

# Prirodni mehanizmi i genetičke modifikacije za otpornost biljaka na sušu

---

**Merlak, Mara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:481381>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



# **PRIRODNI MEHANIZMI I GENETIČKE MODIFIKACIJE ZA OTPORNOST BILJAKA NA SUŠU**

DIPLOMSKI RAD

Mara Merlak

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Biljne znanosti

# **PRIRODNI MEHANIZMI I GENETIČKE MODIFIKACIJE ZA OTPORNOST BILJAKA NA SUŠU**

DIPLOMSKI RAD

Mara Merlak

Mentor:

Prof. dr. sc. Snježana Kereša

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## **IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Mara Merlak**, JMBAG 0178094969, rođen/a 26.10.1993. u Rijeci, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

### **PRIRODNI MEHANIZMI I GENETIČKE MODIFIKACIJE ZA OTPORNOST BILJAKA NA SUŠU**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor 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 je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## IZVJEŠĆE

### O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Mare Merlak**, JMBAG 0178094969, naslova

#### **PRIRODNI MEHANIZMI I GENETIČKE MODIFIKACIJE ZA OTPORNOST BILJAKA NA SUŠU**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Snježana Kereša mentor

\_\_\_\_\_

2. Prof. dr. sc. Snježana Bolarić član

\_\_\_\_\_

3. Prof. dr. sc. Hrvoje Šarčević član

\_\_\_\_\_

## Zahvala

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Snježani Kereša na uloženom trudu, vremenu, stručnim savjetima i velikoj pomoći koju mi je pružila tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem se profesorima Agronomskog fakulteta koji su mi prenijeli svoje znanje i obilježili jedan dio mog života.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci.*

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Pregled literature.....	3
2.1. Mehanizmi tolerantnosti na sušu .....	3
2.1.1. Mehanizam izbjegavanja suše (DA; Drought avoidance) .....	3
2.1.2. Mehanizam tolerantnosti na sušu (DT; Drought tolerance).....	7
2.1.3. Mehanizam bijega od suše (DE; Drought escape).....	11
2.2. Genetičke modifikacije za otpornost biljaka na sušu .....	11
2.2.1. Abiotski i biotski stresovi .....	11
2.2.2. Metode genetičkih modifikacija biljnih stanica.....	13
2.3. Genetički modificirane biljne vrste tolerantne na sušu.....	16
2.3.1. Genetički modificirani kukuruz tolerantan na sušu – Genuity® DroughtGard™ .....	17
2.3.2. Genetički modificirana soja tolerantna na sušu – Verdeca HB4 soybean	19
2.3.3. Genetički modificirana šećerna trska tolerantna na sušu.....	21
3. Zaključak.....	23
4. Popis literature .....	24
5. Životopis .....	28

## Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Mare Merlak**, naslova

### **PRIRODNI MEHANIZMI I GENETIČKE MODIFIKACIJE ZA OTPORNOST BILJAKA NA SUŠU**

Suša je jedan od važnih abiotičkih stresova i ozbiljna ekološka prepreka pri razvoju biljaka jer utječe na gubitak prinosa. Tolerantnost na sušu kod biljaka je kompleksno svojstvo nekih vrsta i genotipova, te ga se može opisati kao sposobnost biljke da zadrži stabilan i visoki prinos bez obzira na nepovoljne okolinske uvjete. Razlikujemo tri mehanizma za prevladavanje suše kod biljaka: (1) mehanizam bijega od suše, (2) mehanizam izbjegavanja suše, (3) mehanizam tolerantnosti na sušu. Genetička transformacija biljaka genima koji omogućuju pojačano nakupljanje osmolita je efikasna strategija kojom se može postići tolerantnost biljaka na stres. Dvije tehnike koje se najčešće primjenjuju za genetičke modifikacije biljnih stanica su modifikacija pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* i metoda bombardiranjem česticama. Ukupno su tri biljne vrste genetički modificirane za tolerantnost na sušu registrirane u bazi priznatih (odobrenih) genetički modificiranih biljaka (*GM Approval Database*). To su na sušu tolerantni GM kukuruz, soja i šećerna. Međutim, samo su kukuruz i soja komercijalizirani. GM šećerna trska tolerantna na sušu još je u fazi ispitivanja. Kukuruz, pod nazivom Genuity DroughtGard, je prvi komercijalizirani genetički modificiran usjev tolerantan na sušu, a komercijaliziran je 2013. g u SAD-u. Verdeca HB4 soybean je genetički modificirana soja koja je komercijalizirana 2015. g u Argentini.

