Utjecaj abiotskog stresa niskim temperaturama na razinu specijaliziranih metabolita u lišću raštike

Zrnić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:880888

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ ABIOTSKOG STRESA NISKIM TEMPERATURAMA NA RAZINU SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U LIŠĆU RAŠTIKE

DIPLOMSKI RAD

Marija Zrnić

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Hortikultura-Povrćarstvo

UTJECAJ ABIOTSKOG STRESA NISKIM TEMPERATURAMA NA RAZINU SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U LIŠĆU RAŠTIKE

DIPLOMSKI RAD

Marija Zrnić

Mentorice: dr. sc. Dunja Šamec

prof. dr. sc. Nina Toth

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTICE

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marija Zrnić**, JMBAG 0178095945, rođena dana 1. 3. 1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ ABIOTSKOG STRESA NISKIM TEMPERATURAMA NA RAZINU SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U LIŠĆU RAŠTIKE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju su odobrile mentorice;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Marije Zrnić**, JMBAG 0178095945, naslova

UTJECAJ ABIOTSKOG STRESA NISKIM TEMPERATURAMA NA RAZINU SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U LIŠĆU RAŠTIKE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1.	dr. sc. Dunja Šamec, mentorica	_____
	prof. dr. sc. Nina Toth, mentorica	_____
2.	doc. dr. sc. Sanja Fabek Uher, članica	_____
3.	doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur, članica	_____

Zahvala

Htjela bih zahvaliti mentorici dr. sc. Dunji Šamec na ukazanom povjerenju i prilici za izradu ovog diplomskog rada. Velika joj hvala na strpljenju, podršci i dostupnosti tijekom laboratorijskih analiza i tijekom pisanja rada.

Sumentorici prof. dr. sc. Nini Toth zahvaljujem na pomoći i sugestijama kojima je pridonijela kvaliteti ovog rada te na moralnoj podršci koju mi je pružala tijekom studija.

Zahvalna sam i obitelji, prijateljima i kolegama što su me bodrili tijekom studija te mi uljepšali studentske dane.

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Pregled literature 2

2. 1. Morfološka, biološka i agronomska svojstva raštike 2

2. 2. Hranidbena i funkcionalna vrijednost raštike 4

2. 3. 1. Hranjive tvari, vitamini i minerali 4
2. 3. 2. Specijalizirani metaboliti 6

2. 3. Stres uzrokovan niskim temperaturama 9

2. 3. 1. Utjecaj abiotskog stresa na biljke 9
2. 3. 2. Aklimatizacija i tolerantnost na stres niskim temperaturama 10
2. 3. 3. Markeri abiotskog stresa 11

3. Materijali i metode 13

3. 1. Materijali i provedba pokusa 13

3. 2. Test klijavosti 15

3. 3. Tretman stresom niskim temperaturama 15

3. 4. Određivanje razine prolina 17

3. 5. Određivanje razine specijaliziranih metabolita iz skupine polifenola . 17

3. 5. 1. Ukupni polifenoli 18
3. 5. 2. Ukupni flavonoidi 18
3. 5. 3. Ukupne fenolne kiseline 19

3. 6. Određivanje ukupnih glukozinolata 20

3. 7. Određivanje razine klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida 21

3. 8. Statistička obrada podataka 21

4. Rezultati i rasprava 22

4. 1. Test klijavosti 22

4. 2. Prolin 22

4. 3. Fenolni spojevi 24

4. 3. 1. Ukupni polifenoli 24
4. 3. 2. Ukupni flavonoidi 25
4. 3. 3. Ukupne fenolne kiseline 26

4. 4. Glukozinolati 27

4. 5. Fotosintetski pigmenti 29

4. 5. 1. Klorofili 29
4. 5. 2. Karotenoidi 32

5. Zaključak 34

6. Popis literature 36

7. Životopis 40

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marije Zrnić**, naslova

UTJECAJ ABIOTSKOG STRESA NISKIM TEMPERATURAMA NA RAZINU SPECIJALIZIRANIH METABOLITA U LIŠĆU RAŠTIKE

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj stresa niskim temperaturama na sadržaj specijaliziranih metabolita: glukozinolata, ukupnih fenola, flavonoida, fenolnih kiselina i karotenoida, markera stresa prolina te sadržaja klorofila *a* i *b* u lišću raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Raštika je uzgojena u kontroliranim uvjetima na temperaturi od 21 °C i fotoperiodu od 16 sati dana i 8 sati noći do starosti od 5 i 6 tjedana te podvrgnuta stresu pothlađivanjem (8 °C) i smrzavanjem (-8 °C). Koncentracije metabolita te markera stresa u tkivu listova raštike utvrđene su temeljem UV/VIS spektrometrije. Stres niskim temperaturama utjecao je na sadržaj prolina, ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina, klorofila *a* i *b* te karotenoida no trend i jačina ovise o vrsti stresa te starosti biljke. Općenito, temperaturni stres smrzavanjem djelovao je na smanjenje sadržaja polifenolnih spojeva. Temperatura i starost nisu imale značajan utjecaj na sadržaj glukozinolata. Kod starijih biljaka, stres niskom temperaturom je utjecao na smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata. Potrebno je provesti daljnja istraživanja koja bi razjasnila utjecaj stresa niskim temperaturama na sadržaj pojedinog metabolita u raštici.

Ključne riječi: *Brassica oleracea* var. *acephala*, stres niskom temperaturom, prolin, polifenoli, glukozinolati

Summary

Of the master's thesis – student **Marija Zrnić,** entitled

INFLUENCE OF LOW TEMPERATURE ABIOTIC STRESS ON THE CONTENT OF SPECIALIZED METABOLITES IN THE LEAVES OF KALE

The aim of this study was to investigate the effect of low temperature stress on the content of specialized metabolites – glucosinolates, total phenols, flavonoids, phenolic acids and carotenoids, stress markers such as proline and chlorophyll *a* and *b* in the leaves of kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Kale was grown in a controlled environment at 21 °C and a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness. 5 and 6 weeks old plants were subjected to chilling (8 °C) and freezing (-8 °C) stress. Metabolite content of kale leaf tissue was determined by UV/VIS spectrometry. Low temperature stress affected the content of proline, total polyphenols, flavonoids, phenolic acids, chlorophyll *a* and *b* and carotenoids, but the trend and severity depend on the type of stress and the age of the plant. In general, freezing temperature stress reduced the content of polyphenols. Temperature and age had no significant effect on glucosinolate content. Low temperature stress reduced the content of photosynthetic pigments in older plants. Further research is needed to elucidate the effect of low temperature stress on the content of a particular metabolite in kale.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*, low temperature stress, proline, polyphenols, glucosinolates

1. Uvod

Predviđa se da će u 21. stoljeću i u tropskim i u umjerenim krajevima dolaziti do pojave kratkoročnih i dugoročnih niskih temperatura (Nievola i sur., 2017). Stres niskim temperaturama već je jedan od najvećih ograničavajućih čimbenika u poljoprivrednoj proizvodnji na otvorenom (Rasool i sur., 2014; Sanghera i sur., 2011; Yadav, 2009). Za uspješnu proizvodnju u takvim uvjetima, morat će se koristiti one poljoprivredne kulture koje mogu preživjeti kasni proljetni i rani jesenski mraz (Yadav, 2009). Uzgoj takvih kultura omogućio bi profitabilan i produktivan uzgoj s manjim rizikom u određenim geografskim regijama (Sanghera i sur., 2011).

Raštika je jedna od kultura čiji uzgoj nije ograničen niskim temperaturama. Ovisno o trajanju stresa može podnijeti temperature od -10 do -15 °C (Lešić i sur., 2016), što je jedan od razloga popularnosti njezinog uzgoja u zemljama poput SAD-a. Još jedan razlog očituje se u tome što je raštika u svijetu često svrstana u kategoriju „super hrane“, tj. funkcionalne hrane kao biljna vrsta koja ima znanstveno potvrđeno blagotvorno djelovanje na ljudski organizam. To je zahvaljujući fitokemikalijama poput glukozinolata, polifenola i karotenoida (Šamec i sur., 2018), produktima sekundarnog metabolizma (Šamec, 2013).

Sekundarni, odnosno specijalizirani metaboliti imaju ulogu u razvoju biljke i njezinoj interakciji s okolinom te u prilagodbi i preživljavanju abiotskog i biotskog stresa (Fabek, 2012; Šamec, 2013). Tako je zabilježeno i da uslijed niskih temperatura kao odgovor na stres, biljke povećavaju koncentraciju specijaliziranih metabolita koji imaju zaštitni učinak po biljku (Rasool i sur., 2014; Sanghera i sur., 2011; Janská i sur., 2010).

Dok autori poput Borges i sur. (2018) sugeriraju kako je izlaganjem biljaka stresu moguće uzgojiti biljke s povećanim udjelom pojedinih poželjnih spojeva, nedovoljno je poznato o utjecaju niskih temperatura na sadržaj pojedinih specijaliziranih metabolita u raštici. S obzirom na to da u Hrvatskoj dosad nisu provedena takva istraživanja na lokalnim populacijama raštike, za ovo su istraživanje postavljene sljedeće hipoteze:

1) Stres uzrokovan niskim temperaturama utječe na sadržaj prolina, ukupnih polifenola, flavonoida, glukozinolata, karotenoida, klorofila *a* i *b* u raštici.
2) Postoji razlika u sadržaju specijaliziranih metabolita između biljaka izloženih temperaturama od 8 i -8 °C.
3) Postoji razlika u sadržaju specijaliziranih metabolita između biljaka starih 5 i 6 tjedana.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1) Utvrditi kako temperatura od 21, 8 i -8 °C utječe na sadržaj prolina, ukupnih polifenola, flavonoida, glukozinolata, karotenoida, klorofila *a* i *b* u lišću raštike.
2) Usporediti sadržaj specijaliziranih metabolita s obzirom na starost biljke u pojedinom temperaturnom tretmanu.

2. Pregled literature

2.1. Morfološka, biološka i agronomska svojstva raštike

Pretpostavlja se da su moderne kupusnjače nastale kultivacijom divljih srodnika *Brassica oleracea*, čija je dugotrajna selekcija ljudskim posredovanjem rezultirala značajnom morfološkom raznolikošću biljnih organa. Tako su kod kelja pupčara hipertrofirani postrani pupovi, a kod cvjetače i brokule cvatovi. Moderna terminologija nastale tipove svrstava u skupine kultivara (*cultivar-groups*), a u skupini *acephala* nalazi se širok raspon morfotipova (Šamec i sur., 2018).

Lešić i sur. (2016) navode da je različitim formama varijeteta *Brassica oleracea* var. *acephala* zajedničko to što im je u vegetativnoj fazi vršni pup aktivan i otvoren, tj. ne tvori glavu. Varijetet *acephala* ima dvije forme: f. *viridis*, glatkog lišća, koja se u nas najčešće zove raštika (engleski *collard*) i f. *sabellica*, mjehurastog ili kovrčavog lišća, koja se u nas zove lisnati kelj (engleski *kale*).

Matotan (2008) opisuje raštiku kao dvogodišnju zeljastu biljku dobro razvijenog vretenastog korijena koji se jako grana te stabljike koja je u prvoj godini visine između 0,5 i 2 m, ovisno o varijetetu (visoki ili niski). Budući da se internodiji stabljike skraćuju od baze prema vrhu, listovi koji na donjem i srednjem dijelu stabljike spiralno obavijaju stabljiku u vršnom dijelu čine rozetu (slika 2.1.1.).



Slika 2.1.1. Raštika u vegetativnoj fazi.

Izvor: edge.bonnieplants.com

Donji su listovi na dužim peteljkama, okrugli ili ovalni, valovitog ili malo nazubljenog ruba, glatke ili malo valovite površine te prekriveni voštanom prevlakom. Najčešće su zelene ili plavozelene boje (slika 2.1.2.), a mogu imati i malo antocijanskog obojenja (Lešić i sur., 2016).

.



Slika 2.1.2. Listovi raštike

Izvor: ordinacija.vecernji.hr

Iz pazuha listova gornjeg dijela stabljike u drugoj godini vegetacije izbijaju cvjetne grane s rahlim grozdastim cvatovima. Cvjetovi raštike su tetramerni, građe karakteristične za kupusnjače. Sastoje se od četiri eliptična lapa, četiri sumporasto žute latice, 6 prašnika od kojih su dva srasla i nešto kraćih prašničkih niti te jedne nadrasle dvogradne plodnice s više sjemenih zametaka. Plod je do 12 cm dugačka cilindrična komuška u kojoj se sjeme nalazi poredano u dva reda. Sjeme je jajasto-okruglastog oblika, crvenkasto do plavičasto smeđe boje, promjera do 3 mm. Masa 1000 sjemenki najčešće je 3-4 grama. U jednom gramu ima 250-350 sjemenki koje uz pravilno čuvanje mogu zadržati klijavost do 5 godina (Matotan, 2008).

Uvjeti za klijanje i nicanje raštike jednaki su kao i uvjeti za uzgoj ostalih kupusnjača. Preporučuje se uzgoj na dubokim, strukturnim tlima, a optimalne temperature za rast su od 15 do 20 °C. Izrazito je skromnih zahtjeva prema vanjskim uvjetima te među kupusnjačama najbolje podnosi visoke temperature i sušu tijekom ljeta, kao i niske temperature i snijeg tijekom zime. Tijekom sušnog razdoblja zaustavlja rast, listovi joj postaju tvrdi i kožasti, no nakon kiše razvija novo, kvalitetno lišće. Dobro podnosi zimske temperature do -10 °C, a kroz kraće vrijeme i do -15 °C (Lešić i sur., 2016; Matotan, 2008).

Uslijed ekstenzivnog uzgoja u različitim okolišnim uvjetima, raštika ima veliki broj genotipova koji su najčešće prilagođeni rastu u nepovoljnim uvjetima (Urlić, 2014). Do sada nije bilo selekcije tog izvornog materijala, izvrsno prilagođenog na klimatske i edafske uvjete našeg priobalja (Lešić i sur., 2016) te se na sortnoj listi Republike Hrvatske (Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, 2018) ne nalazi niti jedna sorta raštike. Kao povrtna kultura, raštika se uzgaja u priobalnom dijelu Hrvatske, na otocima i u Hercegovini, prvenstveno u vrtovima, a izuzetno rijetko na većim površinama (Matotan, 2008).

Raštika se najčešće uzgaja iz presadnica uzgojenih na gredici uz kuću na zaklonjenom mjestu. U proljetnom uzgoju sjetva počinje krajem veljače ili početkom ožujka, a presadnice s dobro

razvijena 3-4 lista sade se u travnju, obično na nešto veći razmak zbog boljeg korištenja zaliha vlage ljeti. Drugi uobičajeni rok sjetve je u srpnju, a sadnje krajem kolovoza nakon prvih jačih kiša (Lešić i sur., 2016; Matotan, 2008). Lešić i sur. (2016) preporučuju razmak sadnje sličan kao i za ostale kupusnjače (50 × 50 cm ili 60 × 60 cm), dok Matotan (2008) sugerira razmak sadnje 60 × 40 cm čime se ostvaruje sklop od oko 40 000 biljaka/ha.

