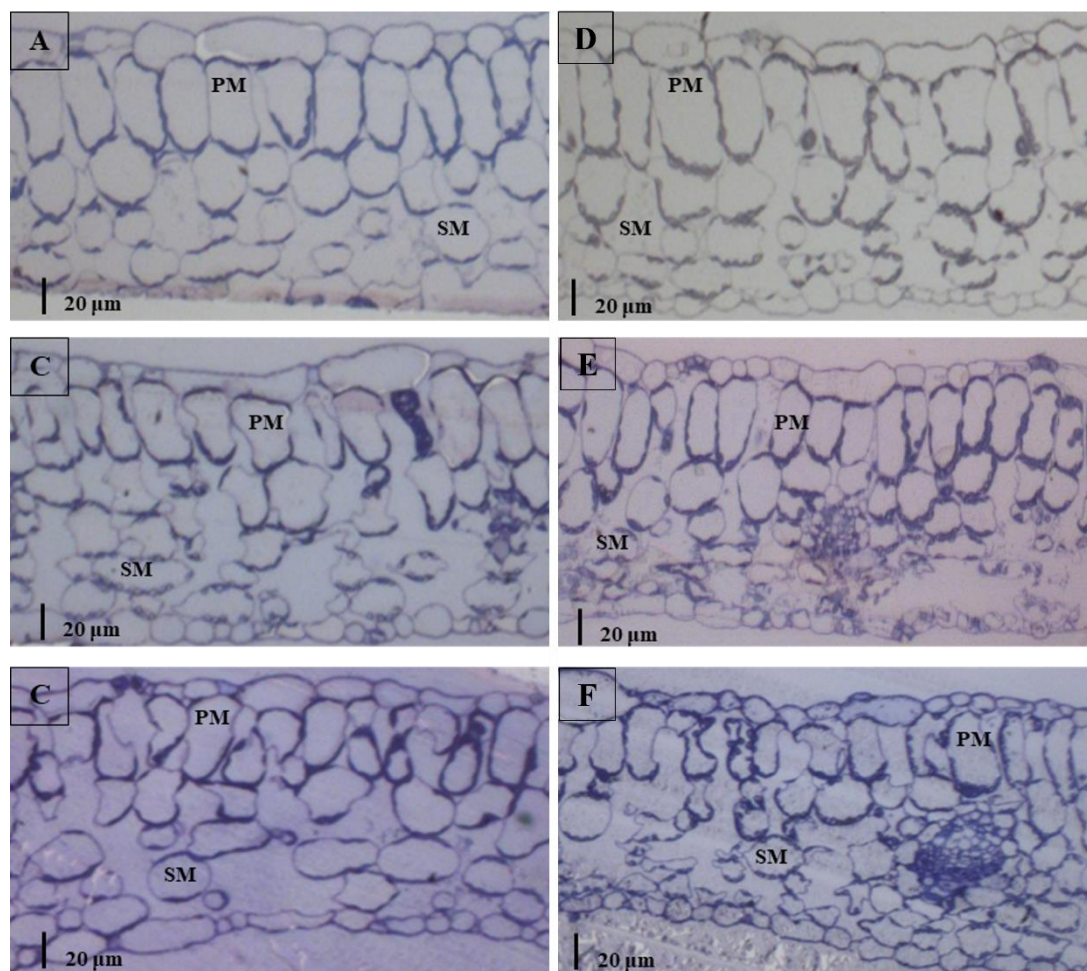
Kod mjerenja stope asimilacije CO₂ u biljkama, u ovisnosti o različitim koncentracijama CO₂ (500, 1000, 1500, 1750 ppm CO₂) u mjernoj komori uređaja, u uvjetima sušnog stresa, mutantne linije imale su veću stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT na prosijanom supstratu. Na sušenom supstratu linija D207N imala je manju, a linija D207E veću stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT. Generalno, biljke na prosijanom supstratu imale su manju stopu asimilacije CO₂ u odnosu na sušeni supstrat. U nijednoj liniji nisam mogla primijetiti pad stope asimilacije CO₂ (Slika 73, A). Kod mjerenja stope asimilacije CO₂ u biljkama, u ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja (PAR 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) u mjernoj komori uređaja, u uvjetima sušnog stresa, na prosijanom supstratu mutantne linije imale su veću, a na sušenom supstratu manju stopu asimilacije CO₂ u odnosu na WT. U nijednoj liniji nisam mogla primijetiti pad stope asimilacije CO₂ (Slika 73, B). Usporedbom biljaka uzgajanih u uvjetima normalne vlage i u uvjetima sušnog stresa, pri različitim intenzitetima osvjetljenja, stopa asimilacije CO₂ bila je veća pri normalnoj vlazi (Slike 72 i 73).



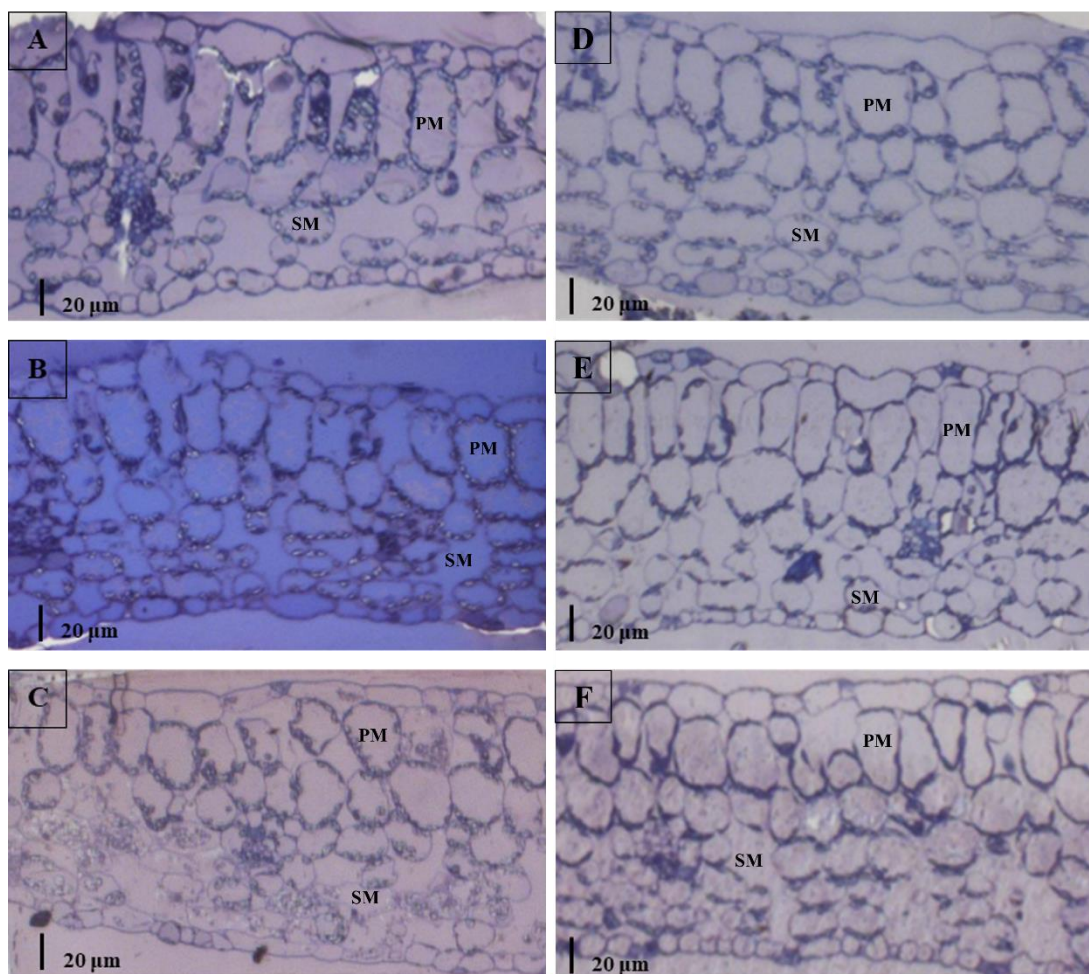
Slika 73. Izmjerena stopa asimilacije CO₂ u ovisnosti o A) različitim koncentracijama CO₂; B) različitim intenzitetima osvjetljenja za linije WT, D207E i D207N na prosijanom i sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. Navedene vrijednosti koncentracije CO₂ ppm i intenziteta osvjetljenja (PAR (*eng. photosynthetically active radiation*) μmol/m²/s) na osi X odnose se na uvijete u mjernoj komori uređaja GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Njemačka). Točke na grafu prikazuju prosječne vrijednosti mjerenja stope asimilacije CO₂ na tri različite biljne replike. D207E – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen glutaminskom kiselinom, D207N – mutanta u kojoj je aspartat 207 domene RHO zamijenjen asparaginom, WT – divlji tip (*eng. wild type*).

4.3.6. Promjene u anatomiji lista

Kod biljaka uzgajanih u uvjetima normalne vlage WT, je imao veće stanice u odnosu na mutantne linije, a kod mutantnih linija pojavili su se i nepravilni oblici stanica. Kod mutantnih linija stanice spužvastog mezofila bile su manje i kompaktnije pogotovo kod biljaka uzgajanih na sušenom supstratu u usporedbi s WT-om (Slika 74). Kod biljaka uzgajanih u uvjetima sušnog stresa kloroplasti su bili veći i brojniji, a stanice manje, ali pravilnijeg oblika (Slika 75).



Slika 74. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista u linijama WT, D207E i D207N. Normalna vlaga A) WT prosijani supstrat; B) D207E prosijani supstrat; C) D207N prosijani supstrat; D) WT sušeni supstrat; E) D207E sušeni supstrat; F) D207N sušeni supstrat. PM – palisadni mezofil, SM – spužvasti mezofil. Mjerna oznaka 20 μm .



Slika 75. Svjetlosna mikroskopija poludebelih prereza lista u linijama WT, D207E i D207N. Sušni stres A) WT prosijani supstrat; B) D207E prosijani supstrat; C) D207N prosijani supstrat; D) WT sušeni supstrat; E) D207E sušeni supstrat; F) D207N sušeni supstrat. PM – palisadni ezofil, SM – spužvasti mezofil. Mjerna oznaka 20 μm.

5. RASPRAVA

U središtu ovog doktorskog rada bilo je istraživanje antioksidacijske obrane i prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta u biljkama s mutacijama ključnih segmenata proteina TROL koje utječu na dinamiku vezanja proteinskog para TROL-FNR. Istraživanje sam provela na biljci *A. thaliana* (L.) Heynh uzgojenoj na dva tipa supstrata, prosijanom i prosijanom osušenom, u uvjetima normalne vlage i sušnog stresa. Biljke se suočavaju s raznim stresnim uvjetima u okolišu, ali ih uspješno savladavaju zahvaljujući brojnim obrambenim mehanizmima (147). Vezanje i pozicioniranje komponenti fotosintetskih kompleksa dinamični su procesi koji se prilagođavaju okolišnim promjenama, osobito u stresnim uvjetima poput suše (148). Jedan od kompleksa s obrambenim mehanizmom djelovanja, ispitivan u ovom istraživanju, je TROL-FNR. Analizirala sam utjecaj interakcije para TROL-FNR na nastanak i uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta, fotosintetsku učinkovitost te strukturu fotosintetskog tkiva. FNR je homodimerni flavoenzim koji s proteinom TROL tvori dinamičan kompleks na tilakoidnim membranama, važan za učinkovit linearni tok elektrona i sintezu NADPH, a time posredno i za odvijanje Calvin-Bensonova ciklusa i fiksaciju CO₂. Predloženi modeli vezanja ovog proteinskog para uključuju ovisnost o pH vrijednosti i redoks stanju strome te transmembranskoj signalizaciji neaktivne domene RHO (4, 135). Gubitak aktivnosti proteina TROL dodatno je povezan s promjenama u ekspresiji 237 jezgrinih gena uključenih u sintezu NADPH i odgovor na stres, što upućuje na njegovu širu ulogu u koordinaciji fotosintetskog i stresnog odgovora stanice (5).