**Ključne riječi:** suša, mehanizmi tolerantnosti na sušu, genetičke modifikacije, kukuruz, soja



## Summary

Of the master's thesis – student **Mara Merlak**, entitled

### **NATURAL MECHANISM AND GENETIC MODIFICATION FOR DROUGHT TOLERANCE IN PLANTS**

Drought is one of the major abiotic stresses and it is severe ecological obstacle in plant development because it causes loss in yield. Drought tolerance is a complex trait of some plant species and genotypes and it can be described as ability for stable and high yield no matter of unfavourable weather conditions. We can differentiate three mechanisms for preventing plant drought : (1) drought escape, (2) drought avoidance, (3) drought tolerance. Genetic transformation of plants with genes that enable increased accumulation of osmolytes is efficient strategy with which stress tolerance can be achieved. Two techniques can be used in genetic engineering, first one is with bacteria *Agrobacterium tumefaciens* and the other one is biolistic method. A total of three plant species genetically modified for drought tolerance were registered in the GM Approval Database. These are drought tolerant GM corn, soybean and sugar cane. However, only corn and soybean are commercialized. GM drought tolerant sugar cane still undergoes the testing phase. Genuity DroughtGard corn was the first genetically modified crop that is commercialized 2013. in USA. Verdeca HB4 soybean is genetically modified soybean which was commercialized 2015. in Argentina.

**Keywords:** drought, drought tolerance mechanisms, genetic modification, corn, soybean

## 1. Uvod

Suša je jedan od važnih abiotskih stresova i utječe na proizvodnju hrane u cijelom svijetu. Možemo je definirati kao produljeni izostanak ili naglašeni deficit oborine na nekom području. Ovisno o korištenim kriterijima razlikujemo tri tipa suše (Dai, 2011): (1) agronomska suša, (2) meteorološka suša, (3) hidrološka suša. Kratkotrajan manjak vode u razdoblju od nekoliko tjedana u površinskom sloju tla, koji se događa u kritično vrijeme za razvoj biljaka, može uzrokovati agronomsu sušu. Agronomska suša dovodi do redukcije rasta biljaka i smanjenih prinosa. Visoke temperature, niska relativna vlažnost zraka i vjetar pojačavaju negativne posljedice agronomske suše. Meteorološka suša uzrokovana je smanjenom količinom oborine u odnosu na višegodišnji prosjek ili potpunim izostankom oborine u određenom vremenskom razdoblju. Može se naglo razviti i naglo prestati. Meteorološka suša prethodi i uzrokuje druge tipove suše. Deficit oborina u duljem vremenskom razdoblju utječe na površinske i podzemne zalihe vode: na protok vode u rijekama i potocima, na razinu vode u jezerima i na razinu podzemnih voda. Kada se protoci i razine smanje govori se o hidrološkoj suši. Početak hidrološke suše može zaostajati nekoliko mjeseci za početkom meteorološke suše, ali može i trajati i nakon završetka meteorološke suše.

Česta i jaka suša u kombinaciji s visokim temperaturama prepoznata je kao potencijalni utjecaj globalnog zagrijavanja na poljoprivredu. Suša kao i ostali abiotski stresovi čini najveće ograničenje u biljnoj proizvodnji te uz sve izraženije globalne klimatske promjene situacija se pogoršava. Deficit vode je ozbiljna ekološka prepreka pri razvoju biljaka jer utječe na gubitak prinosa. Suša predstavlja ozbiljnu prijetnju sigurnosti hrane te je tako u prošlosti bila katalizator velikih gladi.

Tolerantnost na sušu kod biljaka je kompleksno svojstvo nekih vrsta i genotipova, a određuju ga razne morfološke i fiziološke karakteristike. Može ga se opisati kao sposobnost biljke da zadrži stabilan i visoki prinos bez obzira na nepovoljne okolinske uvjete (Kereša i sur. 2008). Razlikujemo tri mehanizma za prevladavanje suše kod tolerantnih genotipova: (1) mehanizam bijega od suše, što biljka postiže ranijim dozrijevanjem, (2) mehanizam izbjegavanja suše, koji se postiže zatvaranjem puči, (3) mehanizam tolerantnosti na sušu, do kojega dolazi pri pojačanom nakupljanju osmolita.

Nužno je poboljšati otpornost biljaka na sušu, ali trenutno ne postoje ekonomski održiva tehnološka sredstva koja bi olakšala proizvodnju usjeva u uvjetima suše. Međutim, razvoj biljaka tolerantnih na sušu može biti obećavajući pristup koji ispunjava svjetske potrebe za hranom. Razvoj biljaka otpornijih na sušu zahtijeva poznavanje fizioloških mehanizama biljke jer se reakcije biljaka na sušu manifestiraju prvo promjenama u fiziološkim procesima. Mehanizmi za postizanje tolerantnosti biljaka na različite abiotske stresove su slični jer svi abiotski stresovi za posljedicu imaju isti fiziološki efekt - dehidraciju citoplazme. Biljke u uvjetima stresa nakupljaju osmolite koji smanjuju osmotski potencijal i štite proteine od denaturacije. Sposobnost nakupljanja osmolita kod biljaka razlikuje se od vrste do vrste, od

genotipa do genotipa. Genetička transformacija biljaka genima koji vode pojačanom nakupljanju pojedinih osmolita može biti efikasna strategija u postizanju tolerantnosti biljaka na stres.