Berba raštike obavlja se obiranjem mladih potpuno razvijenih listova, sukcesivno od baze prema vrhu stabljike (Matotan, 2008). Kad nastupe više temperature, listove proljetne raštike moguće je ostaviti s nekoliko listova i vršnom rozetom da preko ljeta miruju, a na jesen, poslije obilnijih kiša brati mlade listove sve do zime. Ako se biljke ostave do proljeća, moguće je brati postrane izboje prije formiranja cvata (ćimule). Berba raštike iz jesenskog uzgoja počinje u studenom i traje tijekom cijele zime sve do proljeća (Lešić i sur., 2016).

Unatoč tome što se raštiku smatra otpornom na bolesti i štetnike, ne preporučuje se njezin uzgoj na istoj površini najmanje 3 godine (Lešić i sur., 2016; Šamec i sur., 2018).

Prema Lešić i sur. (2016), prinosi raštike uz dobre mjere uzgoja mogu biti 15 do 25 t/ha, tj. prosječno 20 t/ha (Matotan, 2008). Na tržište ju treba dopremiti u što svježijem stanju, a iznimno se može skladištiti do 4 tjedna na oko 0 °C i pri visokoj relativnoj vlazi zraka (Lešić i sur., 2016).

2.2. Hranidbena i funkcionalna vrijednost raštike

2.2.1. Hranjive tvari, vitamini i minerali

Povrtne vrste iz roda *Brassica* važni su izvori vlakana, vitamina i minerala te potencijalni izvor glukozinolata, vitamina C, fenolnih kiselina, flavonola, antocijanidina, karotenoida i aminokiselina (Borges i sur., 2018).

Raštika ima važno mjesto u kulinarstvu i prehrani stanovništva Europe, Azije i Amerike. Budući da je tolerantna na niske temperature, biljke mogu preživjeti zimu i poslužiti kao svježe povrće od kasne jeseni do ranog proljeća sljedeće godine (Šamec i sur., 2018). Lišće raštike najviše se koristi kuhano, samostalno ili s drugim povrćem, krumpirom, bobom, slanutkom i sl. (Lešić i sur., 2016). Isti autori navode nutritivnu vrijednost raštike prikazanu u tablici 2.2.1.1.

Tablica 2.2.1.1. Nutritivna vrijednost 100 g svježeg jestivog dijela raštike.

Hranjiva tvar	**g**
Voda	86,3
Bjelančevine	4,3
Masti	0,9
Ugljikohidrati	2,5
Vlakna	4,2

Izvor: Lešić i sur. (2016).

Šamec i sur. (2018) navode da je raštika genetički vrlo slična lisnatom kelju, što objašnjava sličnosti u njihovom sastavu. Uz izuzetak višeg sadržaja vitamina C kod kelja, za grupu *acephala* ne može se reći da je superiorna ostalim kupusnjačama s obzirom na sadržaj makronutrijenata, minerala, vitamina i masnih kiselina. Ipak, treba uzeti u obzir da razine tih spojeva u biljnom materijalu ovise o okolišnim i uzgojnim čimbenicima te starosti biljke prilikom berbe (Šamec i sur., 2018). Štoviše, kako bi povrće uopće moglo služiti kao dobar izvor minerala, prvo je potrebna adekvatna zastupljenost minerala i nutrijenata u tlu (Fabek, 2012). Lešić i sur. (2016) navode sadržaj glavnih minerala u raštici prikazan u tablici 2.2.1.2., među kojima se ističu kalij, kalcij, fosfor, magnezij i željezo.

Tablica 2.2.1.2. Količina minerala u 100 g svježeg lišća raštike

Mineral	**Mg**
Kalij	490
Kalcij	210
Fosfor	85
Magnezij	30
Željezo	1,9

Izvor: Lešić i sur. (2016).

Šamec i sur. (2018) za kupusnjače iz grupe *acephala* navode visok sadržaj kalcija, folata, riboflavina te vitamina K. Glavni vitamini u raštici prema Lešić i sur. (2016) prikazani su u tablici 2.2.1.3.

Tablica 2.2.1.3. Količina vitamina u 100 g svježeg lišća raštike

Vitamin	**Mg**
A (karoten)	4,10
Vitamin B_1	0,10
Vitamin B_2	0,25
Niacin	2,10
Vitamin C	105

Izvor: Lešić i sur. (2016).

Od organskih kiselina, u raštici su zastupljene jabučna i limunska od 158 do 174, odnosno 32 do 89 mg/100 g svježeg lišća, a nakon jačeg mraza količina ukupnih šećera se povećava gotovo dvostruko (Lešić i sur., 2016).

U zapisima o upotrebi u tradicionalnoj medicini, često se koristi ista riječ za sve lisnate kupusnjače, pa je ponekad teško razaznati kada se koristi grupa *capitata*, a kada grupa *acephala*. Zato je uporaba grupe *acephala* u tradicionalnoj medicini slična onoj ostalih vrsta iz roda *Brassica* koje su se stoljećima koristile kao lijek za gastritis i čir na želucu. Osim ublažavanja simptoma tih bolesti, navodi se upotreba grupe *acephala* i za liječenje šećerne bolesti, reumatizma, oftalmoloških poteškoća, krvnih bolesti, anemije, pretilosti itd. (Šamec i sur., 2018). Zdravstvena vrijednost raštike uspoređuje se sa zdravstvenom vrijednosti kupusa i kelja (Lešić i sur., 2016).

Osim ispunjavanja primarne zadaće, da zadovolji glad i opskrbi organizam hranjivim tvarima, sve više potrošača vjeruje da hrana može izravno doprinijeti ljudskom zdravlju, prevencijom bolesti i poboljšanjem tjelesnog i psihičkog zdravlja. Ona hrana za koju je znanstveno dokazano da može poboljšati opće uvjete u tijelu, smanjiti rizik od nekih bolesti i/ili se može koristiti kao lijek, poznata je pod nazivom *funkcionalna hrana* (Šamec i sur., 2018).

2.2.2. Specijalizirani metaboliti

Među funkcionalnim namirnicama biljnog porijekla, ističu se vrste iz roda *Brassica* jer su uz vlakna i esencijalne minerale, prirodan izvor fitokemikalija, tj. sekundarnih metabolita. To su produkti biljnog sekundarnog metabolizma koji imaju važne uloge u interakciji biljke s okolinom (Fabek, 2012; Šamec, 2013). Biljni sekundarni metaboliti se u novije vrijeme nazivaju specijaliziranim metabolitima budući da su neki prisutni samo kod pojedinih vrsta (Tissier i sur., 2015). Neke od njihovih glavnih uloga su:

- Zaštita biljaka od biljojeda i mikrobnih patogena,
- Zaslužni su za boju, miris ili okus organa u kojima su prisutni, služe kao atraktanti za oprašivače te olakšavaju širenje voća i sjemena,
- Uloga pri kompeticiji između biljaka (alelopatija), kao signalne molekule prilikom simbioze između biljaka i mikroba u korijenju (Bhatla i Lal, 2018).

Novija istraživanja potvrđuju njihovu esencijalnu ulogu u razvoju biljaka, a posebice u prilagodbi i preživljavanju nepovoljnih uvjeta uslijed abiotskih i biotskih stresnih čimbenika (Fabek, 2012; Šamec, 2013). Specijalizirane metabolite moguće je kategorizirati na temelju njihove kemijske strukture, sastava, topivosti u raznim otapalima ili prema načinu sinteze (Bhatla i Lal, 2018). Detaljnija klasifikacija specijaliziranih metabolita vidljive su u tablici 2.2.2.1.

Tablica 2.2.2.1. Klasifikacija specijaliziranih metabolita

Polifenoli	Flavonoidi: flavonoli flavoni flavan-3-oli antocijani flavanoni izoflavoni Neflavonoidi: fenolne kiseline hidroksicinamati stilibeni
Spojevi sa sumporom	Glukozinolati Izotiocijanati

Terpeni	Monoterpeni Diterpeni Seskviterpeni Triterpeni Karotenoidi
Alkaloidi	Benzilizokvinolini Tropan alkaloidi Nikotin Terpenoid indol alkaloidi Purinski alkaloidi Pirolizidinski alkaloidi Kvinolizidinski alkaloidi Steroidal glikoalkaloidi Konini Betalaini

Izvor: Šamec (2013).

Mnogi su biljni specijalizirani metaboliti odgovorni za blagotvoran i pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi, stoga ih se naziva i bioaktivnim komponentama, fitokemikalijama i nutraceuticima (Šamec, 2013). Iako nisu esencijalne tvari za funkcioniranje ljudskog organizma, pomažu mu štiteći ga u borbi i prevenciji bolesti, balansirajući ili stimulirajući tjelesne funkcije. Djelovanje specijaliziranih metabolita u ljudskom organizmu može biti antioksidativno, djelovanje na endokrini sustav i hormonima slično djelovanje, regulacija i stimulacija enzima, interferencija s replikacijom DNK, antibakterijsko, fizikalno i termogeno djelovanje te regulacija krvnog tlaka putem vazodilatacije (Fabek, 2012).

Specijalizirani metaboliti imaju aditivni i sinergistički učinak koji može pridonijeti antikancerogenim, antioksidativnim, protuupalnim i kardioprotektivnim svojstvima koja se povezuju s konzumacijom kupusnjača (Šamec i Salopek-Sondi, 2019). Pozitivan učinak kupusnjača na prevenciju karcinoma povezuje se s konzumacijom fitokemikalija poput glukozinolata, polifenola i karotenoida (Šamec i sur., 2018).

Na sadržaj fitokemikalija i njihov profil u biljnim tkivima uvelike utječu varijacije u agronomskim čimbenicima (npr. vrsta, kultivar, razvojni stadij, biljni organ, gnojidba i pH tla) te klimatski čimbenici poput intenziteta svjetla i dostupnosti vode. Razumijevanje utjecaja agronomskih i klimatskih čimbenika na biljku nužno je kako bi se potencijalno mogao povisiti sadržaj poželjnih spojeva, čime se može povisiti korist za ljudsko zdravlje te sposobnost biljke da se zaštiti (Borges i sur., 2018).

Glukozinolati

Među specijaliziranim metabolitima koje sadržavaju vrste roda *Brassica*, posebno mjesto imaju glukozinolati, spojevi koji sadrže sumpor čiji produkti razgradnje imaju antikancerogenu aktivnost, što potvrđuju epidemiološke studije (Fabek, 2012; Šamec i sur., 2018; Šamec i Salopek-Sondi, 2019). Osim zbog potencijalnih antikancerogenih spojeva, prisutnost glukozinolata u kupusnjačama značajna je zbog okusa i mirisa. Pikantan i opor

okus mnogih kupusnjača koje se koriste za salatu pružaju karakterističnu izotiocijanati, a njihovom degradacijom pri kuhanju nastaju komponente značajne za okus i miris (Mithen, 2001).

Primarna uloga glukozinolata u biljci je obrana od insekata i fitopatogena, a neka istraživanja sugeriraju da mogu služiti i kao rezerva sumpora i/ili dušika (Fabek, 2012). Nisu bioaktivni dok se enzimatski ne hidroliziraju endogenim biljnim enzimom mirozinazom u razne bioaktivne produkte (Šamec i sur., 2018). Produkti degradacije glukozinolata obično su repelentni za biljojede poput ptica, sisavaca i mekušaca te su toksični za mikroorganizme. Međutim, neki su se štetnici specijalizirali za hranjenje na biljkama koje sadrže glukozinolate, pa tako glukozinolati služe i za privlačenje i stimulaciju ovipozicije i ishrane specijaliziranih biljojeda (Mithen, 2001).

Pretpostavlja se da su upravo proizvodi razgradnje glukozinolata aktivne tvari prilikom biofumigacije za koju se kupusnjače sve više koriste. To je postupak u kojemu se biljni materijal oranjem unese u poljoprivredno tlo kako bi se potisnuli patogeni, nematode i korovi (Halkier i Gershenzon, 2006).

Istraživanja pokazuju da u usporedbi s ostalim vrstama iz roda *Brassica*, grupa *acephala* kojoj pripada raštika ne sadrži viši udio ukupnih glukozinolata, no udio pojedinih glukozinolata se razlikuje. Udio glukozinolata u raštici, kao i kod ostalih vrsta iz roda *Brassica*, ovisi o razvojnom stadiju (Velasco i sur., 2007), uvjetima uzgoja, lokaciji i roku uzgoja, razmacima sadnje (sklopu), opskrbljenosti tla hranjivima, gnojidbi i navodnjavanju (Šamec i sur., 2018; Fabek, 2012).

Polifenoli

Fenolni spojevi su široka i najviše proučena skupina specijaliziranih metabolita (Šamec i sur., 2018). Sastoje se od jedne ili više fenolnih skupina te se zato zovu fenolni spojevi ili polifenoli. Neki su fenoli prisutni kod svih biljaka, dok su drugi ograničeni na pojedine razrede, porodice ili rodove (Bhatla i Lal, 2018). Polifenoli su poznati po povoljnom utjecaju na ljudsko zdravlje. Veže ih se uz borbu s pretilošću, šećernom bolesti drugog tipa, metaboličkim sindromom, neurodegenerativnim bolestima, aterosklerozom i rakom. U kombinaciji s ostalim spojevima, polifenoli značajno pridonose biološkoj aktivnosti vrsta roda *Brassica.* Usporednim je studijama utvrđeno da fenolni profili različitih varijeteta *B. oleracea* pokazuju slične uzorke, a njihova koncentracija u raštici ovisi o sorti, stupnju razvijenosti biljke, lokaciji uzgoja i okolišnim čimbenicima (Šamec i sur., 2018). Na sadržaj polifenola mogu utjecati sorta, klimatski uvjeti, biotski i abiotski stresovi uzrokovani prije berbe i uvjetima nakon berbe, kao i starost biljke (Jahangir i sur., 2009).

Kao što je vidljivo u tablici 2.3.1.4., među polifenole spadaju *flavonoidi*, primjerice antocijani i flavan-3-oli, i neflavonoidi poput *fenolnih kiselina*. Flavonoidi i fenolne kiseline služe pri zaštiti biljke od UV zračenja, mikroorganizama i štetnika. Kvaliteta i brojnost fenola razlikuje se s obzirom na biljnu vrstu, organ, stadij rasta i okolišne uvijete (Borges i sur., 2018).

Flavonoidi su polifenolni spojevi prisutni u biljkama, u epidermi lišća i pokožici voća u visokim koncentracijama. Sudjeluju u pigmentaciji, stimulaciji kvržica u kojima se fiksira dušik te otpornosti na bolesti. Flavonoidi daju boju listovima i laticama, sudjeluju u regulaciji

enzimatske aktivnosti te mogu biti antioksidansi i prooksidansi. Većina ih je obojena, akumuliraju se ili u vakuolama ili kromoplastima i kloroplastima (Bhatla i Lal, 2018). Značajna je njihova uloga kao metabolita koji se sintetiziraju kao odgovor na biotski ili abiotski stres (Jahangir i sur., 2009), a na njihovu akumulaciju mogu utjecati klimatski uvjeti poput temperature (Hykkerud Steindal, 2013). U raštici su među flavonoidima dominantni kvercetin i kempferol (Šamec i sur., 2018).