U početku valja napomenuti da je linija WT pokazala određenu varijabilnost parametara između pojedinih mjerenja, što se može povezati s uzgojem biljaka u tri odvojena eksperimentalna ciklusa. Ovakve varijabilnosti nisu iznenađujuće pri istraživanju živih organizama. Unatoč tome, eksperimenti su omogućili reproducibilnu interpretaciju eksperimentalnih rezultata.

5.1. Funkcionalne posljedice mutacija TROL KO i TROL ΔRHO

Prisutnost i distribuciju tri učestale reaktivne kisikove vrste ispitala sam pomoću lokalizacije konfokalnom mikroskopijom. Time sam testirala hipotezu da je alternativno usmjeravanje elektrona u stresnim uvjetima povezano s dinamičkim vezanjem para TROL-FNR (5, 151, 152). Istraživanja Vojta i sur. 2012, 2015 (4, 135), u uvjetima pojačanog intenziteta osvjjetljenja predložila su mehanizam otpuštanja FNR-a s proteina TROL transmembranskom signalizacijom i prijenos elektrona alternativnim primateljima koji rezultira smanjenim nastankom reaktivnih kisikovih vrsta (135), te uspješnu detoksikaciju O₂^{•-} i nakon tretmana s

metil-viologenom (MV), u liniji TROL KO u usporedbi s WT-om (4). Rezultati ovog rada po prvi put pokazali su prostornu raspodjelu reaktivnih kisikovih vrsta u uvjetima sušnog stresa. $O_2^{\bullet-}$ primarno nastaje u području PSI, u neposrednoj blizini proteina TROL (20). Kolokalizacija para TROL-FNR s područjem nastajanja $O_2^{\bullet-}$ podupire hipotezu o zaštitnoj ulozi para u stresnim uvjetima, kada su alternativni tokovi elektrona preferirani (4, 145). Linija TROL KO, koja ima smanjenu ekspresiju proteina TROL pokazala je najveću učinkovitost u detoksikaciji $O_2^{\bullet-}$. To se očitovalo značajnim smanjenjem signala $O_2^{\bullet-}$ u uvjetima sušnog stresa u usporedbi s WT-om, unatoč tome što je i linija WT očekivano pokazala različit signal $O_2^{\bullet-}$ ovisno o uvjetima uzgoja. Navedeno se podudara s prethodnom EPR analizom Vojta, 2015 (4), koja je pokazala uspješnu detoksikaciju $O_2^{\bullet-}$ u biljkama TROL KO i nakon tretmana herbicidom MV, koji snažno potiče nastajanje $O_2^{\bullet-}$ (5, 152). Time je naglašeno da smanjeno vezanje FNR-a za protein TROL povećava dostupnost topivog FNR-a u stromi koji velikom brzinom i učinkovito uklanja $O_2^{\bullet-}$ prije širenja kroz stanice i organele. Podudarnost rezultata dobivenih različitim metodološkim pristupima dodatno je istaknula povećanu detoksikacijsku sposobnost linije TROL KO. Rezultati ovog istraživanja istaknuli su značaj dinamike vezanja para TROL-FNR s kontrolom nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta i predstavljaju važan doprinos razumijevanju molekularnih mehanizama prilagodbe biljaka sušnom stresu. Slični zaštitni učinci opisani su i u istraživanjima povećane ekspresije i otpuštanja FNR-a s tilakoidnih membrana u pšenici i duhanu (153, 154), kao i u drugim organizmima, uključujući vrste *Escherichia coli* (155-158) i *Chlamydomonas reinhardtii* (159), te tijekom sušnog stresa (160) i visokog osvjetljenja (24) kod biljke *A. thaliana* (L.) Heynh. Povećana ekspresija FNR-a ne mora značajno povećati stopu fotoredukcije $NADP^+$ ili asimilacije CO_2 , ali povećava toleranciju na oštećenja zbog veće prisutnosti stromalnog FNR-a (153). Rezultate ovog istraživanja potvrđuju i istraživanja smanjenje količine FNR-a koja su povezana s klorozom, lipidnom peroksidacijom, smanjenjem fotosintetske aktivnosti i rasta čak i pri umjerenom osvjetljenju (116, 161-163). Linija TROL Δ RHO u uvjetima sušnog stresa također je pokazala smanjeni signal $O_2^{\bullet-}$, ali ne značajan kao u slučaju linije TROL KO. Valja napomenuti da je signal $O_2^{\bullet-}$ u uvjetima sušnog stresa bio veći u odnosu na uvjete normalne vlage, ali do značajnog smanjenja signala kod mutanti došlo je u uvjetima sušnog stresa u odnosu na WT. Ovo je potvrdilo aktivaciju alternativnih zaštitnih mehanizama u stresu. Dobiveni rezultati potaknuli su pitanje o potencijalnom zaštitnom utjecaju različitih mutacija proteina TROL od različitih reaktivnih kisikovih vrsta. Iako je H_2O_2 sekundarni glasnik (164), u kloroplastima u povećanoj količini nastaje prilikom stresnih uvjeta u području PSI, Mehlerovom reakcijom (117) i kao produkt redukcije $O_2^{\bullet-}$ (78). Ovo istraživanje pokazalo je značajno smanjenje

signala H_2O_2 u liniji TROL ΔRHO , kojoj nedostaje 13 AK domene RHO, na oba tipa uzgojnog supstrata u uvjetima sušnog stresa u odnosu na WT. Rezultati su istaknuli važnu ulogu domene RHO u redoks signalizaciji između lumena i strome, koja utječe na dinamiku vezanja para TROL-FNR. Struktura domene RHO proteina TROL detektirana nuklearnom magnetskom rezonancom pokazala je vezno mjesto koje odgovara plastokinonu (165). Kinoni mogu inaktivirati cistein-ovisne protein-fosfataze reverzibilnom oksidacijom katalitičkog cisteina u njihovom aktivnom mjestu, čime se mijenja regulacija reverzibilne fosforilacije fotosintetskih proteina (166). U svjetlu dobivenih rezultata, takav mehanizam može predstavljati molekularnu osnovu redoks signalizacije koja omogućuje prilagodbu fotosintetskog aparata i učinkovitu kontrolu H_2O_2 u stresnim uvjetima. Kod linije TROL KO nisam uočila smanjenje signala H_2O_2 što ponovno ukazuje da mutacije različitih segmenata proteina TROL na različite načine utječu na aktivnost antioksidacijske obrane. Uz to izostanak detoksikacije H_2O_2 u uvjetima normalne vlage ponovno ukazuje na aktivaciju alternativnih tokova elektrona i antioksidacijske zaštite putem para TROL-FNR u stresnim uvjetima. $^1\text{O}_2$ prvo je pobuđeno stanje O_2 , većinom se sintetizira u području PSII interakcijom O_2 s tripletnim klorofilom, a sintezu može dodatno pojačati lipidna peroksidacija koja omogućuje generiranje $^1\text{O}_2$. Peroksidaze (PRX33, PRX34, APX, gvajakol peroksidaza) i lipoksigenaze (LOX2, LOX3, LOX4) posredno sudjeluju u sintezi $^1\text{O}_2$. Lipoksigenaze kataliziraju nastanak lipidnih hidroperoksida, čija daljnja razgradnja, uključujući peroksidazno posredovane reakcije, može dovesti do nastanka lipidnih peroksilnih radikala čija rekombinacija može generirati $^1\text{O}_2$ (76, 167, 168). $^1\text{O}_2$ je specifičan jer ne nastaje prijenosom elektrona na O_2 , a za razliku od ranije navedenih reaktivnih kisikovih vrsta ne uklanja se pomoću antioksidacijskih enzima (168, 169). Glavni mehanizmi detoksikacije su fizičko i kemijsko gašenje (170). U ovoj specifičnosti $^1\text{O}_2$ potencijalno leži i razlog zašto nijedna ispitivana linija nije pokazala znatno smanjenje signala $^1\text{O}_2$ u uvjetima sušnog stresa. Također, povećane razine $^1\text{O}_2$ i H_2O_2 mogle su uputiti na signaliziranje putem reaktivnih kisikovih vrsta koje potiče ekspresiju gena odgovornih za adaptaciju na stres, popravak štete u stanicama i kontrolu otvorenosti puči (149). S ovim rezultatima slažu se i istraživanja na TROL OX biljkama (138) koje se suprotno TROL KO biljkama ne mogu oduprijeti nastajanju reaktivnih kisikovih vrsta jer je veća količina FNR-a vezana za membrane putem proteina TROL (151, 152). U istraživanju Vojta i sur. (152), TROL OX mutanta pokazala je povećanu proizvodnju $\text{O}_2^{\cdot-}$ na različitim uvjetima osvjetljenja, ali ponovno i smanjenje $\text{O}_2^{\cdot-}$ nakon izlaganja MV. Navedeno podupire model prema kojem prekomjerno vezanje FNR-a ograničava detoksikaciju reaktivnih kisikovih vrsta (135), a posredovano je povećanom ekspresijom proteina TROL, ali i da u uvjetima povećanog stresa i dalje dolazi do aktivacije alternativne

obrane posredovane dinamičkim vezanjem para TROL-FNR. U prethodnim istraživanjima (5) pokazani su rezultati PAM (*eng. pulse amplified modulation*) mjerenjima stope prijenosa elektrona. Važno je napomenuti da su rezultati tih istraživanja pokazali kako u uvjetima normalnog intenziteta osvjetljenja stopa prijenosa elektrona nije smanjena kod TROL KO biljaka, štoviše one pokazuju uspješnije fenotipske karakteristike u odnosu na WT (5). Stopa LET ograničava TROL-FNR dinamiku vezanja pri visokom PAR koji uzrokuje otpuštanje FNR s proteina TROL (4). Ovim istraživanjem hipoteza o uključenosti proteinskog para TROL-FNR i njegovog dinamičkog vezanja u antioksidacijskoj obrani pri stresnim uvjetima potvrđena je od strane već trećeg autora, u tri različita istraživanja, na mutantima sa smanjenom i povećanom ekspresijom proteina TROL, te različitim eksperimentalnim metodama (4, 152, 145).