### **1.1. Cilj rada**

Cilj ovog rada je proučiti i sistematizirati dostupnu znanstvenu literaturu o mehanizmima tolerantnosti biljaka na sušu te opisati primjere genetički modificiranih biljaka s poboljšanim svojstvom tolerantnosti.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Mehanizmi tolerantnosti na sušu

Otpornost na sušu je sposobnost biljke da raste, cvjeta te daje ekonomski zadovoljavajući prinos u uvjetima nedostatka vode. Deficit vode utječe na odnos biljaka s vodom na razini stanice, tkiva i organa, uzrokujući specifične i nespecifične reakcije, reakcije oštećenja i prilagodbe (Beck i sur., 2007). Biljke su razvile niz mehanizama na morfološkoj, fiziološkoj, biokemijskoj, staničnoj i molekularnoj razini pomoću kojih prevladavaju nedostatak vode, tj. sušu. Fang i Xiong (2015.) podijelili su otpornost biljaka na sušu u 4 osnovne kategorije: izbjegavanje suše (Drought avoidance; DA), tolerantnost na sušu (Drought tolerance; DT), bijeg od suše (Drought escape; DE), oporavak od suše (Drought recovery; DR). Razne osobine biljaka povezane sa sušom, uključujući osobine korijena, osobine lišća, osmotsko prilagođavanje, vodni potencijal, sadržaj ABA i stabilnost stanične membrane, korišteni su kao pokazatelji za ocjenu otpornosti biljaka na sušu.

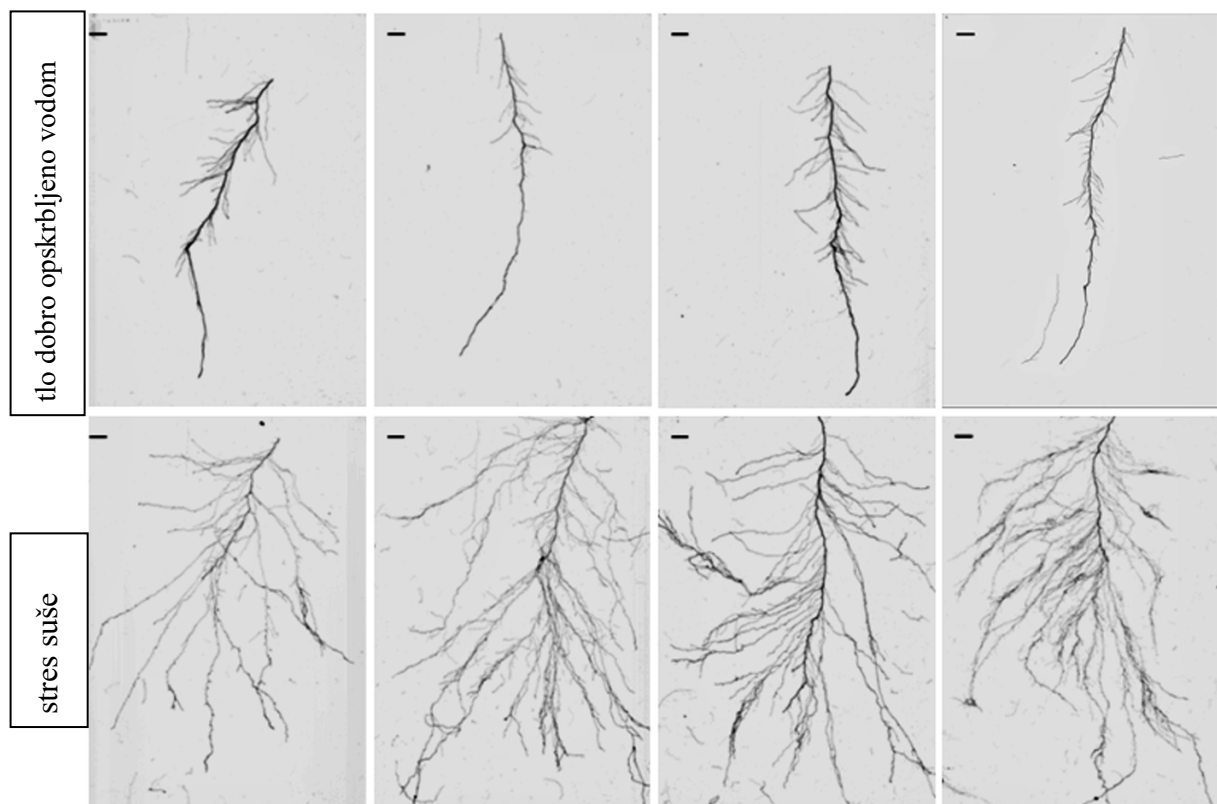
#### 2.1.1. Mehanizam izbjegavanja suše (DA; Drought avoidance)