Fenolne kiseline mogu se naći u svim biljnim vrstama a također sudjeluju u interakciji biljaka i okoline. Dominantne fenolne kiseline u raštici su iz hidroksicimetne skupine, a u listovima derivati kava kiseline, ferulične i sinapinske kiseline (Šamec i sur., 2018).

Karotenoidi

Karotenoidi su kategorija fitonutrijenata odgovornih za crvenu, narančastu i svijetložutu boju kod raznog povrća i voća. Karotenoidi imaju ulogu prilikom fotosinteze i sudjeluju u obrambenim mehanizmima, kao odgovor na biotske i abiotske stresove te u razvoju kao signalne molekule, u procesu fotomorfogeneze te privlačenju oprašivača (Borges i sur., 2018).

Unatoč tome što klorofil prikriva njihovu boju, kupusnjače su dobar izvor karotenoida: β-karotena (provitamina A) i luteina koji uz zeaksantin kod ljudi imaju važnu ulogu u zdravlju očiju zahvaljujući snažnom antioksidativnom djelovanju. α i β-karoten su prekursori vitaminu A koji je značajan za zdravu kožu, kosti, gastrointestinalni i dišni sustav. Količina karotenoida kod grupe *acephala* ovisi o okolišnim uvjetima te stadiju zrelosti biljke. Raštika se može smatrati dobrim izvorom karotenoida, a njihov udio ovisi o okolišnim čimbenicima tijekom rasta i stadiju razvoja biljke (Šamec i sur., 2018).

Zaključno, sadržaj specijaliziranih metabolita u raštici usporediv je s drugim vrstama iz roda *Brassica,* a razine pojedinih spojeva pod utjecajem su okolišnih čimbenika uzgoja (Šamec i sur., 2018). Zbog genetskih, abiotskih i agronomskih čimbenika (posebice gnojidbe) koji mogu utjecati na hranidbenu i zdravstvenu vrijednost povrća, sastav bioaktivnih i mineralnih tvari glavni je izazov pri proizvodnji povrća kao funkcionalne hrane (Fabek, 2012).

2.3. Stres uzrokovan niskim temperaturama

2.3.1. Utjecaj abiotskog stresa na biljke

Oko dvije trećine kopnene površine svake godine podložno je temperaturama ispod točke smrzavanja, a oko polovice pogađaju temperature ispod -20 °C. Stres uzrokovan niskim temperaturama glavni je okolišni čimbenik koji ograničava poljoprivrednu proizvodnju biljaka (Rasool i sur., 2014; Sanghera i sur., 2011; Yadav, 2009). Budući da se za obrađivanje i poljoprivredu potencijalno pogodnom smatra tek trećina kopnene površine svijeta, a abiotski je stres ograničavajući čimbenik na 90 % te površine, pod uzgojem je tek 1,4 milijardi hektara (Yadav, 2009). Taj stres ne samo da ograničava uvjete u kojima se kulture mogu uzgajati, nego i smanjuje prinose, što ovisi i o drugim meteorološkim uvjetima u određenoj godini. Uz iznimno stresne godine koje uzrokuju značajna smanjenja prinosa, manje ekstremni stres svake godine uzrokuje manje gubitke na većim površinama. Ako prinos nije smanjen, često je

narušena kvaliteta proizvoda. Procjenjuje se da se u svijetu svake godine zbog oštećenja od niskih temperatura izgubi oko 2 milijarde dolara (Sanghera i sur., 2011).

Biljke rastu i razvijaju se maksimalnom brzinom pri optimalnoj temperaturi, tj. u rasponu povoljnih temperatura koje se izmjenjuju tijekom dana. Kada temperatura odstupa od optimalne, kod biljaka nastaju fiziološke, biokemijske, metaboličke i molekularne promjene. Ako se okolišni uvjeti pogoršavaju, procesi u biljkama postaju abnormalni sve dok se ne dosegnu kardinalne točke preživljavanja biljke, nakon kojih dolazi do odumiranja (Yadav, 2009).

Biljke osjetljive na hladnoću stradavaju kada su temperature blizu 15 °C, dok tolerantne biljke preživljavaju na temperaturi ispod 5 °C. Ovisno o tolerantnosti same biljke, šteta uzrokovana niskim temperaturama može se pojaviti nakon nekoliko sati ili dana, što određuje stupanj osjetljivosti neke vrste. Ako se hladnoća iznenada pojavi, šteta nastaje nakon nekoliko minuta i naziva se hladnim šokom (Nievola i sur., 2017). Do stresa pothlađivanjem dolazi kada su temperature između 0 i 15 °C, kada je voda u tekućem stanju, a do stresa smrzavanjem dolazi kada temperatura okoliša dovodi do stvaranja kristala leda (Bhatla i Lal, 2018).

Uslijed temperatura smrzavanja u međustaničnom prostoru stanica biljnog tkiva stvaraju se kristali leda, gradijent tlaka vodene pare uzrokuje izlazak vode iz unutrašnjosti stanice te dolazi do inducirane dehidracije (Yadav, 2009). Upravo zbog posljedica dehidracije, mnoge fiziološke prilagodbe kod biljaka koje im omogućuju da prežive niske temperature slične su onima do kojih dolazi uslijed suše i solnog stresa (Bhatla i Lal, 2018). Štete uzrokuje i promjena u fluidnosti stanične membrane koja dovodi do povećane propusnosti, gubitka vode i osmolita te inaktivacije transportnih kanala (Nievola i sur., 2017). Konačno, uslijed mehaničkog pritiska kristala leda na staničnu stijenku i plazma membranu, dolazi do prsnuća. Šteta na plazma membrani smatra se glavnom štetom od stresa niskim temperaturama (Yadav, 2009).

Stres niskim temperaturama na biljkama se očituje brojnim fenotipskim simptomima (Yadav, 2009) te utječe na vegetativni i generativni stadij životnog ciklusa biljke (Thakur i sur., 2010). Klijavost sjemena je obično slabija, presadnice su zakržljale, javlja se kloroza koja može dovesti do nekroze te venuće i smanjeno busanje kod monokotiledona. Kod žitarica stres utječe na generativni stadij tako što odgađa klasanje i rezultira sterilnošću polena, što se smatra jednim od ključnih čimbenika njihovog smanjenog prinosa (Yadav, 2009). Općenito, stres tijekom generativne faze inducira odbacivanje cvjetova, sterilnost polena, deformaciju polenove cijevi, abortiranje jajne stanice i smanjenje broja sjemenki. To u konačnici smanjuje prinose te ima bitne ekonomske i društvene posljedice, budući da su proizvodi generativne faze biljaka ključne sastavnice prinosa i glavni izvor hrane ljudima (Thakur i sur., 2010).

2.3.2. Aklimatizacija i tolerantnost na stres niskim temperaturama

Iako ne toleriraju sve biljke temperature smrzavanja, mogu povećati svoju tolerantnost u procesu aklimatizacije. To je pojava kod koje uslijed prethodnog izlaganja niskim temperaturama prilikom kojih nije došlo do smrzavanja, biljke stječu tolerantnost na niske temperature (Rasool i sur., 2014). Većina biljaka umjerenih krajeva razvila je stupanj

tolerancije, no ona ovisi o tome kolika je minimalna temperatura doživljena i koliko je dugo trajao taj stres. Iako postoje genetske varijacije u razini tolerantnosti, na ishod utječe i stupanj razvoja i fiziološki status biljke u trenutku stresa (Janská i sur., 2010). Prema osjetljivosti se razlikuju i sami biljni organi. Obično su izdanci manje osjetljivi na hladnoću od korijenja (Janská i sur., 2010). Pojava simptoma ovisi o osjetljivosti biljke na stres i varira od biljke do biljke, a štete se mogu pojaviti i između 48 i 72 sata nakon izlaganja stresu (Koç i sur., 2010).

Takva, stečena tolerantnost biljaka na stres proces je u kojemu dolazi do brojnih biokemijskih i fizioloških promjena. Neke od njih su promjena sadržaja vode u tkivima, akumulacija topivih šećera, šećernih alkohola i dušičnih spojeva niske molekularne težine, sinteza krioprotektivnih proteina. Također dolazi i do promjena u strukturi i funkciji membrana i sastavu membranskih lipida. Događaju se promjene u ukupnoj ekspresiji gena te u sadržaju primarnih i sekundarnih (specijaliziranih) metabolita čije povećanje ima poznati zaštitni učinak (Rasool i sur., 2014; Sanghera i sur., 2011; Janská i sur., 2010)

Ipak, i dalje su premalo poznati mehanizmi koji reguliraju toleranciju na niske temperature, pa su tradicionalnim oplemenjivanjem postignuti ograničeni uspjesi u stvaranju biljaka s tim poboljšanim svojstvom (Sanghera i sur., 2011). Germplazma vrsta iz roda *Brassica* prepoznata je zbog svoje vrijednosti u istraživanju otpornosti na hladnoću, zbog čega ju znanstveni instituti i oplemenjivačke kuće nastoje prikupiti i očuvati (Wang-hao i sur., 2007).

2.3.3. Markeri abiotskog stresa

Prolin

Prolin je aminokiselina s brojnim funkcijama u biljci te jedan od najšire rasprostranjenih kompatibilnih osmolita (Kaur i Asthir, 2015). Najviše je istraživani osmolit zahvaljujući svojoj ulozi u tolerantnosti na stres. Više biljke sintetiziraju prolin i obično ga akumuliraju u velikim količinama kao odgovor na okolišne stresove (Iqbal, 2018) poput izlaganja solnom stresu, suši, UV zračenju, ionima teških metala, patogenima i oksidativnom stresu (Liang i sur., 2013). Kod mnogih biljnih vrsta zabilježena je visoka koncentracija prolina u stanici prilikom stresa zahvaljujući njegovoj povećanoj sintezi i smanjenoj degradaciji (Kaur i Asthir, 2015), u nekim slučajevima i preko stotinu puta u odnosu na biljku koja nije pod stresom (Liang i sur., 2013).

Fotosintetski pigmenti

Fotosinteza je jedan od najznačajnijih fizioloških procesa na koje utječe niska temperatura (Hasani i sur., 2013; Koç i sur., 2010). Uslijed niskih temperatura, fotosintetska aktivnost je ograničena, a akumulacija klorofila obično inhibirana ili dolazi do njihove degradacije i smanjenog sadržaja (Jurkow i sur., 2019; Hasani i sur., 2013; Koç i sur., 2010; Nievola i sur., 2017). Posljedično, prisutnost niskih razina klorofila u lišću općenito je pokazatelj stresa (Hailemichael i sur., 2016; Koç i sur., 2010).

Klorofili *a* i *b*, fotosintetski pigmenti kojeg sadrži lišće viših biljaka, omogućavaju biljkama apsorpciju i iskorištavanje sunčeve energije. Zato je njihov sadržaj u listu ključan za učinkovitost i tijek fotosinteze i u pozitivnoj je korelaciji sa stopom fotosinteze, pa je važan pokazatelj normalnog funkcioniranja biljke (Hailemichael i sur., 2016; Hasani i sur., 2013).

Klorofil je pigment koji biljkama daje karakterističnu zelenu boju. Količina klorofila u tkivu lišća pod utjecajem je dostupnosti hranjiva i okolišnih stresova poput suše, saliniteta, niskih i visokih temperatura. Više biljke sadrže dva tipa klorofila – klorofil *a* i *b*. Klorofil *a* je plavozelen, a klorofil *b* žućkasto zelen**.** Netopivi su u vodi, ali jesu u organskim otapalima (Palta, 1990).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali i provedba pokusa

U ovom diplomskom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Aluminijev klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Destilirana voda
- Dinatrijev tetrakloropaladat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteauov reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna (3,4,5-trihidroksibenzojeva) kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Izosan G (Pliva, Hrvatska)
- Katehin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Kava kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev molibdat dihidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ninhidrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Prolin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Sinigrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

Za pripreme i analize korištena je oprema Zavoda za molekularnu biologiju Laboratorija za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković, a neki od korištenih uređaja prikazani su na slikama 3.1.1.-6.

Slika 3.1.1. bioSan Bio RS-24 Mini-Rotator



Slika 3.1.2. Eppendorf centrifuga 5424 R



Slika 3.1.3. Retsch MM 400 mlin



Slika 3.1.4. Sartorius Research R200D analitička vaga



Slika 3.1.5. Shimadzu BioSpec-1601 E UV-Vis spektrofotometar



Slika 3.1.6. Stuart block heater SBH200D/3 termo blok



Izvor: M. Zrnić

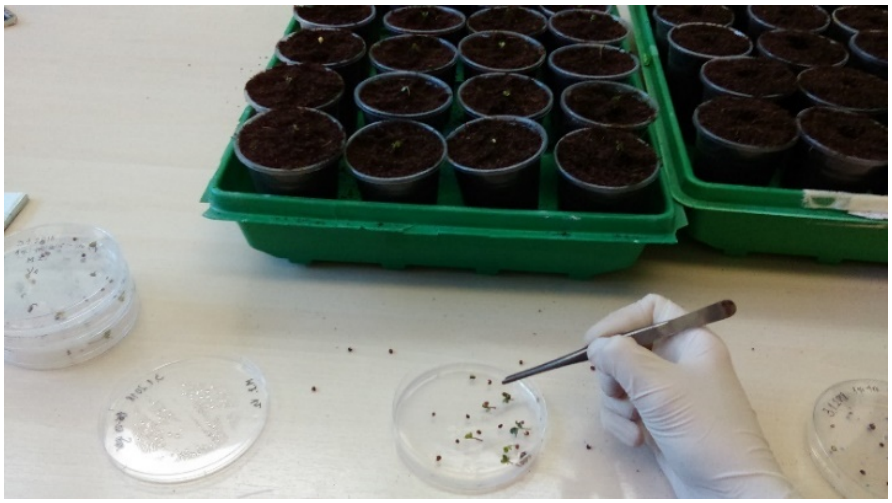
3.2. Test klijavosti

Za ovaj diplomski rad korišteno je sjeme populacije raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*) poljoprivrednog gospodarstva iz Vrgorca, južna Dalmacija. Za test klijavosti pripremljen je 1-postotni agarozni gel otapanjem 10 g agara u 1000 mL destilirane vode. Otopina je promiješana na miješalici s magnetom, a potom je po 500 mL razdijeljeno u staklene boce volumena 1 litre. Pripremljeno je i 500 mL destilirane vode u staklenoj boci. Boce s agaroznim gelom i destiliranom vodom te laboratorijske pincete sterilizirane su 15 minuta u autoklavu (NÜVE NC 40M/90M) na 121 °C. Još vruća otopina izlivena je u Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima laminara. Petrijeve zdjelice ohlađene su u laminaru te čuvane na 4 ºC do upotrebe, najdulje 7 dana.