Iako je aktivnost SOD-a, sukladno očekivanjima, bila značajno povećana kod biljaka uzgajanih u uvjetima sušnog stresa u odnosu na one uzgajane pri normalnoj vlazi, u uvjetima sušnog stresa došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti SOD-a u mutantnim linijama u odnosu na WT. Navedeno je moglo ukazati na preuzimanje glavne zaštitne antioksidacijske uloge kompleksa TROL-FNR koja djeluje brže od SOD-a u detoksikaciji $O_2^{\bullet-}$. Enzim FNR u topivom obliku velikom brzinom prenosi višak elektrona u alternativne tokove, koje bi trebalo dodatno istražiti, pa nastaje manja količina $O_2^{\bullet-}$, a time je i potreba za SOD-om smanjena. S druge strane, pri normalnoj vlazi uočila sam porast aktivnosti SOD-a kod mutanti u odnosu na WT, moguće jer alternativna obrana nije bila aktivna bez stresnih uvjeta. Također treba napomenuti da su biljke uzgajane na sušenom supstratu od početka uzgoja bile izložene stresu u manjoj mjeri što je moglo uzrokovati bolju prilagodbu na stres u kasnijim razvojnim stadijima (163), a u kombinaciji s mutacijama proteina TROL postoji potencijal efikasne tolerancije stresa. Također treba uzeti u obzir i mogućnost stvaranja kompleksa TROL s tAPX, tilakoidnim oblikom antioksidacijskog enzima koji razgrađuje H_2O_2 (152). Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja aktivnosti enzima CAT, APX, PPX pokazali su značajna povećanja aktivnosti uglavnom u biljkama uzgajanim pri normalnoj vlazi što je moglo ukazati na njihovu aktivnost dok stres nije aktivirao alternativnu obranu. Povećanje aktivnosti APX uputilo je i na aktivnost askorbat-glutationskog ciklusa koji kloroplastima pruža antioksidacijsku zaštitu (20).

Udio pigmenata u biljnom tkivu bio je veći kod biljaka uzgajanih u uvjetima sušnog stresa. To je mogla biti kompenzacija smanjenju stope fotosintetske aktivnosti uzrokovane stresom. U usporedbi s WT-om, pad udjela klorofila *a* i ukupnih karotenoida u mutantnim linijama uglavnom je izražen tek u stresnim uvjetima, dok je udio klorofila *b* smanjen u svim uvjetima rasta. Linija TROL Δ RHO pokazala je manji udio ukupnog klorofila i raniji pad njihove

količine od linije TROL KO, što upućuje na prilagodbu stresu smanjenom apsorpcijom svjetlosti. Nasuprot tome, linja TROL KO pokazala je zaštitni mehanizam smanjenjem udjela klorofila *a*, koji ima ključnu ulogu u prijenosu elektrona, tek pri jačem stresu. Ove promjene uputile su na reorganizaciju sastava i omjera pigmenata LHC kompleksa (171, 172), te pomak u funkcionalnoj ravnoteži između fotosustava. Preferirana je bila aktivnost PSI (173, 174), smještenog u blizini proteina TROL, koji omogućuje alternativne tokove elektrona, kao što je CET. CET omogućuje sintezu ATP-a, potrebnog za fiksaciju ugljika, kada je LET smanjen. Veći omjer klorofila *a* i *b* obilježje je biljaka povećane otpornosti na stres (175). Izostanak njegova smanjenja u mutantnim linijama na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa ukazao je na aktivaciju alternativnih obrambenih mehanizama. Istodobno, pad ukupnog sadržaja klorofila ukazao je na aktivne zaštitne prilagodbe na razini fotosintetskih pigmenata (176). U stresnim uvjetima smanjenje sadržaja klorofila *a* ograničava nastanak $^1\text{O}_2$ jer smanjuje vjerojatnost stvaranja tripletnog klorofila i prijenosa energije na O_2 . Ove prilagodbe udjela pigmenata usko su povezane s opaženim promjenama u nastajanju reaktivnih kisikovih vrsta. Smanjena apsorpcija svjetlosti smanjuje opterećenje PETC, dok dinamička regulacija para TROL-FNR pridonosi učinkovitoj detoksikaciji. Zajedno, ovi mehanizmi pokazali su koordinirani odgovor fotosintetskog aparata usmjeren na održavanje redoks ravnoteže u stresnim uvjetima. Karotenoidi imaju ključnu ulogu u deaktivaciji $^1\text{O}_2$, pa su razlike u sadržaju ukupnih karotenoida pokazale promjenjivu potrebu za njihovom antioksidacijskom funkcijom i ulogom u apsorpciji svjetlosti pri različitim uvjetima rasta (54). Uočen viši sadržaj karotenoida pri normalnoj vlazi uputio je na njihovu antioksidacijsku aktivnost, dok je smanjeni udio i omjer s ukupnim klorofilom u uvjetima suše uputio na aktivnu alternativnu obranu. Ipak, sniženi sadržaj karotenoida u stresu bio je neočekivan ako uzmemo u obzir da ispitivane mutacije nisu pokazale efikasnu obranu protiv $^1\text{O}_2$. Dobiveni rezultati upućuju na to da se zaštita od $^1\text{O}_2$ oslanjala na alternativne komponente antioksidacijskog sustava. Promjene u sadržaju karotenoida utječu na učinkovitost ksantofilskog ciklusa (177, 178) te osjetljivost na fotoinhibiciju (179), a moguće preusmjeravanje metaboličke energije s biosinteze karotenoida na druge zaštitne procese predstavlja dodatnu razinu prilagodbe (180). Budući da karotenoidi sudjeluju u rasipanju viška pobudne energije putem NPQ, promjene njihovog sadržaja utječu na raspodjelu energije između fotozaštite i fiksacije ugljika (181). Održavanju niske razine $^1\text{O}_2$ pridonosi i funkcionalan PSII, koji učinkovitom raspodjelom pobudne energije u fotokemijskim procesima smanjuje nastanak tripletnog klorofila i posljedično $^1\text{O}_2$, dok uravnoteženo djelovanje PSI i PSII održava učinkovit tok elektrona (182, 183). Promjene u udjelima pigmenata i smanjeno nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta u mutantnim linijama pokazali su koordinirani odgovor organizma pod

regulacijom para TROL-FNR. Takva kombinirana prilagodba omogućila je učinkovitu kontrolu toka elektrona i ograničavanje oksidacijskog stresa u uvjetima suše.

Omjer ekspresije velike podjedinice enzima RUBISCO među linijama pokazao je da ekspresija enzima nije bila odlučujući čimbenik za različitu razinu fiksacije CO₂. Enzim RUBISCO osjetljiv je na oksidacijski stres (29). Može doći do narušavanja strukture i degradacije velike podjedinice. U uvjetima stresa ograničavajući korak fotosinteze može postati disocijacija oksidiranog Fd s FNR-a, što je predispozicija za interakciju druge molekule Fd s FNR-om. Time se usporava prijenos elektrona i smanjuje sinteza NADPH. Posljedično je ograničena regeneracija ribuloza-1,5-bisfosfata (RuBP) i opskrba Calvinovog ciklusa energijom i reducensima, pa se stopa fiksacije CO₂ smanjuje neovisno o katalitičkom kapacitetu enzima RUBISCO (153). U kontekstu sušnog stresa takva ograničenja uzrokuju šire poremećaje fotosintetske regulacije povezane s oksidacijskim stresom i neravnotežom u toku elektrona. U skladu s time, nižu ekspresiju velike podjedinice enzima RUBISCO uočila sam u uvjetima sušnog stresa. S navedenim su se podudarali i rezultati mjerenja stope asimilacije CO₂ u ovisnosti o različitim koncentracijama CO₂. Pokazali su veću stopu asimilacije CO₂ kod biljaka uzgajanih pri normalnoj vlazi. Pri tome se moglo uočiti da TROL KO ima najnižu, a TROL ΔRHO najvišu stopu asimilacije CO₂. U uvjetima sušnog stresa ukupna stopa asimilacije CO₂ očekivano je bila niža. No, u ovim uvjetima linija TROL KO pokazala je višu stopu asimilacije CO₂ od linije TROL ΔRHO, što je ponovno potvrdilo utjecaj različitih mutacija proteina TROL na prilagodbu stresnim uvjetima, te na regulaciju efikasne fiksacije ugljika. Uzroci su mogli biti bolja aktivacija enzima RUBISCO, regeneracija RuBP, provodljivost puči i mezofila, mehanizmi koncentriranja ugljika, efikasnost iskorištenja H₂O, smanjena fotoinhibicija i fotorespiracija, a redoks signalizacija može pojačati aktivnost enzima Calvinovog ciklusa pri većim koncentracijama CO₂ (184-187). Pošto ekspresija enzima RUBISCO nije bila narušena, različite stope asimilacije CO₂ nisu proizašle iz smanjene sposobnosti fiksacije ugljika, nego prvenstveno iz promjena u fotokemijskoj fazi fotosinteze. Povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta uzrokuje oštećenja fotosintetskog aparata i smanjuje učinkovitost pretvorbe svjetlosne energije u kemijsku energiju, što dovodi do smanjene proizvodnje ATP-a i NADPH. Posljedično, iako je karboksilacijski kapacitet očuvan, Calvinov ciklus ograničen je energetske i redoks čimbenicima, što rezultira smanjenom stopom asimilacije CO₂. Dinamička regulacija vezanja proteinskog para TROL-FNR stoga ima ključnu ulogu u stabilizaciji redoks ravnoteže i očuvanju fotosintetske učinkovitosti u uvjetima sušnog stresa. U ovisnosti o različitim intenzitetima osvjetljenja stopa asimilacije CO₂

očekivano je bila veća pri normalnoj vlazi. Mutantne linije u uvjetima sušnog stresa pokazale su višu stopu asimilacije CO₂ na prosijanom supstratu, ali nižu na sušenom supstratu u odnosu na WT. Smanjena stopa asimilacije CO₂ pri različitim intenzitetima osvjetljenja mogla je biti uzrokovana smanjenom sintezom NADPH i potencijalno ATP-a (114, 188), što i odgovara mutanti TROL KO kod koje je više FNR-a u stromi, a pogotovo uzevši u obzir da kombinirani stres, u ovom slučaju suša i visok intenzitet osvjetljenja, dodatno potiču otpuštanje FNR-a u stromu. Ovaj rezultat potvrdio je i otpuštanje FNR-a s proteina TROL posredovano transmembranskim signalom domene RHO iz lumena u stromu tokom stresnih uvjeta, suše i visokog intenziteta osvjetljenja. Reguliranje fizioloških procesa pri povišenom intenzitetu osvjetljenja predstavlja važan mehanizam zaštite od oštećenja PSII, fotoinhibicije (189) i nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta (168). Istodobno, dodatnu zaštitu osigurava prilagodba sastava pigmenata ograničavanjem apsorpcije svjetlosti i nastanka ¹O₂ (190-193). U kontekstu prethodno opisanih promjena u sastavu pigmenata i nastajanju reaktivnih kisikovih vrsta, ovi rezultati ukazali su da regulacija dinamičkog vezanja para TROL-FNR sudjeluje u prilagodbi toka elektrona i opskrbe Calvinova ciklusa energijom i reducensima. Time se modulira fotosintetska učinkovitost i ograničava oksidacijski stres, što omogućuje finu regulaciju stope asimilacije CO₂ ovisno o uvjetima rasta. Niža stopa asimilacije CO₂ na različitim razinama osvjetljenja, u odnosu na različite koncentracije CO₂ kod biljaka uzgajanih pri normalnoj vlazi sugerirala je rasipanje energije putem NPQ umjesto korištenja u asimilaciji, što bi trebalo dodatno istražiti. Sukladno s pretpostavljenom ulogom stromalnog FNR-a u toleranciji oksidacijskog stresa, za očekivati je da linija TROL KO ima povećanu aktivnost NPQ. Navedeno su pokazala i ranija opažanja povećane aktivnosti NPQ i fluorescencije klorofila pri povišenom osvjetljenju (5, 18). Smanjena fotokemijska učinkovitost u tim uvjetima odražava ograničenja u svjetlosnim reakcijama i opskrbi ATP-om i koenzimom NADPH, a ne aktivnosti enzima RUBISCO (194-196). Čak i u slučaju povećanog sadržaja pigmenata i apsorpcije svjetlosti ne mora doći do povećanja stope asimilacije CO₂ na različitim razinama osvjetljenja jer se dio energije usmjerava u zaštitne procese. U uvjetima sušnog stresa višak svjetlosne energije dodatno potiče stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i fotoinhibiciju (197), dok dostupnost CO₂ ublažava metaboličke inhibicije u stresu (198). U skladu s prethodno opisanim promjenama u sastavu pigmenata i detekciji reaktivnih kisikovih vrsta vidljiva je usko povezana regulacija stope asimilacije CO₂ u uvjetima sušnog stresa pod utjecajem para TROL-FNR. H₂O₂ djeluje kao signalna molekula u regulaciji otvorenosti puči i osmotske ravnoteže, dok ATP osigurava energiju za aktivni transport iona potreban za osmoregulaciju. Održavanje stabilne stope asimilacije CO₂ omogućuje učinkovito korištenje H₂O jer održava ravnotežu između