Kako bi se izbjegla kontaminacija, sjeme je sterilizirano. U tu svrhu sjeme je razdijeljeno u 5 plastičnih tubica od 2 mL, s po 20 sjemenki raštike. Za dezinfekciju biljnog materijala, u tube je dodan 1 mL 3-postotnog Izosana-G, a potom su promiješane 10 minuta na miješalici na 300 rpm. Tri-postotni Izosan-G dobiven je otapanjem 3 g granula Izosana u 100 mL redestilirane vode na miješalici s magnetom. Sjemenke su u laminaru tri puta isprane Izosanom i autoklaviranom vodom koristeći Pasteurove pipete. Sterilnom je pincetom u Petrijevu zdjelicu prebačeno 20 sjemenki na agar. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice držane su 2 dana u klima komori na 4 °C, a nakon čega su prebačene na 21 °C na fotoperiod od 16 sati dana i 8 sati noći. Nakon 3 dana na svjetlu izbrojan je broj proklijalih i neproklijalih sjemenki te izračunat postotak klijavosti.

3.3. Tretman stresom niskim temperaturama

Koristeći pincetu i metalni štapić, po jedna klica je presađena u plastične lončiće kojima su na dnu probušena 2-3 otvora (slika 3.3.1.). Za punjenje lončića korišten je supstrat Stender A240 za ukorjenjivanje i sjetvu, koji se sastoji od 85-90 % organske tvari. Sadrži 40 % bijelog i 60 % crnog treseta te ima pH od 6 - 6,5.



Slika 3.3.1. Sadnja klica raštike (Izvor: M. Zrnić)

Lončići s posađenim klicama smješteni su u klima komoru na 21 °C na fotoperiod od 16 sati dana i 8 sati noći uz redovito zalijevanje destiliranom vodom. Nakon 28 dana, za 15 biljaka produžen je uzgoj na temperaturi od 21 °C za još tjedan dana, a 5 biljaka je ostavljeno na 21 °C (slika 3.3.2.) tijekom 48 sati, a 10 biljaka je prebačeno u hladnu komoru na 8 °C. Nakon 24 sata aklimatizacije u komori na 8 °C, 5 biljaka je tamo ostavljeno tijekom 24 sata, a 5 prebačeno na -8 °C na 24 sata.



Slika 3.3.2. Biljke raštike nakon 28 dana na 21 °C (Izvor: M. Zrnić)

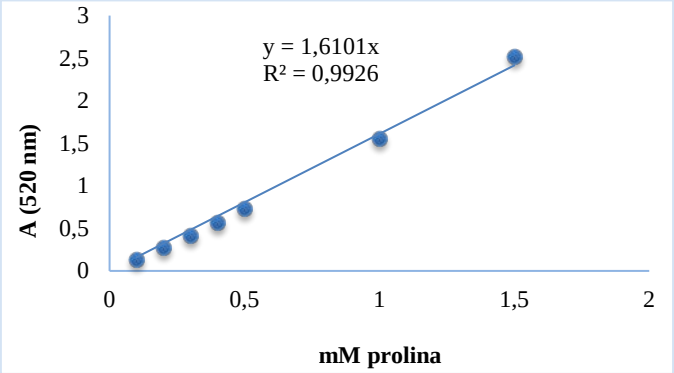
Poslije tretmana, u Falcon epruvete su prikupljeni nadzemni dijelovi biljaka rezom škarama pri korijenovom vratu, izvagani u svježem stanju te brzo smrznuti u tekućem dušiku. Čuvani su u škrinji na -80 °C označeni kao uzorci iz petog tjedna uzgoja.

Tretman stresom niskim temperaturama ponovljen je i sljedeći tjedan; od 15 biljaka u komori na 21 °C, 10 biljaka je prebačeno na 8 °C. Nakon 4 sata 5 biljaka je prebačeno na -8 °C na 2 sata, dok je 5 biljaka ostavljeno na 8 °C 6 sati. Nakon tretmana, svi su uzorci iz šestog tjedna uzgoja na isti način prikupljeni, izvagani, zamrznuti i čuvani u škrinji na -80 °C do liofilizacije. Svi uzorci zajedno su liofilizirani 7 dana u liofilizatoru (LYOVAC GT 2). Liofilizirani uzorci usitnjeni su u tekućem dušiku u porculanskom tarioniku s tučkom.

3.4. Određivanje sadržaja prolina

Za određivanje prolina, odvagano je 30 mg liofiliziranog materijala i napravljena je ekstrakcija dodavanjem 1 mL 70-postotnog etanola. Uzorci su miješani nekoliko sekundi na vorteksu te 5 minuta na mlinu visoke frekvencije, potom 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji te 60 minuta na rotacijskom homogenizatoru. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 13 000 rpm, supernatant je odvojen u nove plastične tubice od 2 mL. Pripremljena je reakcijska mješavina otapanjem 0,5 g ninhidrina u 30 mL octene kiseline, 10 mL 96-postotnog etanola i 10 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 50 mL.

U plastičnu tubicu od 1,5 mL otpipetiran je 1 mL reakcijske mješavine te je dodano 100 µL ekstrakta ili standarda (razrjeđenja otopine prolina poznate koncentracije). Kao reference korišteni su isti volumeni 70-postotnog etanola. Mikroepruvete su dobro zatvorene, promiješane na vorteksu nekoliko sekundi te zagrijane u termobloku 20 minuta na 95 °C. Uzorci su ohlađeni na ledu. Sadržaj je potom izliven u zasebne kivete te je na spektrofotometru mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm. Baždarni pravac konstruiran je na temelju apsorbancija razrjeđenja temeljne standardne otopine prolina poznatih koncentracija (0.1 - 1,5 mM) u 70-postotnom etanolu. Tako je dobivena jednadžba pravca y = 1,6101x, R^2 = 0,9926 prikazanog na grafikonu 3.4.1.



Grafikon 3.4.1. Baždarni pravac prolina korišten za određivanje prolina kao markera stresa

Sadržaj prolina u biljnim uzorcima izražen je kao milimol prolina po miligramu suhe tvari (mM prolin/mg ST).

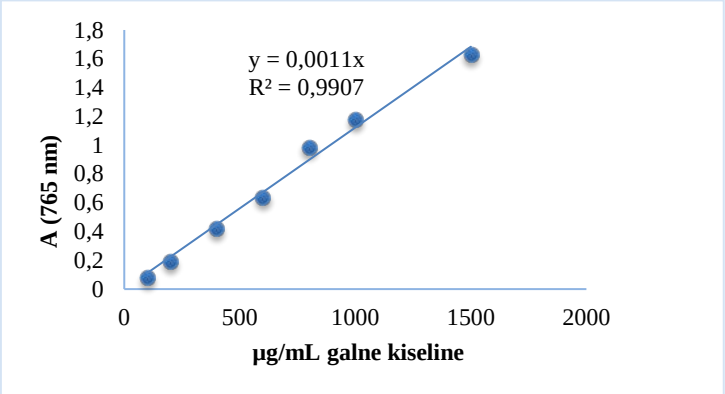
3. 5. Određivanje sadržaja specijaliziranih metabolita iz skupine polifenola

U ovom radu analiziran je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida te fenolnih kiselina u biljnom materijalu. Za određivanje spojeva iz skupine polifenola pripremljeni su ekstrakti biljnih uzoraka odvagom 60 mg uzorka u koje su dodana 2 mL 80-postotnog metanola. Za svaki tretman određena su tri tehnička ponavljanja. Potom su tubice kratko homogenizirane na vorteksu, a potom dodatno homogenizirane 2 minute na mikseru visoke frekvencije (400 Hz). Uslijedila je ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji 8 minuta te na rotacijskom homogenizatoru 45 minuta na 15 rpm. Konačno, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 13 000 okretaja. Supernatant je odvojen od taloga u nove tubice, koje su skladištene u hladnjaku na -20 °C do korištenja. Tako dobiveni ekstrakti korišteni su za određivanje ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina.

3.5.1. Ukupni polifenoli

Za određivanje ukupnih fenola korišten je protokol Slinkard i Singletona (1977). Postupak se temelji na Folin-Ciocalteauovoj metodi kod koje Folin-Ciocalteauov reagens reagira s reducirajućim agensom (fenolnim spojem/antioksidansom), pri čemu dolazi do pojave plave boje. Nakon dva sata svi fenolni spojevi reagiraju s Folin-Ciocalteauovim reagensom pa se spektrofotometrijski odredi apsorbancija na 765 nm. Očitanje apsorbancije proporcionalno je intenzitetu plave boje i koncentraciji polifenolnih spojeva.

Za metodu je korištena otopina natrijevog karbonata prethodno pripremljena otapanjem 200 g Na_2CO_3 u 800 mL vode, zagrijavanjem do vrenja, dodavanjem nekoliko kristalića nakon hlađenja te filtriranjem nakon 24 sata i dopunom vodom do 1 L. U plastičnu kivetu od 2 mL otpipetirano je 1,58 mL destilirane vode, 20 µL ekstrakta, standarda (razrjeđenja temeljne otopine galne kiseline) ili 80-postotnog metanola (za referentne uzorke) te 100 µL Folin-Ciocalteauovog reagensa. Kivete su dobro promiješane, a između 30 sekundi i 8 minuta nakon miješanja, dodano je 300 µL zasićene otopine natrijevog karbonata te su kivete ponovno dobro promiješane. Otopine su ostavljene na sobnoj temperaturi 120 minuta i određena im je apsorbancija na 765 nm u odnosu na reference. Za određivanje baždarne krivulje, pripremljena je otopina galne kiseline u 80-postotnom metanolu koncentracije 2 mg/mL te su mjerene apsorbancije njezinih razrjeđenja koncentracija 100 - 1500 µg/mL. Tako je dobivena jednadžba pravca y = 0,0011x, R^2 = 0,9907 prikazanog na grafikonu 3.5.1.1.



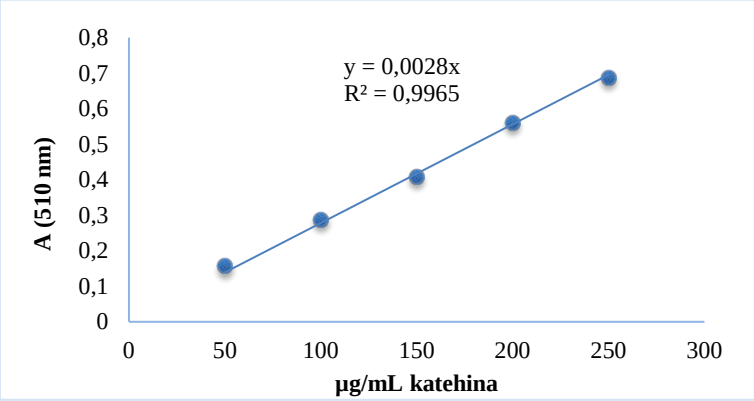
Grafikon 3.5.1.1. Baždarni pravac galne kiseline korišten za izračun ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola izračunan na temelju baždarnog pravca izražen je kao mikrogram ekvivalenta galne kiseline (*gallic acid equivalent*) po miligramu suhe tvari (µg GAE/mg ST).

3.5.2. Ukupni flavonoidi

Određivanje ukupnih flavonoida metodom po Zhishen i sur. (1999) temelji se na svojstvu flavonoida da tvore kompleks s aluminijevim kloridom ($AlCl_3$), a intenzitet obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida. Pripremljena je otopina natrijevog nitrita (1:20) (m/v), aluminijevog klorida (1:10) (m/v) i 1 M otopina natrijevog hidroksida. Otopina natrijevog nitrita dobivena je otapanjem 1,25 g natrijevog nitrita u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici volumena 25 mL. Otopina aluminijevog klorida dobivena je otapanjem 4,46 g aluminijevog klorida u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici volumena 25 mL. Ta je reakcija

egzotermna, te je zbog zagrijavanja potreban oprez pri rukovanju. Otopina natrijevog hidroksida pripremljena je otapanjem 2 g granula NaOH u 50 mL destilirane vode. U plastične kivete od 2 mL otpipetirano je 800 µL destilirane vode, 200 µL ekstrakta tj. razrjeđenja standarda za baždarni pravac ili metanola za reference te 60 µL otopine natrijevog nitrita. Nakon 5 minuta dodano je 60 µL otopine aluminijevog klorida, a 6 minuta nakon toga 400 µL otopine natrijevog klorida. Potom je dodano 480 µL destilirane vode i kivete su dobro promiješane. Gotova otopina u kivetama crveno je obojena. Apsorbancija uzoraka mjerena je na 510 nm u odnosu na reference. Za određivanje baždarne krivulje pripremljena je otopina katehina koncentracije 1 mg/mL otapanjem 10 mg katehina u metanolu u odmjernoj tikvici od 10 mL. Kako bi se katehin brže otopio, odmjerna je tikvica stavljena na miješalicu na pola sata. Ta je otopina korištena za dobivanje razrjeđenja 50 - 250 µg/mL na temelju kojih je dobivena jednadžba baždarnog pravca y = 0,0028x, R^2 = 0,9965 prikazanog na grafikonu 3.5.2.1.

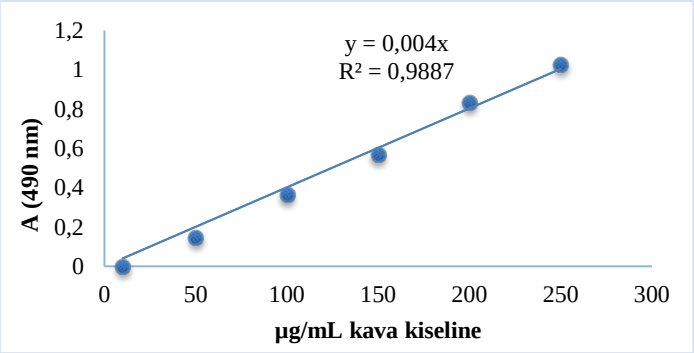


Grafikon 3.5.2.1. Baždarni pravac katehina korišten za izračun ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida izračunan je na temelju baždarnog pravca te izražen u mikrogramima katehin ekvivalenta (*catechin equivalents*) po miligramu suhe tvari uzorka (µg CE/mg ST).

3.5.3. Ukupne fenolne kiseline

Sadržaj fenolnih kiselina određen je kolorimetrijskom metodom (European Pharmacopeia, 2004). Pripremljen je Arnowljev reagens otapanjem 1 g natrijeva nitrita i 1,17 g natrijeva molibdat dihidrata u 10 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici. U svaku kivetu otpipetirano je 300 µL destilirane vode, 300 µL ekstrakta, 100 µL 0,5 M klorovodične kiseline i 100 µL Arnowljevog reagensa. Za reference je korišten 80-postotni metanol. Svaka kiveta je dobro protresena te je u nju dodano 100 µL 1 M natrijeve lužine i 100 µL destilirane vode. Baždarni pravac dobiven je iz apsorbancija razrjeđenja kava kiseline u 80-postotnom metanolu koncentracija 10 - 250 µg/mL mjerenih pri 490 nm. Dobivena je jednadžba baždarnog pravca y = 0,004 x, R^2 = 0,9887 prikazanog na grafikonu 3.5.3.1.