unos CO_2 i gubitka H_2O transpiracijom (149, 161). Uz to, i promjene u udjelu pigmenata i aktivacija fotozaštitnih mehanizama utječu na regulaciju otvorenosti puči (187). U skladu s rezultatima ovog rada, takve prilagodbe pridonose ograničavanju nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta i stabilizaciji fotosintetske funkcije, čime se omogućuje koordiniran odgovor koji povezuje redoks signalizaciju i učinkovitost fotosinteze u uvjetima sušnog stresa.

U prilog opaženim fiziološkim promjenama u sušnom stresu išle su i prilagodbe anatomije lista. U uvjetima sušnog stresa palisadni mezofil bio je gušći i kompaktniji. To je smanjilo gubitak vode ograničavanjem evaporacije, te je optimiziralo iskorištenje svjetlosti, a najizraženije je bilo u liniji TROL KO. Slične promjene u spužvastom mezofilu također su smanjile gubitak vode, ali i potencijalno ograničile unos CO_2 . Na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi u mutantnim linijama uočila sam morfološke izmjene stanica, što je ukazalo na ranu strukturnu prilagodbu koja prethodi punoj aktivaciji zaštitnih mehanizama u stresu. Uočila sam smanjenje broja kloroplasta u mutantnim linijama koje je predstavljalo dodatnu prilagodbu ograničavanjem apsorpcije svjetlosti u stresnim uvjetima. Značajno je bilo i formiranje dva sloja palisadnog mezofila kod linije TROL KO, što je omogućilo učinkovitiju raspodjelu svjetlosne energije, prilagodbu fotosintetske aktivnosti stopi asimilacije CO_2 i zaštitu unutarnjih slojeva od prekomjernog osvjetljenja i gubitka vode (199). Zajedno s prethodno opisanim fiziološkim prilagodbama, ove anatomske prilagodbe predstavljaju strukturnu komponentu integriranog odgovora koji doprinosi očuvanju fotosintetske funkcije uvjetima suše.

Biljke su pokazale odgovor na razlike u uzgojnom supstratu. Biljke na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi pokazale su relativno uravnotežen metabolizam, a na sušenom supstratu već su bili vidljivi rani znakovi narušavanja metaboličke ravnoteže. Sušeni supstrat je, zbog manje električne vodljivosti i slabijeg zadržavanja vode, pojačao oksidacijski stres te utjecao na nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta, sastav pigmenata, fotosintetske funkcije biljaka te potaknuo aktivaciju obrambenih odgovora (200). Različit utjecaj uzgojnih supstrata između mutantnih linija dodatno je naglasio kako je odgovor na sušni stres rezultat fine regulacije između fotosintetske učinkovitosti i zaštite od oksidacijskog stresa, što omogućuje održavanje funkcionalne stabilnosti fotosintetskog sustava.

5.2. Funkcionalne posljedice mutacija ΔITEP i ΔPEPE

Značajne promjene u rezultatima provedenih pokusa uočila sam i kod biljaka s mutacijom ITEP regije (ΔITEP), odgovorne za vezanje FNR-a, te PEPE regije (ΔPEPE), koja omogućava fleksibilnost i pozicioniranje C-terminalnog završetka proteina TROL. Budući da te mutacije

utječu na vezanje i pozicioniranje kompleksa TROL-FNR, njihovi učinci bili su izraženi kod biljaka uzgajanih u stresnim uvjetima suše. Iako je ukupni signal $O_2^{\cdot-}$ bio manji kod biljaka uzgajanih na prosijanom supstratu, značajno smanjenje u mutantnim linijama u odnosu na WT zabilježila sam tek kod biljaka uzgajanih na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. Izostanak takvih rezultata kod biljaka uzgajanih na normalnoj vlazi, dodatno je potvrdio zaštitnu ulogu dinamičkog vezanja para TROL-FNR u stresnim uvjetima. S druge strane, ove mutacije nisu pokazale sposobnost detoksikacije H_2O_2 . S obzirom da sam uspješnu detoksikaciju H_2O_2 zabilježila u liniji s mutacijom domene RHO (TROL Δ RHO), rezultati su ukazali na specifičnu uključenost signalizacije putem domene RHO u detoksikacijski H_2O_2 . Postoji mogućnost da je učinkovita detoksikacija $O_2^{\cdot-}$ u mutantama Δ ITEP i Δ PEPE posredno doprinijela povećanju razine H_2O_2 , koji nije efikasno uklonjen. Istodobno, ove mutantne linije pokazale su potencijal zaštite od 1O_2 na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa u odnosu na WT. S obzirom da je smanjenje bilo izraženo i u odnosu na biljke uzgajane na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi, rezultati ukazuju da bi bilo korisno dodatno istražiti zaštitni potencijal ovih mutacija od 1O_2 u uvjetima stresa. Mutacije regija ITEP i PEPE potvrdile su da je pravilno vezanje i pozicioniranje para TROL-FNR ključno za antioksidacijsku obranu u stresnim uvjetima.

Uočila sam značajno povećanu aktivnost SOD-a već kod biljaka uzgajanih na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi te u uvjetima sušnog stresa. U kombinaciji s rezultatima detekcije $O_2^{\cdot-}$ uočila sam potencijal zajedničke antioksidacijske aktivnosti ispitivanih mutacija i SOD-a u uklanjanju $O_2^{\cdot-}$. Nasuprot tome, varijabilna aktivnost enzima uključenih u razgradnju H_2O_2 među mutantnim linijama i uzgojnim uvjetima pokazala je da su mutacije i aktivnost enzima u dinamičkoj interakciji, ali u ovim mutantama nisu pokazale učinkovitu detoksikaciju H_2O_2 . Ipak, uočila sam tendenciju smanjenja razine H_2O_2 uz povećanu aktivnost APX i PPX na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi, što može biti znak eventualne detoksikacije pri blagom stresu.

U prilog potencijalne zaštite ispitivanih mutacija domena ITEP i PEPE od 1O_2 išli su i rezultati mjerenja udjela ukupnih karotenoida. U uvjetima sušnog stresa biljke su očekivano pokazale nešto veći sadržaj karotenoida nego kod biljaka uzgajanih pri normalnoj vlazi. No, mutantne linije pokazale su smanjenje sadržaja ukupnih karotenoida u odnosu na WT pri svim uvjetima uzgoja, a posebno u uvjetima sušnog stresa. Također, omjer ukupnih karotenoida i ukupnog klorofila bio je manji kod mutanti u odnosu na WT. Navedeno je sugeriralo uključivanje alternativnih obrambenih mehanizama od 1O_2 . Istodobno, varijabilni udjeli klorofila *a* i *b* te

promjene njihova omjera i ukupnog sadržaja, ukazali su na prilagodbe u apsorpciji svjetlosti ovisno o uvjetima rasta. Iako manji sadržaj pigmenata smanjuje ukupnu apsorpciju svjetlosti, sprječava preopterećenje fotosintetskog aparata i ograničava nastanak reaktivnih kisikovih vrsta, čime se održava stabilna opskrba Calvinova ciklusa energijom i reducensima, te relativno viša stopa asimilacije CO₂ u stresnim uvjetima (148). Ovi rezultati pokazali su fleksibilnu regulaciju fotosintetskog aparata usmjerenu na održavanje prikladne apsorpcije svjetlosti u stresnim uvjetima.

Enzim RUBISCO opet je očekivano pokazao manju ekspresiju u uvjetima sušnog stresa, ali to se nije odrazilo na stopu asimilacije CO₂. Pri različitim koncentracijama CO₂ i intenzitetima osvjetljenja stopa asimilacije CO₂ ostala je usporediva između uvjeta uzgoja, a na sušenom supstratu u uvjetima suše čak sam zabilježila i veću stopu asimilacije CO₂ unatoč manjoj ekspresiji enzima RUBISCO. Navedeno je istaknulo regulaciju fotosinteze učinkovitošću svjetlosnih reakcija i raspodjelom elektrona, a ne ekspresijom enzima RUBISCO, te je potvrdilo prilagodbu fizioloških procesa posredovanu ispitivanim mutacijama.

Biljke uzgajane na sušenom supstratu pokazale su višu stopu asimilacije CO₂ u odnosu na one uzgajane na prosijanom supstratu kod oba uvjeta uzgoja. Pri normalnoj vlazi mutantne linije uglavnom su pokazale manju stopu asimilacije CO₂ u donosu na WT pri različitim koncentracijama CO₂. Takav trend bio je prisutan i na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi na različitim intenzitetima osvjetljenja. Na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi linija ΔPEPE, a u sušnom stresu obje mutante linije pokazale su višu stopu asimilacije u odnosu na WT pri različitim intenzitetima osvjetljenja. Ove stupnjevite promjene u stopi asimilacije CO₂ kod mutantnih linija u odnosu na WT s promjenom uvjeta uzgoja, oslikale su važne fiziološke prilagodbe u regulaciji toka elektrona i raspodjeli energije, a posredovane su mutacijama koje utječu na dinamiku vezanja para TROL-FNR. Iako se blagi pad stope asimilacije mogao primijetiti kod obje mutante pri visokim koncentracijama CO₂ i intenzitetima osvjetljenja kroz gotovo sve uvjete uzgoja, linija ΔITEP pokazala je nagli i velik pad stope asimilacije CO₂ pri visokom intenzitetu osvjetljenja u uvjetima sušnog stresa. To je moglo predstavljati zaštitni mehanizam povezan s otpuštanjem FNR-a u stromu te ograničavanje daljnjeg opterećenja fotosintetskog aparata i preusmjeravanje metaboličkih resursa u zaštitne procese. Kada su biljke jednom izložene visokoj koncentraciji CO₂, daljnje podizanje koncentracije CO₂ može uzrokovati pad stope asimilacije CO₂ (201), a povećanje koncentracije O₂ može uzrokovati povećanje stope asimilacije CO₂ (202). Unatoč promjenjivoj koncentraciji pigmenata, stopa asimilacije CO₂ u uvjetima sušnog stresa ostala je u rasponu kao pri normalnoj vlazi. Navedeno

je ukazalo na efikasnu fiksaciju ugljika vjerojatno posredovano funkcionalnom regulacijom enzima RUBISCO (203) i prilagodbama provodljivosti puči i mezofila koje su osiguravale dovoljnu dostupnost CO₂, učinkovitom regulacijom toka elektrona i efikasnom raspodjelom pobudne energije (204, 205). Viša stopa asimilacije pri različitim koncentracijama CO₂ u odnosu na različite intenzitete osvjetljenja, te veća osjetljivost asimilacije CO₂ na promjene intenziteta osvjetljenja nego na promjene koncentracije CO₂ dodatno naglašavaju važnost regulacije svjetlosnih reakcija. Ovi rezultati pokazali su da mutacije omogućuju fleksibilnu regulaciju fotosintetske aktivnosti kojom se uravnotežuju produktivnost i zaštita u stresnim uvjetima.