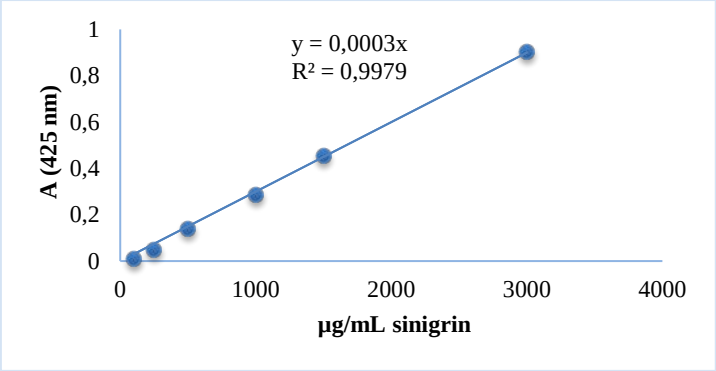


Grafikon 3.5.3.1. Baždarni pravac kava kiseline korišten za izračun ukupnih fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina izračunan je na temelju baždarnog pravca te izražen kao mikrogram ekvivalenta kava kiseline (*caffeic acid equivalents*) po miligramu suhe tvari uzorka (µg CAE/mg ST).

3.6. Određivanje sadržaja ukupnih glukozinolata

Određivanje ukupnih glukozinolata provedeno je prema metodi Aghajanzadeh i sur. (2014). Odvagano je 30 mg liofiliziranog materijala u Eppendorf mikroepruvete sa zaštitnim poklopcem te je provedena ekstrakcija u 1 mL 80-postotnog metanola. Prethodno je grijanjem 5 minuta u termobloku na 95 °C inaktivirana mirozinaza, a ekstrakti su potom ohlađeni na ledu. Uslijedilo je centrifugiranje od 5 minuta na 13000 rpm, te odvajanje supernatanta i taloga. Pripremljen je 2 mM dinatrijev tetrakloropaladat (Na_2PdCl_4) dodavanjem 29,4 mg Na_2PdCl_4, 50 mL mQ vode i 85 µL koncentrirane klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu od 50 mL. U kivete je otpipetirano 900 µL 2 mM Na_2PdCl_4, 30 µL ekstrakta, tj. 80-postotnog metanola za reference ili razrjeđenja standarda (sinigrina) i mjerena je apsorbancija na 425 nm nakon 30 i 60 minuta. Baždarna krivulja određena je iz razrjeđenja sinigrina od 100 - 3000 µg/mL, a jednadžba dobivenog pravca prikazanog na grafikonu 3.6.1. je y = 0,0003x, R^2 = 0,9972.



Grafikon 3.6.1. Baždarni pravac sinigrina korišten za određivanje ukupnih glukozinolata

Sadržaj ukupnih glukozinolata izračunan je na temelju baždarnog pravca te je izražen kao mikrogram ekvivalenta sinigrina (*sinigrin equivalent*) po miligramu suhe tvari uzorka (µg SE/mg ST).

3. 7. Određivanje sadržaja klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida

Za određivanje pigmenata odvagano je 10 mg liofiliziranog materijala u Eppendorf mikroepruvete sa zaštitnim poklopcem te su u njih dodana 2 mL 80-postotnog acetona. Mikroepruvete su protresene 3 minute na mlinu na frekvenciji od 30 Hz, a potom centrifugirane 5 minuta na 15 000 rpm. Supernatant je odliven u novu mikroepruvetu, a u one korištene s talogom dodana su 2 mL acetona. Postupak je ponovljen, a supernatant odliven u nove mikroepruvete. Supernatanti odgovarajućih uzoraka pomiješani su u kvarcnim kivetama od 4 mL te im je mjerena apsorbancija na 663,2 nm, 646,8 nm i 470 nm. Prema Lichtenthaleru i Buschmannu (2001), koncentracija klorofila *a* i *b* se određuje prema sljedećim formulama koje vrijede za aceton s 20 % (v/v) vode:

$$c_a = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}\ [\mu g/mL]$$

$$c_b = 21.50\ A_{646.8} - 5.10\ A_{663.2}\ [\mu g/mL],$$

a ukupnih klorofila kao $c_{a+b} = c_a + c_b$ [µg/mL]. Koncentracija ukupnih karotenoida (x+c) izračunana je kao:

$$c_{(x+c)} = (1000\ A_{470} - 1.82\ c_a - 85{,}02\ c_b)/198\ [\mu g/mL].$$

Sadržaj klorofila *a* i *b* te karotenoida preračunat je iz dobivenih koncentracija u mikrograme pigmenta po miligramu suhe tvari uzorka (µg/mg ST).

3.8. Statistička obrada podataka

Opisana mjerenja provedena su na temelju skupnog uzorka pet bioloških replika za svaki tretman te po tri tehničke repeticije. Statistička obrada podataka izvršena je u aplikaciji Excel servisa Microsoft Office 365 ProPlus s nadogradnjom statističkog softvera XLSTAT (https://www.xlstat.com/en/). Usporedba tretmana provedena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i primjenom Tukey testa, tj. post-hoc testa višestrukih usporedbi. Kao signifikantno različite smatrale su se vrijednosti koje su se razlikovale na razini $p \leq 0{,}05$. Dobiveni podaci prikazani su grafički kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Test klijavosti

Nakon 5 dana na 1-postotnom agaru, od kojih 2 dana na 4 °C i 3 dana na 21 °C, testom klijavosti utvrđen je udio proklijalih sjemenki u odnosu na posijane u 5 ponavljanja. Vrijednosti su prikazane u tablici 4.1.1. izražene u postocima.

Tablica 4.1.1. Klijavost sjemena raštike

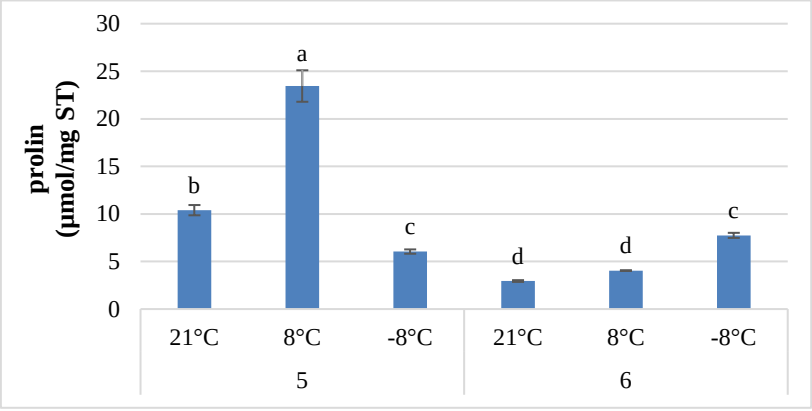
Uzorak	%
V_1	75
V_2	75
V_3	85
V_4	70
V_5	60

Klijavost sjemena u promatranom razdoblju varirala je od 60 do 85 %, no budući da se radi o istoj sorti raštike uzgojene u specijaliziranoj komori u laboratorijskim uvjetima, razlozi za razlike u klijavosti vjerojatno su endogeni, tj. vezani uz sam reprodukcijski materijal. Moguće je da je klijavost dijela sjemena bila nešto niža zahvaljujući gubitku na kvaliteti čuvanjem u nepovoljnim uvjetima ili starenju, kao i zahvaljujući preranom prikupljanju sjemena. Općenito, ono bi se trebalo vaditi iz prvih, kvalitetnih, zdravih i tehnološki zrelih plodova, a potom ga pravilno osušiti i čuvati u odgovarajućim uvjetima (Gerber, 2016).

Uz odsustvo sjemena korova, drugih vrsta i patogena, visoka klijavost je jedan od preduvjeta za dobar rast i razvoj usjeva. Visoka klijavost u laboratorijskim uvjetima indikator je kvalitetnog sjemena koje bi moglo ostvariti visoku klijavost i u poljskim uvjetima (Pospišil, 2015).

4.2. Prolin

Sadržaj prolina u biljnim uzorcima dobiven na temelju baždarnog pravca, izražen kao mM prolina po mg suhe tvari, prikazan je na grafikonu 4.2.1. Stupci prikazuju srednju vrijednost te pripadajuću standardnu devijaciju dvije grupe uzoraka, biljaka starih pet i šest tjedana izloženih određenim temperaturnim tretmanima.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:

5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;

5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;

5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;

6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;

6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;

6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.2.1. Utjecaj temperature na količinu prolina u listovima raštike

Postoje statistički značajne razlike u sadržaju prolina među analiziranim tretmanima. Najviša koncentracija prolina zabilježena je kod biljaka starih 5 tjedana pri 8 °C, 23,4 ± 1,7 μmol/mg suhe tvari, a najmanja kod kontrolnih biljaka starih 6 tjedana, 2,9 ± 0,1 μmol/mg suhe tvari. Temperatura je imala značajan utjecaj na sadržaj prolina kod biljaka starih 5 tjedana, pri čemu je temperatura od 8 °C uzrokovala povećanje, a tretman -8 °C smanjenje koncentracije prolina u odnosu na kontrolu. Kod biljaka starih 6 tjedana, primijećen je porast prolina u ovisnosti o jačini stresa, iako taj porast nije bio statistički značajan na 8 °C, dok je kod tretmana -8 °C zabilježen statistički značajan porast.

Mnogi autori se slažu oko toga da je akumulacija prolina usko vezana uz prilagodbe biljaka na stres niskim temperaturama (Moieni-Korbekandi i sur, 2014; Iqbal, 2018) te da je povećanje koncentracije prolina uslijed stresa korisno za biljku (Kaur i Asthir, 2015).

Podaci iz ovog istraživanja sukladni su literaturnim navodima u slučaju biljaka starih 6 tjedana. Kontrolne biljke i biljke izložene temperaturi od 8 °C tijekom 6 sati nisu pokazale statistički značajnu razliku u sadržaju prolina, dok on jest povećan kod biljaka koje su tretirane temperaturom od -8 °C. Razlog blagog povećanja može biti i relativno kratko izlaganje stresnim uvjetima, a taj je trend već zabilježen u literaturi. Autori Chu i sur. (1974) su na listovima ječma i rotkvice pokazali da je akumulacija prolina kod ječma uslijed stresa niskim temperaturama (4 °C) započela unutar prvih 24 sata, odvijala se niskom stopom u prvih 24, odnosno 48 sati te se onda ubrzala. Kod rotkvice se značajnija akumulacija prolina dogodila tek 3 dana nakon izlaganja niskim temperaturama. Stoga, akumulacija prolina vezana je uz jačinu stresa, odnosno duljinu izlaganja niskim temperaturama što je često opisano u literaturi.

Istraživanje Machado Neto i sur. (2004) imalo je za cilj procijeniti utjecaj visokih i niskih temperatura na akumulaciju prolina kod 10 genotipova graha. Autori zaključuju kako vrijeme mjerenja u odnosu na izlaganje stresu igra ulogu u interpretaciji rezultata kojima se može doći do zaključaka je li genotip osjetljiv na nisku temperaturu ili ne. Zato preporučuju periodična opažanja kako bi se stekla točna predstava o događajima u metabolizmu. Za njihovo istraživanje, tj. procjenu osjetljivih linija graha sugeriraju da je najbolji trenutak u kojemu je moguće dobiti maksimum informacija 24 sata nakon izlaganja temperaturnom stresu.

Kod autora Moieni-Korbekandi i sur. (2014) opažena je akumulacija prolina kod dvaju proljetnih kultivara uljane repice (*Brassica napus*), osjetljivog i neosjetljivog na nisku temperaturu uslijed sedmodnevnog stresa pri 10 °C. Uzorci su analizirani drugi, četvrti i sedmi dan te je koncentracija prolina u uzorcima rasla do posljednjeg dana. Također je zapaženo da je tolerantni kultivar akumulirao više koncentracije prolina, što sugerira da ima

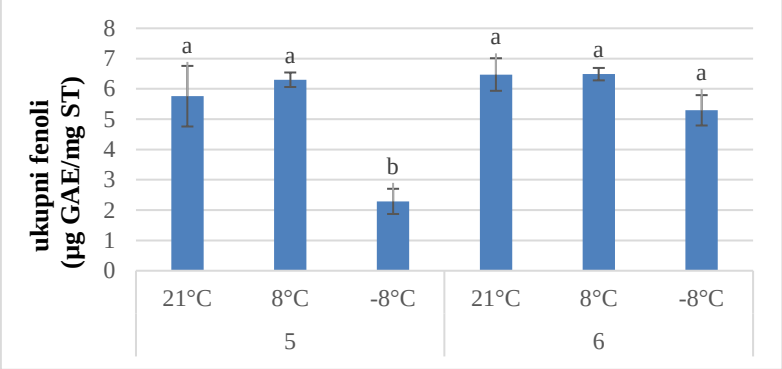
sposobnost brže adaptacije na ranoproljetne temperaturne fluktuacije (Moieni-Korbekandi i sur, 2014). U istraživanju Koç i sur. (2010) na osjetljivom i neosjetljivom hibridu paprike u stadiju 4 i 5 listova, biljke su uzgojene u kontroliranim uvjetima na 25 °C, a potom izložene stresu na 4 °C tijekom tri dana. Njihovi rezultati pokazuju da je tretmanom povišena akumulacija prolina i fenolnih spojeva. Došlo je do povišenog udjela prolina u lišću otpornog kultivara, no stabljika osjetljivog kultivara sadržavala je više prolina. Najviša koncentracija prolina zabilježena je u listovima otpornog kultivara. Istraživanjem Ghoreishi i sur. (2017) na lanu potvrđeno je da su sorte koje akumuliraju najviše prolina klasificirane kao tolerantne na stres, dok su one s najnižom stopom akumulacije označene kao netolerantne.

Općenito, tolerantniji kultivari neke vrste akumuliraju prolin u značajnijoj mjeri u odnosu na osjetljivije te se to njihova tolerantnost vezuje upravo s ulogom prolina (Moieni-Korbekandi i sur, 2014). Iako istraživanja sa stresom niskim temperaturama nisu rađena na raštici, solni stres i suša značajnije povisuju razinu prolina kod raštike u odnosu na bijeli i kineski kupus (Pavlović i sur., 2018; Pavlović i sur., 2019; Linić i sur., 2019) te se upravo zbog povećane akumulacije prolina raštika smatra otpornijom od ostale dvije vrste.

4.3. Fenolni spojevi

4.3.1. Ukupni polifenoli

Na temelju baždarnog pravca izračunate koncentracije ukupnih polifenola prikazane su na grafikonu 4.3.1.1., a izražene su u mikrogramima ekvivalenta galne kiseline po miligramu suhe tvari tkiva uzorka. Kao i kod prolina, stupci prikazuju srednju vrijednost triju tehničkih ponavljanja uzoraka biljaka starih pet i šest tjedana s pripadajućim standardnim devijacijama.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:
5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;
5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;
5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;
6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;
6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;
6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.3.1.1. Utjecaj temperature na količinu ukupnih polifenola u listovima raštike

Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima statistički je bio značajno niži samo kod biljaka starih 5 tjedana pri -8 °C gdje je iznosio 2,29 ± 0,42 µg GAE/mg ST. Ostali tretmani

rezultirali su vrijednostima koje su se kretale od 5,29 ± 0,5 µg GAE/mg ST (biljke stare 6 tjedana na -8 °C) do 6,49 ± 0,21 µg GAE/mg ST(biljke stare 6 tjedana na 8 °C). Iako nema statistički značajne razlike, i kod biljaka starih 6 tjedana uočen je trend smanjenja koncentracije ukupnih polifenola pri -8 °C.