Anatomske prilagodbe lista potvrdile su strukturnu komponentu odgovora na sušni stres. U mutantnim linijama u uvjetima suše zabilježila sam pad broja kloroplasta u odnosu na WT, dok pri normalnoj vlazi nisam uočila takve promjene. To je ukazalo na kontrolu apsorpcije svjetlosti i potrošnje resursa u skladu s uzgojnim uvjetima. U uvjetima sušnog stresa palisadni mezofil postao je gušći i kompaktniji u odnosu na uvjete normalne vlage, čime se optimiziralo iskorištenje svjetlosti i smanjio gubitak H₂O. Spužvasti mezofil pokazao je više međustaničnog prostora što može olakšati difuziju CO₂, ali i povećati gubitak H₂O ako su puči otvorene (199). Kod linije ΔPEPE uočila sam i naznaku formiranja dvoslojnog palisadnog mezofila. Nisam uočila deformacije stanica.

5.3. Funkcionalne posljedice mutacija D207E i D207N

Na poziciji 207 domene RHO je AK aspartat odgovorna za njenu aktivnost. U liniji D207N aspartat 207 zamijenjen je asparaginom. Iako je signal O₂^{•-} bio viši kod biljaka na prosijanom supstratu pri normalnoj vlazi u odnosu na ostale uvjete uzgoja, ova mutantna linija pokazala je značajno smanjenje signal O₂^{•-} samo na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa. S druge strane, zamjena aspartata za glutaminsku kiselinu u liniji D207E nije doprinijela antioksidacijskoj zaštiti od O₂^{•-} u stresnim uvjetima u tolikoj razini. Ovi rezultati ukazali su da zamjena samo jedne određene AK u domeni RHO može promijeniti redoks signalizaciju i dinamiku vezanja para TORL-FNR. Također, opet je bila naglašena aktivacija alternativne obrane u uvjetima stresa, pošto su biljke na ostalim uvjetima uzgoja pokazale porast signala O₂^{•-} u odnosu na WT. Ni jedna od ovih mutacija nije pokazala učinkovitu zaštitu od H₂O₂, štoviše pri svim uvjetima uzgoja signal H₂O₂ bilo je povišena u odnosu na WT. S obzirom da je linija TROL ΔRHO, s mutacijom domene RHO, pokazala zaštitnu ulogu od H₂O₂ u stresnim uvjetima, potencijalna zaštita u određenoj mjeri mogla se očekivati i kod mutacija D207E i

D207N. Ovim zamjenama AK domena RHO i dalje je neaktivna, ali pokazala je promijenjena svojstva i u odnosu na ispitivanu mutaciju domene RHO u liniji TROL Δ RHO i na WT. Značajno smanjen signal $^1\text{O}_2$ na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa kod linije D207E ukazao je na potencijalnu zaštitu ove mutacije u uvjetima umjerenog stresa isto kao što je bio slučaj kod linija Δ ITEP i Δ PEPE, što bi se moglo dodatno ispitati. Nadalje, mutanta D207E na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa pokazala je ne tako značajno smanjenje signala $^1\text{O}_2$, ali i dalje smanjeno u odnosu na WT i na biljke uzgojene pri normalnoj vlazi. S druge strane, linija D207N pokazala je uglavnom značajan porast signala $^1\text{O}_2$, što je ukazalo da nema sposobnost zaštite od $^1\text{O}_2$. Ovi rezultati dodatno su naglasili suptilne, ali bitne razlike između mutacija i njihovog utjecaja na metabolizam.

Rezultati aktivnosti SOD-a bili su u skladu sa rezultatima detekcije $\text{O}_2^{\bullet-}$ za liniju D207N na sušenom supstratu u uvjetima suše, gdje sam zabilježila povećanu aktivnost enzima. Međutim, usporedbe aktivnosti SOD-a i signala $\text{O}_2^{\bullet-}$ u ostalim uvjetima uzgoja za ove mutantne linije nisu pokazale potpuna podudaranja. To je ukazalo na primarnu aktivnost mutacijama potaknute alternativne antioksidacijske obrane od $\text{O}_2^{\bullet-}$ u stresnim uvjetima suše. Antioksidacijska aktivnost enzima bila je izraženija dok stresni uvjeti nisu bili prisutni ili su bili prisutni u manjoj mjeri. Aktivnost enzima uključenih u razgradnju H_2O_2 – CAT, APX i PPX varirala je ovisno o uvjetima uzgoja, ali u kombinaciji s ove dvije mutacije nije dovela do učinkovite antioksidacijske obrane u ispitivanim uvjetima.

Udjeli fotosintetskih pigmenata u linijama D207E i D207N varirali su ovisno o uvjetima uzgoja. Promjene u udjelima pigmenata u biljaka uzgajanih pri normalnoj vlazi na prosijanom supstratu pokazale su visok stupanj apsorpcije svjetlosti, ali i aktivnu zaštitnu komponentu. No, s obzirom na porast prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta, zaštitna komponenta nije bila dostatna. Kod biljaka na sušenom supstratu pri normalnoj vlazi mogla se uočiti reorganizacija udjela pigmenata koja je upućivala na smanjenu apsorpciju svjetlosti i veću zaštitu. Obje mutante linije na sušenom supstratu u uvjetima sušnog stresa pokazale su pad sadržaja ukupnog klorofila te povećanje sadržaja ukupnih karotenoida u odnosu na WT, što je uputilo na zaštitu putem manje apsorpcije svjetlosti i povećane antioksidacijske obrane (70). Prema rezultatima detekcije $^1\text{O}_2$, linija D207E pokazala je uspješnu obranu, što je uputilo na učinkovitu kontrolu oksidacijskog stresa aktivacijom alternativnih obrambenih mehanizama uz porast sadržaja ukupnih karotenoida. Nasuprot tome, sastavom pigmenata, linija D207N pokazala je višu stopu apsorpcije svjetlosti uz nedostatne mehanizme antioksidacijske zaštite. Iako je sadržaj mjerenih pigmenata bio smanjen u odnosu na WT, usporedbom među različitim uvjetima uzgoja, najveći

sadržaj pigmenata bio je prisutan upravo u uvjetima sušnog stresa. Navedeno je ukazalo na povišenu apsorpciju svjetlosti u sušnom stresu, ali s obzirom na nedostatnu antioksidacijsku obranu, i na visok rizik od fotooksidacijskih oštećenja tijekom duljeg perioda.

Mutante su pokazale manju ekspresiju velike podjedinice enzima RUBISCO od WT-a. Suprotno očekivanjima linija D207N pokazala je povećanu ekspresiju u uvjetima sušnog stresa u odnosu na normalnu vlagu. Budući da se ekspresija enzima RUBISCO nije potpuno podudarala s izmjerenom stopom asimilacije CO₂, regulacija fiksacije CO₂ očito je ovisila i o drugim čimbenicima, uključujući rasipanje viška energije i ograničenja svjetlosnih reakcija fotosinteze (207). U uvjetima normalne vlage obje mutantne linije pokazale su višu stopu asimilacije CO₂ od WT-a. Pri tome sam zabilježila da je linija D207E imala višu stopu asimilacije CO₂ pri različitim koncentracijama CO₂, a linija D207N pri različitim intenzitetima osvjetljenja. Ovi rezultati potvrdili su da različite mutacije imaju različite utjecaje na fiziološku aktivnost biljaka. Na prosijanom supstratu u uvjetima sušnog stresa, mutante su pokazale višu stopu asimilacije CO₂ pri oba uvjeta mjerenja, što je ukazalo na njihovu bolju prilagođenost stresu u odnosu na WT. No, na sušenom supstratu pri visokim intenzitetima osvjetljenja, došlo je do pada stope asimilacije CO₂ u odnosu na WT. To je značilo da su, kada je intenzitet stresa postao prevelik, mutante uspješno prilagodile stopu asimilacije CO₂ uvjetima u kojima se nalaze. Pri različitim koncentracijama CO₂, u sušnom stresu, biljke uzgajane na sušenom supstratu pokazale su veću stopu asimilacije CO₂ u odnosu na one uzgajane na prosijanom supstratu, što je također ukazalo na fiziološku prilagođenost ovih mutanti stresnim uvjetima. Niža stopa asimilacije CO₂ pri različitim intenzitetima osvjetljenja kod biljaka u sušnom stresu, u odnosu na normalnu vlagu ukazala je na ograničenja reakcija ovisnih o svjetlosti. Aktivacija zaštitnih mehanizama uključuje otpuštanje FNR-a s proteina TROL uslijed stresnih uvjeta, a time i smanjenu sintezu ATP-a i NADPH te ograničenje Calvinovog ciklusa. Nedostatak energetskih i redukcijskih ekvivalenata usporava regeneraciju RuBP (208), što objašnjava nižu stopu asimilacije CO₂ unatoč većoj zabilježenoj ekspresiji velike podjedinice enzima RUBISCO u stresnim uvjetima. Također, utjecaj je imala i smanjena apsorpcija svjetlosti zbog smanjenog udjela klorofila.

Pri normalnoj vlazi stanice palisadnog mezofila kod mutantnih linija bile su izduženije i kompaktnije u odnosu na WT. Na sušenom supstratu uočila sam naznaku formiranja dvoslojnog palisadnog mezofila, što je predstavljalo prilagodbu koja smanjuje gubitak H₂O i optimizira iskorištenje svjetlosti. Spužvasti mezofil pokazao je povećane međustanične prostore koji olakšavaju difuziju CO₂, ali mogu povećati i gubitak H₂O. U uvjetima sušnog stresa na

prosijanom supstratu mutantne linije sadržavale su manji broj kloroplasta u odnosu na WT, prilagođavajući tako fotosintetsku aktivnost uvjetima u kojima se nalaze. Na sušenom supstratu mutante su razvile gušći spužvasti mezofil koji je dodatno smanjio gubitak H₂O, ali istodobno ograničavao difuziju CO₂ (149, 206).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da mutacije proteina TROL ne utječu samo na pojedinačne komponente fotosintetskog aparata, nego na integriranu mrežu procesa koja povezuje regulaciju toka elektrona, antioksidacijsku obranu, prilagodbe sastava pigmenata, anatomske promjene i fiksaciju ugljika. Utvrdila sam da je dinamičko vezanje para TROL-FNR ključ regulacije koji koordinira ove prilagodbe i omogućuje održavanje stabilne fotosintetske funkcije u uvjetima sušnog stresa. Ovaj rad time proširuje razumijevanje mehanizama kojima biljke usklađuju fotozaštitu i fotosintetsku učinkovitost, te pruža temelj za daljnja istraživanja molekularnih mehanizama otpornosti biljaka na stres. Također, po prvi puta je provedeno mjerenje stope asimilacije CO₂ na ovim mutantama, u uvjetima sušnog stresa, pri različitim intenzitetima osvjetljenja i koncentracijama CO₂. Time je omogućeno povezivanje molekularnih promjena uzrokovanih mutacijama s funkcionalnim ishodima na razini fotosintetske aktivnosti.

6. ZAKLJUČCI

U ovom doktorskom radu istražen je utjecaj različitih mutacija proteina TROL na fiziološko stanje modelnog organizma *A. thaliana*. Istraživanje je provedeno na dvama tipovima uzgojnog supstrata, prosijanom te prosijanom i osušenom, te u dvama uvjetima uzgoja, pri normalnoj vlazi i uvjetima sušnog stresa.

1. Različite mutacije proteina TROL imaju učinke koji djeluju na zaštitu od specifičnih reaktivnih kisikovih vrsta tijekom sušnog stresa, a dinamičko vezanje TROL-FNR para igra ključnu ulogu u usmjeravanju elektrona prema alternativnim tokovima.
2. Rezultati aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX, PPX te udjela fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida, ukupnih klorofila, omjera klorofila *a* i klorofila *b* te omjera ukupnog klorofila i ukupnih karotenoida u biljnom tkivu, pokazali su da se aktivnost enzima i udjeli pigmenata prilagođavaju zaštitnim potrebama i potrebama apsorpcije svjetlosne energije ovisno o različitim mutacijama proteina TROL i uvjetima rasta. Ovi rezultati upućuju na važnost proteina TROL u održavanju učinkovitog linearnog toka elektrona i sinteze NADPH, a time posredno i u odvijanju Calvin-Bensonova ciklusa i fiksacije CO₂.
3. Povećana ekspresija velike podjedinice enzima RUBISCO u uvjetima sušnog stresa kod mutantnih linija ΔITEP i ΔPEPE te pojačana ekspresija enzima pri uvjetima normalne vlage u drugim linijama upućuje na mogući utjecaj proteina TROL na sintezu enzima RUBISCO ovisno o potrebi za fiksacijom CO₂ u različitim uvjetima rasta.
4. Stopa asimilacije CO₂ prilagođava se mutacijama proteina TROL i uvjetima rasta, što potvrđuje ulogu proteina TROL u regulaciji fotosintetske aktivnosti. Smanjenje stope asimilacije CO₂ pri visokim intenzitetima svjetlosti i koncentracijama CO₂ upućuje na aktivaciju zaštitnog mehanizma kojim se ograničava prekomjerno opterećenje fotosintetskog sustava.
5. Promjene u anatomiji lista, koje ovise o mutacijama proteina TROL i uvjetima rasta, ukazuju na prilagodbu ne samo na fiziološkoj, nego i na anatomskej razini pod utjecajem proteina TROL.

7. LITERATURA

1. Tanaka A, Makino A (2009) Photosynthetic research in plant science. *Plant Cell Physiol* 50:681-683.
2. Soll J, Bölter B (2009) Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cell Mol Life Sci* 66:1903-1923.
3. Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:971-982.
4. Vojta L, Carić D, Cesar V, Antunović Dunić J, Lepeduš H, Kveder M, Fulgosi H (2015) TROL-FNR interaction reveals alternative pathways of electron partitioning in photosynthesis. *Sci Rep* 5:10085.
5. Jurić S, Hazler-Pilepić K, Tomašić A, Lepeduš H, Jelić B, Puthiyaveetil S, Bionda T, Vojta L, Allen J, Schleiff E, Fulgosi H (2009) Tethering of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *Plant J* 6:783-794.
6. Carrillo N, Ceccarelli E, (2003) Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem* 270(9):1900-1915.
7. Korn A, Ajlani G, Lagoutte B, Gall A, Sétif P (2009) Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase association with phycocyanin modulates its properties. *J Biol Chem* 284:31789-31797.
8. Margulis MA (1992) Fundamental aspects of sonochemistry. *Ultrason* 30(3):152-155.
9. Xiong J (2006) Photosynthesis: what color was its origin? *Genome Biol* 7(12):245.
10. Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE (2011) Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 62:515-548.
11. Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706:12-39.
12. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2018) *Biochemistry* 8th edition. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
13. Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* 57:521-565.
14. Scheibe R, Dietz KJ (2012) Reduction–oxidation network for flexible adjustment of cellular metabolism in photoautotrophic cells. *Plant Cell Environ* 35(2):202-216.
15. De Pascalis AR, Jelesarov I, Ackermann F, Bosshard HR, Koppenol WH, Hirasawa M, Knaff DB (1993) Binding of ferredoxin to ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase: the role of carboxyl groups, electrostatic surface potential, and molecular dipole moment. *Protein Sci* 2(7):1126-1135.

16. Maeda M, Lee YH, Ikegami T, Tamura K, Hoshino M, Yamazaki T, Goto, Y (2005) Identification of the N-and C-terminal substrate binding segments of ferredoxin-NADP⁺ reductase by NMR. *Biochemistry* 44(31):10644-10653.
17. Benz JP, Soll J, Bolter B (2009) Protein transport in organelles: The composition, function and regulation of Tic62 complex in chloroplast protein import. *FEBS J* 276:1166-76.
18. Mulo P (2011) Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* 1807(8):927-934.
19. Morales R, Charon MH, Kachalova G, Serre L, Medina M, Gomez-Moreno C, Frey M (2000) A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. *EMBO Rep* 3:271-276.
20. Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 155:2-18.
21. Goss T, Hanke G (2014) The end of the line: can ferredoxin and Ferredoxin NADP(H) oxidoreductase determine the fate of photosynthetic electrons? *Curr Protein Pept Sci* 15:285-293.
22. Gummadova JO, Fletcher GJ, Moolna A, Hanke GT, Hase T, Bowsher C (2007) Expression of multiple forms of ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase in wheat leaves. *J Exp Bot* 58:3971-3985.
23. Forti G, Bracale M (1984) Ferredoxin-ferredoxin NADP reductase interaction, catalytic differences between the soluble and thylakoid bound complex. *FEBS Lett* 166:81-84.
24. Benz JP, Stengel A, Lintala M, Lee YH, Weber A, Philippar K, Gügel IL, Kaieda S, Ikegami T, Mulo P, Soll J, Bölter B (2009) *Arabidopsis* Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *Plant Cell* 21:3965-3983.
25. Benz JP, Lintala M, Soll J, Mulo P, Bölter B (2010) A new concept for ferredoxin–NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends Plant Sci* 15(11):608-613.
26. Lintala M, Allahverdiyeva Y, Kangasjärvi S, Lehtimäki N, Keränen M, Rintamäki E, Aro EM, Mulo P (2009) Comparative analysis of leaf-type ferredoxin-NADP oxidoreductase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 57:1103-1115.
27. Andrews TJ, Lorimer GH (1987) Rubisco: structure, mechanisms, and prospects for improvement. U: Hatch MD, Boardman NK (ur) *The biochemistry of plants a comprehensive treatise*, Volume 10 Photosynthesis, Academic Press, San Diego 31-218.
28. Andersson I, Backlund A (2008) Structure and fuction of Rubisco. *Plant Physiol Biochem* 46(3):275-291.
29. Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002). Rubisco activity: effects of drought stress. *Ann Bot* 89(7):833-839.

30. Portis Jr AR, Li C, Wang D, Salvucci ME (2008) Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J Exp Bot* 59(7):1597-1604.
31. Joliot P, Joliot A (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10209-10214.
32. Rumeau D, Peltier G, Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30:1041-1051.
33. Allen JF, de Paula WB, Puthiyaveetil S, Nield, J (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci* 16(12):645-655.
34. Busch FA, Ainsworth EA, Amtmann A, Cavanagh AP, Driever SM, Ferguson JN, Papanatsiou M (2024) A guide to photosynthetic gas exchange measurements: Fundamental principles, best practice and potential pitfalls. *Plant Cell Environ* 47(9):3344-3364.
35. Harrison EL, Arce Cubas L, Gray JE, Hepworth C (2020) The influence of stomatal morphology and distribution on photosynthetic gas exchange. *Plant J* 101(4):768-779.
36. Pevalek-Kozlina B (2003) *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb.
37. Lopez-Juez E, Pyke KA (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* 49(5/6):557.
38. Sadali NM, Sowden RG, Ling Q, Jarvis RP (2019) Differentiation of chromoplasts and other plastids in plants. *Plant Cell Rep* 38:803-818.
39. Allen JF (2003) Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp Funct Genomics* 4:31-36.
40. Hooper JK (2007) Chloroplast development: whence and whither. U: Wise RR, Hooper JK (ur) *The structure and function of plastids*, Springer, Dordrecht 23:27-51.
41. Solymosi K, Schoefs B (2010) Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth Res* 105:143-66.
42. Kindgren P (2010) *The chloroplast talks: Insights into the language of the chloroplast in Arabidopsis* (Doktorska disertacija, Odjel za fiziologiju bilja, Umeå Plant Science Centre, Sveučilište Umeå).
43. Dobrogojski J, Adamiec M, Luciński R (2020) The chloroplast genome: a review. *Acta Physiol Plant* 42(6):98.
44. Strand Å (2004) Plastid-to-nucleus signalling. *Curr Opin Plant Biol* 7(6):621-625.

45. Strand Å, Kleine T, Chory J (2006) Plastid-to-nucleus signaling. U: Wise RR, Hooper JK (ur) The structure and function of plastids, Springer, Dordrecht 23:183-197.
46. Richly E, Dietzmann A, Biehl A, Kurth J, Laloi C, Apel K, Salamini F, Leister D (2003) Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch. EMBO Rep 4:491-498.
47. Cejudo FJ, González MC, Pérez-Ruiz JM (2021) Redox regulation of chloroplast metabolism. Plant Physiol 186(1):9-21.
48. Mechela A, Schwenkert S, Soll J (2019) A brief history of thylakoid biogenesis. Open Biol 9(1):180237.
49. Kobayashi K (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. J Plant Res 129(4):565-580.
50. Vothknecht UC, Westhoff P (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1541(1-2):91-101.
51. Tanaka A, Tanaka R (2006) Chlorophyll metabolism. Curr Opin Plant Biol 9(3):248-255.
52. Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 104:17216-17221.
53. Mohammadkhani N, Heidari R (2007) Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water. Pak J Biol Sci 10(22):4022-4028.
54. Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Int J Agric Biol 11(1):100-105.
55. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra S (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. U: Sustainable agriculture. Springer, Dordrecht 29(1):185-212.
56. Hashimoto H, Uragami C, Cogdell RJ (2016) Carotenoids and photosynthesis. U: Stange C (ur) Carotenoids in Nature biosynthesis, regulation and function, Springer, Cham 79:111-139.
57. Zhang RR, Wang YH, Li T, Tan GF, Tao JP, Su XJ, Xiong AS (2021) Effects of simulated drought stress on carotenoid contents and expression of related genes in carrot taproots. Protoplasma 258:379-390.
58. Abdalla MM, El-Khoshiban NH (2007) The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticum aestivum* cultivars. J Appl Sci Res 3(12):2062-2074.