Akumulacija polifenola, posebice kad se mjeri sadržaj ukupnih polifenola, uslijed temperaturnog stresa u literaturi pokazuje različite trendove.

Istraživanje Soengas i sur. (2018) na vrstama *Brassica oleracea* pokazalo je da su *B. oleracea* var. *acephala* pri stresu temperaturom od 12 °C imale najvišu koncentraciju ukupnih fenola, dok nije bilo značajne razlike između kontrolne temperature (20 °C) i stresa visokim temperaturama (32 °C).

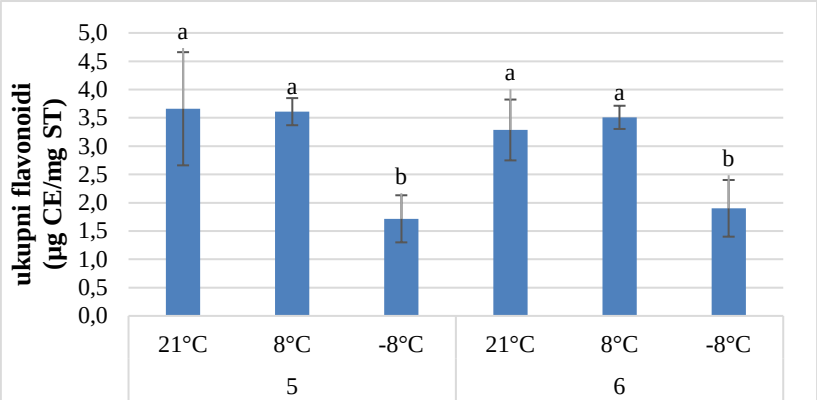
Istraživanje Rivero i sur. (2001) na termofilnoj lubenici pri suboptimalnim temperaturama (15 °C) rezultiralo je značajnom akumulacijom fenola u biljkama kao aklimatizacijskim mehanizmom na temperaturni stres, dok je do akumulacije fenola kod rajčice kojoj je optimum na 22 do 26 °C došlo tek nakon stresa visokom temperaturom od 35 °C (Babenko i sur., 2019).

Lee i Oh (2015) na *B. oleracea* var. *acephala* istraživali su utjecaj tretmana niskim temperaturama od 4 °C u trajanju od 3 dana na koncentraciju fenola kod biljaka starih 5 tjedana. Biljke su potom vraćene u kontrolne uvjete od 20 °C na aklimatizaciju, a uzorci listova prikupljeni su prvi i treći dan stresa te nakon 2 dana oporavka. Zabilježen je značajan utjecaj niske temperature treći dan stresa te nakon 2 dana oporavka na sadržaj ukupnih fenola. U istraživanju su testirne dvije sorte te je kod ‘Manchoo Collard’ sadržaj ukupnih fenola nakon jednog dana stresa bio blago povećan u odnosu na kontrolu, no nakon 3 dana sadržaj je bio sličan. Kod sorte ‘TBC’ ukupna koncentracija fenola kod eksperimentalnih biljaka bila je niža nego kod kontrolnih biljaka, pogotovo nakon 2 dana oporavka, kada je bila 17 % niža od kontrolnih biljaka.

Zaključno, literaturni navodi se razlikuju po pitanju akumulacije ukupnih fenola uslijed stresa niskim temperaturama. Vjerojatno je da na sadržaj ukupnih polifenola i njihovo povećanje imaju utjecaj biološki zahtjevi kulture za temperaturom, duljina trajanja stresa tj. vrijeme uzorkovanja u odnosu na izlaganje stresu, vrijeme oporavka biljke, vrsta te sorta.

4.3.2. Ukupni flavonoidi

Dobiveni baždarni pravac korišten je za izračun koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima raštike prikazanih na grafikonu 4.3.2.1. Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je u µg ekvivalenta katehina po mg suhe tvari uzorka. Stupci predstavljaju srednju vrijednost triju tehničkih ponavljanja uzoraka raštike podvrgnute različitim temperaturnim tretmanima uz standardne devijacije.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:

5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;

5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;

5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;

6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;

6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;

6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

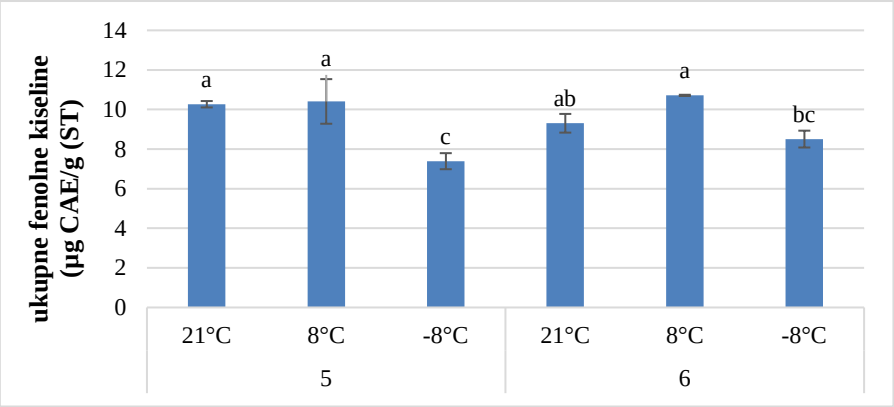
Grafikon 4.3.2.1. Utjecaj temperature na količinu ukupnih flavonoida u listovima raštike

Vidljivo je da se koncentracija ukupnih flavonoida statistički značajno smanjuje kod uzoraka izloženih temperaturi smrzavanja, neovisno o tjednu starosti i duljini trajanja tretmana niskom temperaturom, dok pri temperaturama pothlađivanja nije došlo do značajnih promjena. Slični rezultati kod temperatura pothlađivanja dobiveni su u istraživanju Schmidt i sur. (2010). Njihovo istraživanje na kovrčavom kelju (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) imalo je za cilj odrediti sadržaj i koncentracije flavonoida ovisno o genotipu i njegovoj interakciji s niskom temperaturom i sunčevim zračenjem. U istraživanju na otvorenom od listopada do siječnja, prilikom kojeg su srednje dnevne temperature varirale od 9,7 do 0,3 °C, ispitan je učinak tih temperatura i radijacije na osam kultivara, hibridnih i tradicionalnih. Kod šest od osam kultivara, ukupna koncentracija flavonoida nije se značajno mijenjala s obzirom na pad temperature i radijacije, a kod jednog se koncentracija povećala. Također, zabilježeno je da su stari kultivari općenito sadržavali visoku koncentraciju flavonoida.

Pregledom literature, Cetinkaya i sur. (2017) zaključuju da se ne može doći do univerzalnog mehanizma vezanog za akumulaciju flavonoida kod biljaka, iako flavonoidi obično pokazuju tendenciju povećanja kao odgovor na nepovoljne uvjete, no akumulacija flavonoida varira ovisno o razvojnom stadiju, vrsti, čak i kultivaru iste vrste te drugačiji trend primijećen u ovom radu i nije toliko iznenađujući.

4.3.3. Ukupne fenolne kiseline

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina izražen je u µg ekvivalenata kava kiseline po mg suhe tvari uzorka te prikazan na grafikonu 4.3.3.1. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti i odgovarajuće standardne devijacije triju tehničkih ponavljanja uzoraka sačinjenih od pet biljaka starih pet i šest tjedana.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:

5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;

5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;

5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;

6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;

6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;

6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

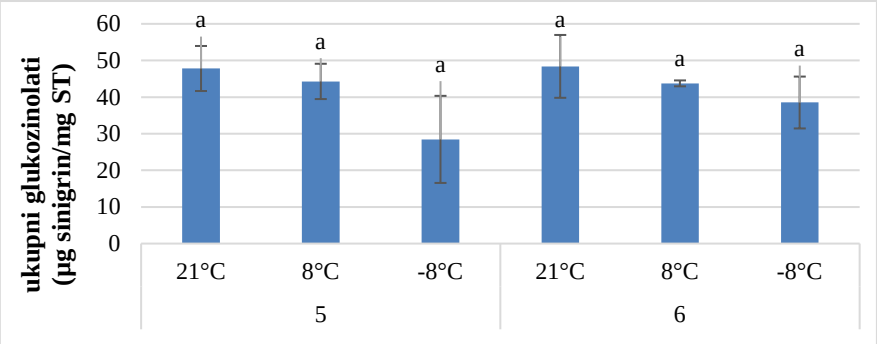
Grafikon 4.3.3.1. Utjecaj temperature na količinu ukupnih fenolnih kiselina u listovima raštike

Kao što je evidentno iz grafikona, kod temperature pothlađivanja postoji trend povećanja sadržaja ukupnih fenolnih kiselina, no ta promjena nije statistički značajna. Nasuprot tome, kod temperature smrzavanja dolazi do smanjena količine ukupnih polifenola u odnosu na kontrolu, a posebice u odnosu na tretman pothlađivanjem. Sličan trend je zabilježen u ovom radu i za flavonoide čija je količina značajno niža kod tretmana smrzavanjem.

Nekoliko autora proučavalo je kretanje razine ukupnih fenolnih kiselina uslijed temperaturnog stresa kod vrsta roda *Brassica*. Autori Soengas i sur. (2018) u istraživanju na *Brassica oleracea* var. *acephala* i *B. oleracea* var. *capitata* izloženima temperaturi od 12 °C zapažaju povećanje u sadržaju fenolnih kiselina u odnosu na kontrolu (20 °C). Temperatura pothlađivanja i u ovom radu izaziva blago povećanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina, no ta promjena nije statistički značajna. Kod raštike je primijećeno da uslijed solnog stresa ne dolazi do promjene sadržaja ukupnih fenolnih kiseline već do promjene u sadržaju pojedinačnih fenolnih kiselina, posebice salicilne i sinapinske (Linić i sur., 2019). Stoga, za preciznije zaključke o ulozi fenolnih kiselina u odgovorima raštike na stres niskim temperaturama, svakako bi trebalo pratiti razliku u sadržaju pojedinačnih fenolnih kiselina, a ne samo u sadržaju ukupnih fenolnih kiselina.

4.4. Glukozinolati

Koristeći dobiveni baždarni pravac, izračunata koncentracija glukozinolata prikazana je na grafikonu 4.4.1. stupcima kao srednja vrijednost triplikata s odgovarajućim standardnim devijacijama.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:

5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;

5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;

5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;

6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;

6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;

6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.4.1. Utjecaj temperature na količinu ukupnih glukozinolata u listovima raštike

Starost biljaka i temperaturni tretmani nisu imali opravdan utjecaj na sadržaj ukupnih glukozinolata. Vrijednosti glukozinolata u listovima raštike kretale su se između 48,39 ± 8,58 µg sinigrin/mg ST (6 tjedana, 21 °C) i 28,45 ± 11,89 µg sinigrin/mg ST (5 tjedana, -8 °C). Vrijednosti za kontrolu usporedive su sa sadržajem ukupnih glukozinolata koji navodi Šamec i sur. (2019) u istraživanju na 4 tjedna staroj raštici iz hidroponskog uzgoja.

Velasco i sur. (2007) ističu da na varijacije u količini i sadržaju glukozinolata kod grupe *acephala* utječu genetički i okolišni čimbenici kao što su starost biljke, temperatura, vodni stres i tip tla. Raspodjela glukozinolata varira u dijelovima biljke, pa postoji razlika u sadržaju glukozinolata u korijenju, lišću, stabljici i sjemenkama. Zimski uvjeti rezultiraju nižim razinama glukozinolata zahvaljujući kratkom danu i niskim temperaturama popraćenima mrazom. Istraživanje tih autora na španjolskim populacijama *B. oleracea* var. *acephala* na otvorenom imalo je za cilj utvrditi koncentraciju glukozinolata u listovima 30, 90, 180, 300 i 390 dana nakon sjetve. Njihovi rezultati pokazuju da je najniži sadržaj ukupnih glukozinolata zabilježen kod najmlađih listova te da su najhladnije lokacije kod biljaka između 180 i 300 dana nakon sjetve imale utjecaj na smanjenje ukupnih glukozinolata. To pripisuju niskim temperaturama popraćenima mrazom koji može uzrokovati degradaciju tkiva i značajan gubitak glukozinolata. Autori zaključuju da je u hladnijem dijelu godine razina glukozinolata niža nego u proljeće i ljeto. Zaključuju da viša temperatura vjerojatno ima pozitivan utjecaj na koncentraciju glukozinolata u vegetativnom stadiju biljaka, a da niske temperature smanjuju njihov sadržaj.

Martínez-Ballesta i sur. (2013) navode da kod uzgoja vrsta roda *Brassica* (rotkvica, uljana repica, repa i kupus) na otvorenom, postoje sezonske varijacije u sadržaju glukozinolata. Tako je tijekom proljetnog roka uzgoja, zahvaljujući umjerenim temperaturama, niskoj vlažnosti, visokom intenzitetu svjetlosti i dužem fotoperiodu koncentracija glukozinolata viša nego u jesensko-zimskom roku. Kod vrste *Brassica rapa* povišene temperature rezultiraju višom razinom glukozinolata, a pozitivan odnos između temperature tla i glukozinolata zamijećen je i kod *Brassica oleracea* varijeteta.

Kissen i sur. (2016) navode da je moguće da postoje kvantitativne i kvalitativne razlike u utjecaju temperature na glukozinolate kod biljaka koje su premještane na drugu temperaturu u određenoj fazi razvoja u odnosu na uzgajane na konstantnoj temperaturi cijeli period razvoja. Njihovo istraživanje na *Arabidopsis thaliana* pri kojem je biljka rasla na umjerenoj temperaturi (15 °C) i temperaturi pothlađivanja (9 °C) dovelo je do značajnih kvalitativnih i kvantitativnih promjena u glukozinolatima te je zapažen generalni trend porasta razine glukozinolata pri nižoj temperaturi.

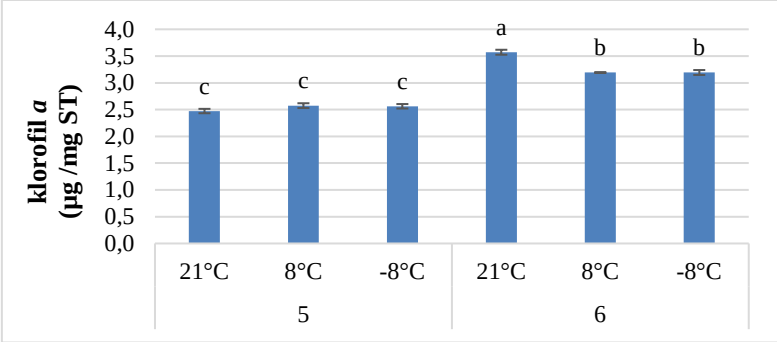
Hykkerud Steindal i sur. (2014) navode kako je u istraživanju na kovrčavom kelju (*Brassica oleracea.* var. *acephala*) aklimatizacija na hladnoću vodila do smanjenja sadržaja ukupnih i nekih pojedinačnih glukozinolata, dok je glukozinolat sinigrin bio povišen. Temperatura na kojoj su biljke bile prije aklimatizacije i fotoperiod imali su utjecaj na sadržaj glukozinolata. Kako bi optimizirali unos glukozinolata iz kelja, preporučuju berbu na otvorenom prije izlaganja niskim temperaturama, tj. u kasnu jesen ili zimu.

4.5. Fotosintetski pigmenti

Sadržaj fotosintetskih pigmenata, klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila i karotenoida u uzorcima raštike izračunat je prema metodi Lichtenthalera i Buschmanna (2001), a rezultati su prikazani na grafikonima 4.5.1.1., 4.5.1.2. i 4.5.1.3. Stupci predstavljaju srednju vrijednost i pripadajuće standardne devijacije triju tehničkih replika uzoraka biljaka koje su rasle u određenim temperaturnim uvjetima.

4.5.1. Klorofili

Sadržaj klorofila *a* u uzorcima prikazan je na grafikonu 4.5.1.1.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

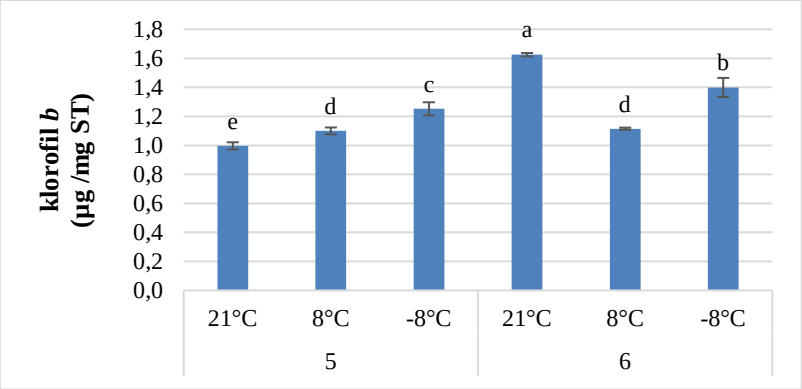
Legenda:
5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;
5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;
5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;
6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;
6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;
6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.5.1.1. Utjecaj temperature na količinu klorofila *a* u listovima raštike

Sadržaj klorofila *a* značajno se razlikovao kod biljaka starih 6 tjedana, kod kojih je pri temperaturama od 8 °C i -8 °C bio statistički jednak (3,19 ± 0,01 i 3,19 ± 0,05 µg/mg suhe tvari) i niži u odnosu na kontrolu (3,57 ± 0,05 µg/mg suhe tvari). Postoji i statistički značajna

razlika između biljaka starih 5 i 6 tjedana. Biljke stare 5 tjedana pokazale su nižu koncentraciju klorofila *a* u odnosu na starije biljke. Sadržaj klorofila *a* kod biljaka starih 5 tjedana kretao se između 2,47 ± 0,04 µg/mg suhe tvari i 2,57 ± 0,04 µg/mg suhe tvari, bez opravdanih razlika između temperaturnih tretmana.

Koncentracija klorofila *b* uz standardne devijacije prikazana je na grafikonu 4.5.1.2.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, p ≤ 0,05.

Legenda:

5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;

5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;

5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;

6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;

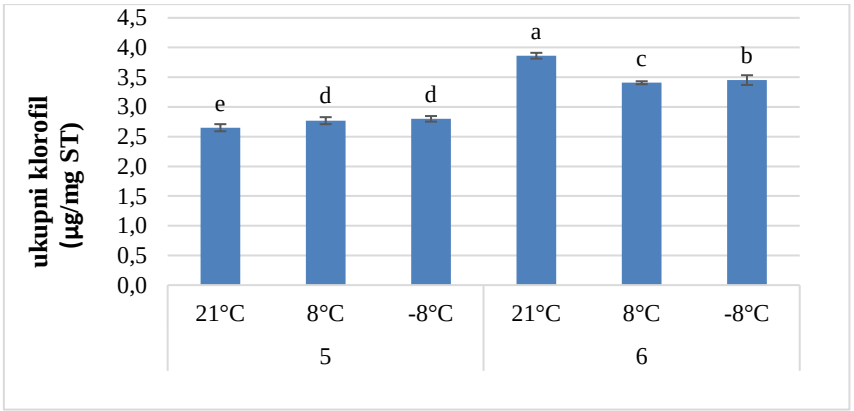
6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;

6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.5.1.2. Utjecaj temperature na količinu klorofila *b* u listovima raštike

Najviši sadržaj klorofila *b* pokazale su kontrolne biljke stare 6 tjedana koje su imale značajno veću koncentaciju klorofila *b* od svih testiranih tretmana, dok su mlađe kontrolne biljke imale najnižu koncentraciju. Kod biljaka starosti 5 tjedana zabilježen je značajan porast u sadržaju klorofila *b* pri izlaganju biljaka temperaturi pothlađivanja, a također i smrzavanja. Kod biljaka starih 6 tjedana, u odnosu na kontrolne biljke koncentracija klorofila *b* je značajno smanjena pri smrzavanju te još značajnije pri pothlađivanju.

Na grafikonu 4.5.1.3. prikazana je količina ukupnog klorofila u listovima raštike s obzirom na različite temperaturne tretmane.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:

5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;

5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;

5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;

6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;

6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;

6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.5.1.3. Utjecaj temperature na količinu ukupnih klorofila u listovima raštike

Na grafikonu je vidljiv opravdan utjecaj temperature i starosti biljke na količinu ukupnog klorofila. Najveću količinu ukupnog klorofila imale su kontrolne biljke stare 6 tjedana koje su imale značajno veću količinu ukupnog klorofila od svih testiranih tretmana, dok je kod mlađih kontrolnih biljaka zabilježena najmanja količina. U odnosu na kontrolne tretmane kod biljaka starih 5 tjedana zabilježen je blagi porast ukupnog klorofila, statistički jednak kod pothlađivanja i smrzavanja, dok je kod biljaka starih 6 tjedana uočeno značajno smanjenje pri temperaturi smrzavanja, i još značajnije pri temperaturi pothlađivanja.

Tablica 4.5.1. prikazuje omjere klorofila *a* i klorofila *b* te ukupnih klorofila i karotenoida u listovima raštike.

Tablica 4.5.1. Utjecaj temperature na omjere fotosintetskih pigmenata u listovima raštike

Starost biljaka	Temperatura	Klorofil *a* : Klorofil *b*	Ukupni klorofili : Ukupni karotenoidi
5	21 °C	2,48 ± 0,02 ^{b}	7,72 ± 0,17 ^{c}
	8 °C	2,34 ± 0,05 ^{c}	7,27 ± 0,15 ^{c}
	-8 °C	2,05 ± 0,04 ^{e}	11,76 ± 0,55 ^{a}
6	21 °C	2,20 ± 0,03 ^{d}	7,64 ± 0,15 ^{c}
	8 °C	2,86 ± 0,01 ^{a}	10,22 ± 0,2 ^{b}
	-8 °C	2,28 ± 0,08 ^{cd}	7,98 ± 0,05 ^{c}

Vidljivo je da je s padom temperature omjer klorofila *a* i *b* značajno smanjen kod biljaka starih 5 tjedana, dok je kod biljaka starih 6 tjedana zabilježen suprotan trend. Omjer klorofila *a* i *b* je indikator funkcionalnih pigmenata i prilagodljivosti fotosintetskog aparata (Lichtenthaler i Buschmann, 2001). U ovom istraživanju vrijednosti su se kretale između 2,05 ± 0,04 (biljke stare 5 tjedana, smrzavanje) i 2,86 ± 0,01 (biljke stare 6 tjedana, pothlađivanje) što odgovara vrijednostima za razvijene zelene listove (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Omjer ukupnih klorofila i karotenoida bio je povišen kod biljaka starih 5 tjedana izloženih temperaturi smrzavanja (11,76 ± 0,55) te kod biljaka starih 6 tjedana pri temperaturi pothlađivanja (10,22 ± 0,2). Nije bilo značajnih razlika između ostalih tretmana, a vrijednosti tog omjera kretale su se između 7,27 ± 0,15 i 7,98 ± 0,05. Taj je omjer obično indikator zelenila biljke. Vrijednost mu je između 4,2 i 5 kod biljaka koje su izložene izravnoj sunčevoj svjetlosti, a između 5,5 i 7,0 kod biljaka u sjeni. Niža vrijednost tog omjera indikator je starenja, stresa te oštećenja biljke i fotosintetskog aparata. To se odražava u bržem razlaganju klorofila od karotenoida. Lišće postaje žućkastozeleno i pokazuje vrijednosti od 3,5 do 2,5

(Lichtenthaler i Buschmann, 2001). Podaci iz ovog rada pokazuju da stres niskim temperaturama nije utjecao na fotosintetski aparat.

Mnogi autori navode utjecaj niskih temperatura na sadržaj klorofila *a* i *b*. Niske temperature obično inhibiraju akumulaciju klorofila ili dovode do degradacije tih pigmenata, što potvrđuje istraživanje Jurkow i sur. (2019). Uspoređeni su kultivari kelja iz tri roka berbe na otvorenom; prije mraza (>0 °C), nakon srednjeg mraza (-5 °C) i nakon jakog mraza (-15 °C). Kako bi bilo dovoljno vremena da biljke promjene metaboličke putove i posljedično kemijski sastav, druga berba je provedena 5 dana nakon srednjeg mraza, a treća berba 10 dana nakon jakog mraza. Utvrđeno je da je nakon srednjeg i jakog mraza uslijedilo značajno smanjenje klorofila *a* u prvoj sezoni uzgoja, a sljedeće godine klorofila *a* i *b* nakon jakog mraza.

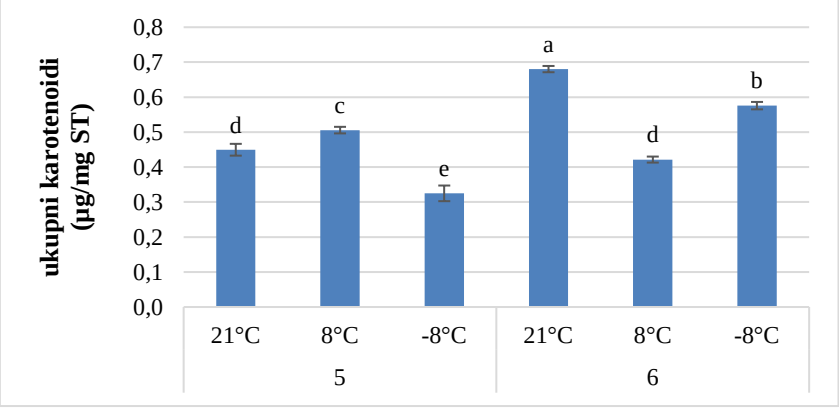
Na varijetetima *Brassica oleracea*, Soengas i sur. (2018) istraživali su antioksidativni kapacitet biljaka i koncentraciju ukupnog klorofila pri 12 °C (stres niskom temperaturom), i 32 °C (stres visokom temperaturom) u odnosu na 20 °C (kontrolna temperatura). Koncentracija ukupnih klorofila bila je najviša pri 20 °C (kontrolni uvjeti), dok je pri 12 °C bila statistički niža. Koncentracija klorofila *a* i *b* je pri 12 °C bila značajno niža od kontrole. Pri 20 °C, koncentracija klorofila *b* bila je viša od koncentracije klorofila *a*, dok je pri temperaturnom stresu niskom temperaturom situacija bila obrnuta.

Da se sadržaj klorofila *a* i *b* smanjuje kod biljaka pod stresom, potvrđeno je u istraživanju Moieni-Korbekandi i sur. (2014) s dva proljetna kultivara uljane repice (*Brassica napus*), osjetljivog i neosjetljivog na nisku temperaturu uslijed sedmodnevnog stresa pri 10 °C. Opažen je pad sadržaja klorofila *a* i *b* u odnosu na kontrolu, pri čemu je tolerantni kultivar imao viši sadržaj klorofila *a* prije i poslije stresa. Smanjenje sadržaja klorofila moglo bi biti tipičan simptom oksidativnog stresa.

Niska temperatura sprječava akumulaciju klorofila u lišću koje aktivno raste. U riži, linije otporne na hladnoću, na primjer, *japonica* akumuliraju više klorofila pod stresom niskim temperaturama od linija osjetljivih na hladnoću, na primjer *indica* (Sanghera i sur., 2011).

4.5.2. Karotenoidi

Koncentracije karotenoida izražene kao srednja vrijednost triplikata pojedinih tretmana uz standardne devijacije prikazane su na grafikonu 4.5.2.1.



Različita slova iznad stupaca predstavljaju različite srednje vrijednosti prema Tukey testu, $p \leq 0,05$.

Legenda:
5 21 °C – kontrolne biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 48 sata;
5 8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene temperaturi pothlađivanja 48 sata na 8 °C;
5 -8 °C – biljke stare 5 tjedana izložene 24 sata temperaturi od 8 °C i 24 sata temperaturi od -8 °C;
6 21 °C – kontrolne biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 21 °C 6 sati;
6 8 °C – biljke stare 6 tjedana izložene temperaturi od 8 °C 6 sati;
6 -8 °C – biljke stare 6 tjedana aklimatizirane na 8 °C 4 sata i 2 sata na -8 °C.

Grafikon 4.5.2.1. Utjecaj temperature na količinu ukupnih karotenoida u listovima raštike

Najmanji sadržaj karotenoida, 0,32 ± 0,02 µg/mg suhe tvari bilježi tretman biljaka starih 5 tjedana na -8 °C, a najviši kontrola na 21 °C kod biljaka starih 6 tjedana, 0,68 ± 0,01 µg/mg suhe tvari. Kod biljaka starih 5 tjedana došlo je do rasta koncentracije karotenoida pothlađivanjem, a pada uslijed smrzavanja. Kod biljaka starih 6 tjedana trend je sličan kao kod klorofila *b* te je došlo do pada u odnosu na kontrolu gdje je uslijed pothlađivanja koncentracija niža od uzrokovanje smrzavanjem. Kod kontrolnih biljaka starih 6 tjedana zabilježena je viša koncentracija karotenoida u usporedbi s kontrolnim biljkama starim 5 tjedana.

Hajihashemi i sur. (2018) navode da nekoliko istraživanja pokazuje kako niske temperature inhibiraju fotosintezu, što indicira smanjenje stope fotosinteze uslijed smanjenog sadržaja pigmenata. Smanjenje u sadržaju karotenoida uslijed niskih temperatura potvrđuje istraživanje istih autora na devet kultivara stevije (*Stevia rebaudiana*) u kojem je utvrđeno smanjenje sadržaja karotenoida do 54 %.