59. Rahbarian R, Khavari-Nejad R, Ganjeali A, Bagheri A, Najafi F (2011) Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 53(1):47-56.
60. Yang Y, Nan R, Mi T, Song Y, Shi F, Liu X, Zhang C (2023) Rapid and nondestructive evaluation of wheat chlorophyll under drought stress using hyperspectral imaging. *Int J Mol Sci* 24(6):5825.
61. Syamsia IA, Noerfitriyani NM, Reta KM (2018) Paddy chlorophyll concentrations in drought stress condition and endophytic fungi application. U: IOP conference series: earth and environmental science, Institute of Physics Publishing, Bristol 156(2018):012040.
62. Stengel A, Benz P, Balsera M, Soll J, Bölter B (2008) TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. *J Biol Chem* 283:6656-6667.
63. Kuchler M, Decker S, Hörmann F, Soll J, Heins L (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* 21(22):6136-3145.
64. Lintala M, Schuck N, Thormählen I, Jungfer A, Weber KL, Weber AP, Geigenberger P, Soll J, Bölter B, Mulo P (2014) *Arabidopsis tic62 trol* mutant lacking thylakoid-bound ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase shows distinct metabolic phenotype. *Mol Plant* 7:45-57.
65. Balsera M, Stengel A, Soll J, Bolter B (2007) Tic62: a protein family from metabolism to protein translocation. *BMC Evol Biol* 7(1):43.
66. Kacar B, Katkat V (2009) Plant nutrition. Nobel Academy Publishing, Ankara 975:591-833.
67. Cirak C, Esendal E (2006) Drought stress of soybean. *Journal of Faculty of Agriculture, Ondokuz Mayıs University, Samsun* 21(2):231-237.
68. Sade B, Soylu S, Soylu E (2011) Drought and oxidative stress. *Afr J Biotechnol* 10(54):11102-11109.
69. Rabinowitch HD, Fridovich I (1983) Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochem Photobiol* 37(6):679-690.
70. Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48(12):909-930.
71. Smirnoff N, Arnaud D (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol* 221(3):1197-1214.
72. Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harb Monograph Series* 34:343-406.

73. Palma JM, Gupta DK, Corpas FJ (2019) Hydrogen peroxide and nitric oxide generation in plant cells: overview and queries. U: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (ur) Nitric oxide and hydrogen peroxide signaling in higher plants, Springer, Cham 1-16.
74. Karpinska B, Foyer CH (2024) Superoxide signalling and antioxidant processing in the plant nucleus. *J Exp Bot* 75(15):4599-4610.
75. Mehler AH (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 33(1):65-77.
76. Foyer CH, Hanke G (2022) ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *Plant J* 111(3):642-661.
77. Dogra V, Kim C (2020) Singlet oxygen metabolism: from genesis to signaling. *Front in plant sci* 10:1640.
78. Dmitrieva VA, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV (2020) Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. *Int J Mol Sci* 21(9):3237.
79. Chen SX, Schopfer P (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* 260(3):726-735.
80. Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, Davies JM (2015) The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *J Exp Bot* 66(1):37-46.
81. Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30(3):161-175.
82. Prasad A, Sedlářová M, Balukova A, Rác M, Pospíšil P (2020) Reactive oxygen species as a response to wounding: *In vivo* imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 10:1660.
83. Janků M, Luhová L, Petřivalský M (2019) On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments. *Antioxidants* 8(4):105.
84. Gupta S, Dong Y, Dijkwel PP, Mueller-Roeber B, Gechev TS (2019) Genome-wide analysis of ROS antioxidant genes in resurrection species suggest an involvement of distinct ROS detoxification systems during desiccation. *Int J Mol Sci* 20(12):3101.
85. Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109:212-228.
86. Stephenie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Esa NM, Gnanaraj C (2020) An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *J Funct Foods* 68:103917.
87. Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y (2019) The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Biomed Res Int* 2019(1):9732325.

88. Moradbeygi H, Jamei R, Heidari R, Darvishzadeh R (2020) Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron oxide nanoparticles in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress. *Sci Hortic* 272:109537.
89. Arora A, Sairam RK, Srivastava, GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82(10):1227-1238.
90. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53(372):1305-1319.
91. Makino A, Miyake C, Yokota A (2002) Physiological functions of the water–water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant Cell Physiol* 43(9):1017-1026.
92. Gao R, Yuan Z, Zhao Z, Gao X (1998) Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Biomed Environ Sci* 45(1):41-45.
93. Berwal M, Ram C (2018) Superoxide dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. *Abiotic and biotic stress in plants. IntechOpen* 7:1-10.
94. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* 2012(1):217037.
95. Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C (2009) The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc* 131(33):11751-11761.
96. Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42(5):462-468.
97. Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2:53.
98. Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol* 35:1011-1019.
99. Lad L, Mewies M, Raven EL (2002) Substrate binding and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase: evidence for two ascorbate binding sites. *Biochemistry* 41(46):13774-13781.
100. Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. U: Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H (ur) *Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Geneva* 249-280.

101. Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* 11:1-14.
102. Zargar SM, Gupta N, Nazir M, Mahajan R, Malik FA, Sofi NR, Salgotra RK (2017) Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. *Plant Gene* 11:154-159.
103. Siddique Z, Jan S, Imadi SR, Gul A, Ahmad P (2016) Drought stress and photosynthesis in plants. U: Parvaiz A (ur) Water stress and crop plants: a sustainable approach, John Wiley & Sons, Hoboken 1:1-11.
104. Öztürk A (1999) The effect of drought on the growth and yield of winter wheat. *Turk J Agric For* 23(5):531-540.
105. Farooq M, Basra SMA, Wahid A, Cheema ZA, Cheema MA, Khaliq A (2008) Physiological role of exogenously applied glycinebetaine to improve drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *J Agron Crop Sci* 194(5):325-333.
106. Barnabas B, Jager K, Feher A (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* 31(1):11-38.
107. Gaspar T, Franck T, Bisbis B (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *J Plant Growth Regul* 37:263-285.
108. Grassi G, Magnani F (2005) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ* 28(7):834-849.
109. Seleiman MF, Al-Suhaibani N, Ali N, Akmal M, Alotaibi M, Refay Y, Dindaroglu T, Abdul-Wajid HH, Battaglia ML (2021) Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants* 10(2):259.
110. Zahra N, Hafeez MB, Kausar A, Al Zeidi M, Asekova S, Siddique KH, Farooq M (2023) Plant photosynthetic responses under drought stress: Effects and management. *J Agron Crop Sci* 209(5):651-672.
111. Liu J, Guo YY, Bai YW, Camberato JJ, Xue JQ, Zhang RH (2018) Effects of drought stress on the photosynthesis in maize. *Russ J Plant Physiol* 65:849-856.
112. Li P, Zhu Y, Song X, Song F (2020) Negative effects of long-term moderate salinity and short-term drought stress on the photosynthetic performance of Hybrid *Pennisetum*. *Plant Physiol Biochem* 155:93-104.
113. Qiao M, Hong C, Jiao Y, Hou S, Gao H (2024) Impacts of drought on photosynthesis in major food crops and the related mechanisms of plant responses to drought. *Plants* 13(13):1808.
114. Kramer DM, Evans JR (2011) The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiol* 155(1):70-78.

115. Alte F, Stengel A, Benz JP, Petersen E, Soll J, Groll M, Bolter B (2010) Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19260-19265.
116. Palatnik JF, Tognetti VB, Poli HO, Rodríguez RE, Blanco N, Gattuso M, Carrillo N (2003) Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP (H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. *Plant J* 35(3):332-341.
117. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391-396.
118. Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol* 50(1):60-639.
119. Ruban AV, Wilson S (2021) The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces. *Plant Cell Physiol* 62(7):1063-1072.
120. Sagun J, Badger M, Chow W, Ghannoum O (2019) Cyclic electron flow and light partitioning between the two photosystems in leaves of plants with different functional types. *Photosynth Res* 142:321-334.
121. Schwarz E, Tietz S, Froehlich J (2017) Photosystem I-LHCII megacomplexes respond to high light and aging in plants. *Photosynth Res* 136(1):107-124.
122. Fox KF, Balevičius V, Chmeliov J, Valkunas L, Ruban AV, Duffy CD (2017) The carotenoid pathway: what is important for excitation quenching in plant antenna complexes? *Phys Chem Chem Phys* 19(34):22957-22968.
123. Kautsky H, Hirsch A (1931) New experiments on carbonic acid assimilation. *Nat Sci* 19(48):964-964.
124. Thal J (1557) *Sylva Hercynia: sive catalogus Plantarum sponte nascentium in montibus et locis plerisque Hercyniae Sylvae quae respicit Saxoniam*. Moenum.
125. The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
126. Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R (2011) Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu Rev Plant Biol* 62:157-184.
127. Most P, Papenbrock J (2015) Possible roles of plant sulfurtransferases in detoxification of cyanide, reactive oxygen species, selected heavy metals and arsenate. *Molecules* 20(1):1410-1423.
128. Bordo D, Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* 3:741-746.

129. Farooq A, Chaturvedi G, Mujtaba S, Plotnikova O, Zeng L, Dhalluin C, Zhou M M (2001) Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: structural insights into MKP-3 activation by ERK2. *Mol Cell* 7(2):387-399.
130. Leonard EO, Emuebie OR, Abdulrasak MA (2016) Kinetics and biochemical characterization of Rhodanase from seed, mesocarp and capsule of Snake tomato (*Trichosanthes cucumerina*). *Acta Velit* 4(3):9-37.
131. Ehigie AF, Abdulrasak MA, Ehigie OL (2018) Biochemical Properties of Rhodanese from Almond (*Prunus amygdalus*) Nuts. *Pan African Journal of Life Sciences* 1(1):17-24.
132. Bartels A, Mock HP, Papenbrock J (2007) Differential expression of *Arabidopsis* sulfurtransferases under various growth conditions. *Plant Physiol Biochem* 45(3-4):178-187.
133. Bauer M, Papenbrock J (2002) Identification and characterization of single-domain thiosulfate sulfurtransferases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 532(3):427-431.
134. Li B, Hou L, Song C, Wang Z, Xue Q, Li Y, Shi W (2022) Biological function of calcium-sensing receptor (CAS) and its coupling calcium signaling in plants. *Plant Physiol Biochem* 180: 74-80.
135. Vojta L, Horvat L, Fulgosi H (2012) Balancing chloroplast redox status-regulation of FNR binding and release. *Period Biol* 114:25-31.
136. Vojta L, Fulgosi H (2019) Topology of TROL protein in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 166:300-308.
137. Kekić T, Fulgosi H, Vojta L, Bertoša B (2020) Molecular basis of ferredoxin:NADP⁽⁺⁾ reductase interactions with FNR binding domains from TROL and Tic62 proteins. *J Mol Struct* 12:128281.
138. Jurić S (2010) The role of the gene product At4g01050 in the regulation of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet).
139. Hanzer R (2016) Funkcijska analiza domene PEPE proteina TROL iz biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) i njezina uloga u regulaciji fotosinteze (Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju; Sveučilište u Dubrovniku; Institut Ruđer Bošković).
140. Maynard DN, Hochmuth GJ (2006) Knott's handbook for vegetable growers. John Wiley & Sons, Hoboken 5:143-248.
141. Wellburn A (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144(3):307-313.

142. Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44(1):276-287.
143. Aebi H (1984) Catalase in vitro. U: *Methods in enzymology*, Academic Press, San Diego 105:121-126.
144. Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22(5):867-880.
145. Dumančić E, Vojta L, i Fulgosi H (2025) Confocal laser scanning microscopy of light-independent ROS in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. TROL-FNR Mutants. *Int J Mol Sci* 26(14):7000.
146. Dumančić E, Vojta L, Fulgosi H (2023).Beginners guide to sample preparation techniques for transmission electron microscopy. *Period Biol* 125(1-2):123-131.
147. Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11(1):15-19.
148. Yamori W, Shikanai T (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu Rev Plant Biol* 67(1):81-106.
149. Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28(8):1056-1071.
150. Hald S, Nandha B, Gallois P, Johnson GN (2008) Feedback regulation of photosynthetic electron transport by NADP(H) redox poise. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* 1777(5):433-440.
151. Rac A (2021) Molekularna analiza elemenata interakcije FNR-TROL (Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet).
152. Vojta L, Rac-Justament A, Zechmann B, Fulgosi H (2023) Thylakoid rhodanese-like protein–ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase interaction is integrated into plant redox homeostasis system. *Antioxidants* 12(10):1838.
153. Rodriguez RE, Lodeyro A, Poli HO, Zurbriggen M, Peisker M, Palatnik JF, Carrillo N (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. *Plant Physiol* 143(2):639-649.
154. Palatnik JF, Valle EM, Carrillo N (1997) Oxidative stress causes ferredoxin-NADP⁺ reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. *Plant Physiol* 115(4):1721-1727.
155. Bianchi V, Haggård-Ljungquist E, Pontis E, Reichard P (1995) Interruption of the ferredoxin (flavodoxin) NADP⁺ oxidoreductase gene of *Escherichia coli* does not affect anaerobic growth but increases sensitivity to paraquat. *J Bacteriol* 177(15):4528-4531.

156. Krapp AR, Rodriguez RE, Poli HO, Paladini DH, Palatnik JF, Carrillo N (2002) The flavoenzyme ferredoxin (flavodoxin)-NADP(H) reductase modulates NADP(H) homeostasis during the soxRS response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(5):1474-1480.
157. Krapp AR, Carrillo N (1995) Functional complementation of the mvrA mutation of *Escherichia coli* by plant ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys* 317(1):215-221.
158. Krapp AR, Tognetti VB, Carrillo N, Acevedo A (1997) The role of ferredoxin-NADP⁺ reductase in the concerted cell defense against oxidative damage: studies using *Escherichia coli* mutants and cloned plant genes. *Eur J Biochem* 249(2):556-563.
159. Kitayama M, Togasaki RK (1995) Purification and cDNA isolation of chloroplastic phosphoglycerate kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 107(2):393.
160. Lehtimäki N, Lintala M, Allahverdiyeva Y, Aro EM, Mulo P (2010) Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer. *J Plant Physiol* 167(12):1018-1022.
161. Hanke GT, Hase T (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf-type ferredoxins in *Arabidopsis*, as revealed by RNA interference. *Photochem Photobio.* 84(6):1302-1309.
162. Hajirezaei MR, Peisker M, Tschiersch H, Palatnik JF, Valle EM, Carrillo N, Sonnewald U (2002) Small changes in the activity of chloroplastic NADP⁺-dependent ferredoxin oxidoreductase lead to impaired plant growth and restrict photosynthetic activity of transgenic tobacco plants. *Plant J* 29(3):281-293.
163. Wang X, Vignjevic M, Jiang D, Jacobsen S, Wollenweber B (2014) Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. *J Exp Bot* 65(22):6441-6456.
164. Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33(4):453-467.
165. Pantoja-Uceda D, Lopez-Mendez B, Koshiha S, Inoue M, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S, Güntert P (2005) Solution structure of the rhodanese homology domain At4g01050 (175-295) from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci* 14: 224-230.
166. Garuti L, Roberti M, Pizzirani D (2008) Synthetic small molecule Cdc25 phosphatases inhibitors. *Curr Med Chem* 15(6):573-580.
167. Laloi C, Havaux M (2015) Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Front Plant Sci* 6:39.
168. Triantaphylidès C, Havaux M (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14(4):219-228.

169. Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanisms. *Photosynth Res* 98(1-3):551-564.
170. Hideg É, Barta C, Kálai T, Vass I, Hideg K, Asada K (2002) Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol* 43(10):1154-1164.
171. Anderson J M, Chow W S, Park Y I (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res* 46(1-2):129-139.
172. Lu C, Zhang J (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J Exp Bot* 50(336):1199-1206.
173. Demmig-Adams B, Adams WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Biol* 43(1):599-626.
174. Tikkanen M, Mekala NR, Aro EM (2014) Photosystem II photoinhibition–repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1837(2):210-215.
175. Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 10(3):296-302.
176. Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51(2):163-190.
177. Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 3(4):147-151.
178. Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Biol* 50(1):333-359.
179. Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol Plant* 83(4):702-708.
180. Muller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 25(4):1558-1566.
181. Walter J, Kromdijk J (2022) Here comes the sun: How optimization of photosynthetic light reactions can boost crop yields. *J Integr Plant Biol* 64(2):564-591.
182. Krieger-Liszkay A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56(411):337-346.
183. Alboresi A, Storti M, Morosinotto T (2019) Balancing protection and efficiency in the regulation of photosynthetic electron transport across plant evolution. *New Phytol* 221(1):105-109.

184. Jiang YP, Cheng F, Zhou YH, Xia XJ, Mao WH, Shi K, Yu JQ (2012) Cellular glutathione redox homeostasis plays an important role in the brassinosteroid-induced increase in CO₂ assimilation in *Cucumis sativus*. *New Phytol* 194(4):932-943.
185. Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Lemaire SD (2013) Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* 4:470.
186. Foyer CH, Noctor G (2020) Redox homeostasis and signaling in a higher-CO₂ world. *Annu Rev Plant Biol* 71(1):157-182.
187. Lee JS (2010) Stomatal opening mechanism of CAM plants. *J Plant Biol* 53(1):19-23.
188. Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol* 59:89-113.
189. Aro EM, McCaffery S, Anderson JM (1993) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Physiol Plant* 88(4):601-611.
190. Lichtenthaler HK, Burkart S (1999) Photosynthesis and high light stress. *Bulg J Plant Physiol* 25(3-4):3-16.
191. Fischer BB, Hideg E, Krieger-Liszkay A (2013) Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal* 18(16):2145-2162.
192. Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1(1):F4-3.
193. Murchie EH, Niyogi KK (2011) Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. *J Exp Bot* 62(3):967-973.
194. Roach T, Krieger-Liszkay A (2014) Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Curr Protein Pept Sci* 15(4):351-362.
195. Smith K, Strand DD, Kramer DM, Walker BJ (2024) The role of photorespiration in preventing feedback regulation via ATP synthase in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Environ* 47(2):416-428.
196. Campbell WJ, Ogren WL (1990) Electron transport through photosystem I stimulates light activation of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by rubisco activase. *Plant Physiol* 94(2):479-484.
197. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9):405-410.
198. Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biol* 6(3):269-279.

199. Sankar B, Karthishwaran K, Somasundaram R (2016) Leaf anatomical changes in peanut plants in relation to drought stress with or without paclobutrazol and ABA. *J Phytol* 5:25-29.
200. Shin JH, Son JE (2015) Changes in electrical conductivity and moisture content of substrate and their subsequent effects on transpiration rate, water use efficiency, and plant growth in the soilless culture of paprika (*Capsicum annuum* L.). *Hortic Environ Biotechnol* 56:178-185.
201. Von Caemmerer SV, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153(4):376-387.
202. Viil J, Laisk A, Oja V, Parnik T (1977) Enhancement of photosynthesis caused by oxygen under saturating irradiance and high CO₂ concentrations. *Photosynthetica* 11:251-259.
203. Sharwood RE (2017) Engineering chloroplasts to improve Rubisco catalysis: prospects for translating improvements into food and fiber crops. *New Phytol* 213(2):494-510.
204. Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 31(5):602-621.
205. Sage RF (2002) Variation in the k(cat) of Rubisco in C₃ and C₄ plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *J Exp Bot* 53(369):609-620.
206. Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* 11:861-905.
207. Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3(6):455-460.
208. Busch FA, Sage RF (2017) The sensitivity of photosynthesis to O₂ and CO₂ concentration identifies strong Rubisco control above the thermal optimum. *New Phytol* 213(3):1036-1051.

ŽIVOTOPIS

Ena Dumančić rođena je Osijeku gdje je završila Osnovnu školu Vladimira Becića i Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku. Preddiplomski studij Biologije na Odjelu za Biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku upisala je 2015. godine. Diplomski studij eksperimentalne biologije: fiziologija i imunobiologija upisala je 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad „Utjecaj srebrovog nitrata na aktivnost antioksidacijskih enzima u biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.)“ izradila je na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen. Poslijediplomski studij upisala je 2021. Sudjelovala je na četiri konferencije: VIB conference series, Applied Bioinformatics in Life Sciences (4th edition), 2022, Leuven, Belgija, s posterskim priopćenjem, 4th Croatian Microscopy Congress with International Participation, 2022, Poreč, Hrvatska, s oralnom prezentacijom, 7th Faculty of Science PhD Student Symposium, 2023 Zagreb, Hrvatska, s oralnom prezentacijom, VISCEA 7th International Conference on "Plant Abiotic Stress Tolerance", 2024, Beč, Austrija, s oralnom prezentacijom, 8th Faculty of Science PhD Student Symposium, 2024, Zagreb, Hrvatska, s oralnom prezentacijom, a 2024. i 2025. bila je i član Organizacijskog odbora simpozija.

Kao autorica i koautorica sudjelovala je u objavi tri znanstvena članka.

Dumančić, Ena; Vojta, Lea; Fulgosi, Hrvoje

Confocal Laser Scanning Microscopy of Light-Independent ROS in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. TROL-FNR Mutants // International Journal of Molecular Sciences, 26 (2025), 14; 7000-7000.

Vojta, Lea; Fulgosi, Hrvoje; Tomašić Paić, Ana; Dumančić, Ena

Construction of the *Arabidopsis* isogenic lines containing dually localized protein TROL only in the inner chloroplast envelope membrane // Acta Botanica Croatica, 84 (2025), 2; 4026, 16.

Dumančić, Ena ; Vojta, Lea ; Fulgosi, Hrvoje

Beginners guide to sample preparation techniques for transmission electron microscopy // Periodicum Biologorum, 125 (2023), 1-2; 123-131.