Dvogodišnje istraživanje Jurkow i sur. (2019) u kojem su uspoređeni kultivari *Brassica oleracea* var. *acephala* u tri roka berbe na otvorenom; prije mraza (> 0 °C), nakon srednjeg mraza (-5 °C) i nakon jakog mraza (-15 °C), pokazuje da je u prvoj godini opažena povišena koncentracija karotenoida u listovima nakon mraza, no već sljedeće godine nakon jačeg mraza karotenoidi su bili u opadanju i sadržaj im je bio značajno niži od ranijih berbi.

Može se zaključiti kako niske temperature u ovom istraživanju utječu na promjene u sadržaju fotosintetskih pigmenata, te da su starije biljke u tim uvjetima akumulirale niže razine. Ipak, potrebno je podrobnije istražiti uzroke razlika u rezultatima između biljaka starih 5 i 6 tjedana.

5. Zaključak

Na temelju eksperimentalnih rezultata, može se zaključiti da je stres niskom temperaturom značajno utjecao na povišenje ili smanjenje nekih metabolita, dok na neke nije imao statistički značajnog utjecaja. Moguće je zaključiti sljedeće:

- Postojala je značajna razlika u sadržaju prolina između tretmana niskom temperaturom kod biljaka starih 5 i 6 tjedana, a trend ovisi o starosti biljke. Biljke stare 5 tjedana akumulirale su višu koncentraciju prolina prilikom pothlađivanja (8 °C), dok je uslijed tretmana smrzavanjem (-8 °C) koncentracija prolina niža u odnosu na kontrolu. Kod biljaka starih 6 tjedana, pri tretmanu smrzavanjem došlo je do povećanja sadržaja prolina, usporedivo s onim kod biljaka starih 5 tjedana, dok uslijed pothlađivanja nije zabilježeno značajno povećanje u odnosu na kontrolu. Također, ukupna koncentracija prolina bila je niža kod kontrolnih biljaka starih 6 tjedana.
- Jedino je tretman temperaturom smrzavanja kod biljaka starih 5 tjedana uzrokovao značajno smanjenje sadržaja ukupnih polifenola.
- Tretman temperaturom smrzavanja izazvao je značajno smanjenje sadržaja ukupnih flavonoida kod biljaka obje starosti.
- Kod biljaka starih 5 tjedana, tretman smrzavanjem utjecao je na smanjenje koncentracije fenolnih kiselina.
- Temperatura i starost biljke nisu imale opravdan utjecaj na količinu ukupnih glukozinolata, iako je primjetan trend smanjenja s padom temperature.
- Koncentracija klorofila *a* bila je značajno viša kod starijih biljaka, unatoč zabilježenom smanjenju uslijed pothlađivanja i smrzavanja.
- Koncentracija klorofila *b* kod biljaka starih 5 tjedana raste s padom temperature, dok je i kod biljaka starih 6 tjedana snižena, ali više pri temperaturi pothlađivanja nego smrzavanja.
- Sadržaj ukupnih klorofila uslijed pothlađivanja i smrzavanja blago je povišen u odnosu na kontrolu kod biljaka starih 5 tjedana, a snižen je kod biljaka starih 6 tjedana.
- Kod biljaka starih 5 tjedana, koncentracija ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolu bila je povišena pothlađivanjem, a smanjena smrzavanjem. Kod biljaka starih 6 tjedana pri oba temperaturna tretmana koncentracija je bila niža od kontrole, ali je pri pothlađivanju bila niža nego pri smrzavanju.
- Koncentracije fotosintetskih pigmenata bile su više kod starijih kontrolnih biljaka.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta "Metabolički i transkriptomski odgovor raštike na stres izazvan niskim temperaturama" financiran od Zaklade Jedinstvo uz pomoć znanja br. projekta 12/17.

6. Popis literature

1. Aghajanzadeh T., Hawkesford M. J., Kok L. J. (2014): The significance of glucosinolates for sulfur storage in Brassicaceae seedlings. Frontiers in Plant Science 5: 704.
2. Babenko L. M., Smirnov O. E., Romanenko K. O., Trunova O. K., Kosakivska I. V. (2019). Phenolic compounds in plants: Biogenesis and Functions. Ukrainian Biochemical Journal 91(3): 5-18.
3. Bhatla S. C., Lal M. A. (2018). Plant Physiology, Development and Metabolism. Springer Nature Singapore.
4. Borges C. V., Seabra Junior S., Ponce F. S., Pereira Lima G. P. (2018). Agronomic factors influencing *Brassica* productivity and phytochemical quality. IntechOpen.
5. Cetinkaya H., Kulak M., Karaman M., Sedef Karaman H., Kocer F. (2017). Flavonoid Accumulation Behavior in Response to the Abiotic Stress: Can a Uniform Mechanism Be Illustrated for All Plants? IntechOpen.
6. European Pharmacopoeia (2004). 4th ed. Council of Europe, Strasbourg, 2377–2378.
7. Fabek S. (2012). Vrijednost brokule (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.) kao funkcionalne hrane ovisna o sorti, roku uzgoja i gnojidbi dušikom. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.
8. Gerber J. (2016). Ispitivanje klijavosti sjemena povrća. https://www.savjetodavna.hr/savjeti/17/704/ispitivanje-klijavosti-sjemena-povrca/ - pristup 5. 2. 2019.
9. Ghoreishi M., Rahmani F., Mandoulakani B. A., Gorttapeh A. H. (2017). Impact of variety on resistance to cold stress at physiological levels in *Linum usitatissimum*. Plant Omics Journal 10(5): 269-276.
10. Hailemichael G., Catalina A., González M. R., Martin P. (2016). Relationships between Water Status, Leaf Chlorophyll Content and Photosynthetic Performance in Tempranillo Vineyards. South African Journal of Enology and Viticulture, 37(2): 149-156.
11. Hajihashemi S., Noedoost F., Geuns J. M., Djalovic I., Siddique K. H. (2018). Effects of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology and anatomy in nine cultivars of Stevia rebaudiana. Frontiers in Plant Science 9: 1430.
12. Hasani Z., Pirdashti H., Yaghoubian Y., Zaman Nouri M. (2013). Comparative effects of cold air and cold water stress on chlorophyll parameters in rice (*Oryza sativa* L.). International Journal of Farming and Allied Sciences 21(2): 918-921.
13. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo (2018). Sortna lista Republike Hrvatske. Dostupno na: https://www.hcphs.hr/wp-content/uploads/2018/12/SORTNA-LISTA-REPUBLIKE-HRVATSKE-13.12.2018.pdf - pristup 30. 12. 2018.
14. Hykkerud Steindal A. L., Rødven R., Hansen E., Mølmann J. (2014). Effects of photoperiod, growth temperature and cold acclimatisation on glucosinolates, sugars and fatty acids in kale. Food Chemistry 174: 44-51.
15. Janská A., Maršík P., Zelenková S., Ovesná J. (2010). Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? Plant Biology 12: 395–405.

16. Jurkow R., Wurst A., Kalisz A., Sękara A., Cebula S. (2019). Cold stress modifies bioactive compounds of kale cultivars during fall–winter harvests. Acta Agrobotanica 72(1): 1761.

17. Kaur G., Asthir B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. Biologia Plantarum 59(4): 609-619.

18. Kissen R., Eberl F., Winge P., Uleberg E., Martinussen I., Bones A. (2016). Effect of growth temperature on glucosinolate profiles in Arabidopsis thaliana accessions. Phytochemistry 130: 106-118.

19. Koç E., Islek C., Üstün A. S. (2010). Effect of Cold on Protein, Proline, Phenolic Compounds and Chlorophyll Content of Two Pepper (*Capsicum annuum* L.) Varieties. Gazi University Journal of Science 23(1): 1-6.

20. Kumar I., Kumar Sharma R. (2018). Production of Secondary Metabolites in Plants under Abiotic Stress: An Overview. Significances of Bioengineering & Biosciences 2(4): 196-200.

21. Lee J. H., Oh M. M. (2015). Short-term Low Temperature Increases Phenolic Antioxidant Levels in Kale. Horticulture, Environment and Biotechnology 56(5): 588-596.

22. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2016). Povrćarstvo. Zrinski, Čakovec.

23. Liang X., Zhang L., Kumar Natarajan S., Becker D. F. (2013). Proline Mechanisms of Stress Survival. Antioxidants & Redox Signaling 19(9): 998-1011.

24. Lichtenthaler H. K., Buschmann C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry 1: F4.3.1-F4.3.8.

25. Linić I., Šamec D., Grúz J., Vujčić Bok V., Strnad M., Salopek Sondi B. (2019). Involvement of Phenolic Acids in Short-Term Adaptation to Salinity Stress is Species-Specific among Brassicaceae. Plants 8(6): 155.

26. Machado Neto N. B., Castilho Custódio C., Gatti A. B., Priolli M. R., Mendes Cardoso V. J. (2004). Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. Crop Breeding and Applied Biotechnology 4: 330-337.

27. Martínez-Ballesta, M., Moreno, D. A., Carvajal, M. (2013). The Physiological Importance of Glucosinolates on Plant Response to Abiotic Stress in Brassica. International Journal of Molecular Sciences 14: 11607-25.

28. Matotan Z. (2008). Zeljasto povrće. Neron, Bjelovar.

29. Mithen R. (2001). Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. Plant Growth Regulation 34: 91–103.

30. Moieni-Korbekandi Z., Karimzadeh G., Sharifi M. (2014). Cold-induced Changes of Proline, Malondialdehyde and Chlorophyll in Spring Canola. Journal of Plant Physiology and Breeding 4(1): 1-11.

31. Nievola C., Carvalho C. P., Carvalho V., Rodrigues E. (2017). Rapid responses of plants to temperature changes, Temperature 4(4): 371-405.

32. Palta J. P. (1990). Leaf chlorophyll content. Remote Sensing Reviews, 5(1): 207-213.

33. Pavlović I., Mlinarić S., Tarkowska D., Oklestkova J., Novak O., Lepeduš H., Vujčić Bok V., Radić Brkanac S., Strnad M., Salopek Sondi B. (2019). Early *Brassica* crops responses to salinity stress: a Comparative Analysis between Chinese cabbage, White cabbage and Kale. Frontiers in Plant Science 10: 450.

34. Pavlović I., Petřík I., Tarkowska D., Lepeduš H., Vujčić Bok V., Radić Brkanac S., Novák O., Salopek Sondi B. (2018). Correlations between Phytohormones and Drought Tolerance in Selected *Brassica* Crops: Chinese Cabbage, White Cabbage and Kale. International Journal of Molecular Sciences 19: 2866.

35. Pospišil A. (2015). Kako izračunati količinu sjemena za sjetvu? Gospodarski list [online] 6:20-21. http://www.gospodarski.hr/Publication/2015/4/kako-izraunati-koliinu-sjemena-za-sjetvu/8168#.XFww1ly2lPY - pristup 5. 2. 2019.

36. Rasool S., Singh S., Hasanuzzaman M., Rehman M. U., Azooz M. M., Lone H. A., Ahmad P. (2014). Plant resistance under Cold Stress: Metabolomics, Proteomics, and Genomic Approaches. U: Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, Volume 1. (Ahmad P., Ur.). Elsevier, 79-98.

37. Rivero R. M., Ruiz J. M., Garcia P. C., Lopez-Lefebre L. R., Sanchez E., Romero L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Science 160: 315–321.

38. Sanghera G. S., Wani H. S., Hussain H., Singh N. B. (2011). Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. Current Genomics 12: 30-43.

39. Schmidt S., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh L. W., Krumbein A. (2010). Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). Food Chemistry 119: 1293-1299.

40. Slinkard K., Singleton V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 28: 49-55.

41. Soengas P., Rodríguez V. M., Velasco P., Cartea M. E. (2018). Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in *Brassica oleracea.* American Chemical Society Omega 3: 5237-5243.

42. Šamec D. (2013). Fitokemijska i genetska istraživanja endemičnih vrsta *Teucrium arduini, Moltkia petraea, Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*. Doktorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Institut Ruđer Bošković i Sveučilište u Dubrovniku.

43. Šamec D., Kruk V., Ivanišević P. (2019). Influence of Seed Origin on Morphological Characteristics and Phytochemicals Levels in *Brassica oleracea* var. *acephala*. Agronomy 9(9): 502.

44. Šamec D., Salopek-Sondi B. (2019). Cruciferous (*Brassicaceae*) Vegetables. U: Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. Elsevier, 195-202.

45. Šamec D., Urlić B., Salopek-Sondi B. (2018). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 59(15): 2411-2422.

46. Thakur P., Kumar S., Malik J. A., Berger J. B., Nayyar H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. Environmental and Experimental Botany 67: 429-443.

47. Tissier A., Ziegler J., Vogt T. (2015). Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis. U: Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions, First Edition. (Krauss G. J. i Nies. D. H., Ur). Wiley, 15-37.

48. Urlić B. (2014). Efikasnost korištenja fosfora populacija raštike (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) u tlima deficitarnima fosforom. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

49. Velasco P., Cartea M., Gonzalez C., Vilar M., Ordás A. (2007). Factors Affecting the Glucosinolate Content of Kale (*Brassica oleracea acephala* group). Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 955-62.

50. Wang-hao Z., Yu-zhen C., Cun-fu L. (2007). Differences in biochemical responses to cold stress in two contrasting varieties of rape seed (*Brassica napus* L.). Forestry studies in China 9(2): 142-146.

51. Yadav S. K. (2009). Cold Stress Tolerance Mechanisms in Plants. U: Sustainable Agriculture Volume 2 (Lichtfouse E. et al., Ur). Springer, 605-620.

52. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry 64(4): 555-559.

7. Životopis

Marija Zrnić rođena je u Zagrebu 1995. godine. Opću gimnaziju je upisala 2009. godine u Ženskoj općoj gimnaziji Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti, gdje je završila prva dva razreda. Treći razred opće gimnazije završila je u Gimnaziji Andrije Mohorovičića Rijeka, a maturirala je s odličnim uspjehom 2013. godine u Gimnaziji Lucijana Vranjanina u Zagrebu. Studij Hortikulture na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu upisala je 2013. godine te stekla titulu sveučilišne prvostupnice s najvećom pohvalom 2016. godine. Diplomski studij Povrćarstva upisala je 2016. godine, a u ljetnom semestru 2017. boravila je na Erasmus+ studentskoj razmjeni u Varšavi. Tijekom studija sudjelovala je u programu Studenti tutori kao predstavnica za smjer Hortikultura te predstavljala Agronomski fakultet prezentacijom na Smotri Sveučilišta 2017. Bila je stipendistica Grada Zagreba u kategoriji izvrsnosti od 2016. do 2018. godine te dobitnica nagrade i potpore Zaklade Agronomskog fakulteta. U Sveučilišnom računalnom centru (SRCE) završila je tečajeve iz programa paketa Microsoft Office (Excel i Word) te statističkog programa R. Služi se engleskim jezikom na razini C1.2 i njemačkim na razini B1 (CEFR). Tijekom studija pokrenula je studentsku inicijativu Studentski vrt na Agronomskom fakultetu te je razvila interes za ekološko povrćarstvo i regenerativnu poljoprivredu.