Izbjegavanje suše je mehanizam kojim biljka održava visoki vodni potencijal u prisutnosti nestašice vode tj. sposobnost biljke da održava temeljne fiziološke procese u uvjetima blage ili umjerene suše prilagođavanjem određenih morfoloških struktura ili brzine rasta kako bi se izbjegli negativni učinci uzrokovani stresom suše. Kod mehanizma izbjegavanja suše biljke koriste tri strategije: (1) smanjenje gubitka vode zatvaranjem puči, uvijanjem lišća i povećanim nakupljanjem epikutikularnog voska na površini listova (npr. kod lucerne) (Zhang i sur. 2005.), (2) povećanjem sposobnosti unosa vode putem dobro razvijenog korijenskog sustava (dubok korijen, odnos korijena/izdanka) (Tardieu 2013.) i poboljšanjem sposobnosti skladištenja vode u određenim organima, (3) ubrzanjem ili usporavanjem prelaska iz vegetativne u generativnu fazu. Kod ovog mehanizma pokazatelji se obično odnose na održavanje vlage u biljci, unos vode te iskorištavanje te vode.

Modulacija građe korijenskog sustava

Biljke dobivaju vodu i hranjive tvari iz tla putem korijenskog sustava i zato korijenov sustav ima bitnu ulogu u reakciji na stres koji je uzrokovan nestašicom vode (Fang i Xiong, 2015). Biljke svojim prostranim korijenjem i dubinom ukorjenjavanja mogu održavati veći vodni potencijal i duže trajanje transpiracije u uvjetima suše što osigurava daljnji rast i razvoj (Hu i

Xiong, 2014). Na duljinu prodiranja, težinu, obujam i gustoću korijena, osim vrste biljke, utjecaj ima također i dubina i vlažnost tla. Pronađena je pozitivna povezanost između sposobnosti penetracije korijena i stupnja otpornosti na sušu kod *Phaseolus acutifolius* (Mohamed i sur. 2002.). U suhim područjima sadnice drvenastih biljaka imaju okomite korijene deset puta duže od visine biljke iznad tla. U uvjetima nestašice vode biljke se dinamički prilagođavaju i modificiraju građu korijena ovisno o vrsti. U početnim stadijima suše biljke imaju specifičnu odliku pojačati rast korijena kako bi doprijele do raspoložive vode na većim dubinama (Hu i Xiong, 2014). Također, kako su pronašli Hazman i Brown (2018) za rižu, biljke u uvjetima suše mogu pojačano granati korijenje na većim dubinama gdje je voda još dostupna (Slika 1.2.). Fang i sur. (2017) pronašli su kod pšenice pozitivnu korelaciju između bočnog grananja korijenja u dubljim slojevima tla (20-60 cm) i prinosa. Isti autori navode da (razvoj bočnog korijenja) u plićim slojevima tla (0-20 cm) može, međutim, negativno utjecati na prinos kod pšenice jer biljka troši resurse na razvoj korijena u zoni gdje vlada jak deficit vode tijekom suše, a na štetu razvoja nadzemnog dijela biljke i prinosa. Ozbiljna nestašica vode može smanjiti izduživanje korijena (Slika 1.2.), grananje i formiranje kambijskog sloja, a vrhovi korijena biljaka koje rastu u sušnom tlu postaju plutasti. Osim vode u tlu, na rast korijena utječu voda i stanje nutrijenata u zračnom dijelu biljke. U uvjetima suše često se primjećuje povećani omjer korijena i izdanaka (root/shoot ratio) (Wu i Cosgrove, 2000).



Slika 1.2.: Prikaz apikalnog dijela (20 vršnih cm) korijena riže četiriju sorata u uvjetima dobre opskrbe tla vodom i u stresu suše

Izvor: Hazman i Brown (2018)

## Osobine lišća

Uz modulaciju građe korijena, morfološke i fiziološke reakcije lišća na stres su ključne za smanjenje gubitka vode i za učinkovitost upotrebe vode (Fang i Xiong, 2015). Kada biljke osjete nedostatak vode, njihovo lišće pada ili se uvija (Slika 2.2.) zbog nedostatka turgora u stanici te se taj fenomen zove uvenuće. To je pasivni pomak lišća biljke paralelno sa smjerom upada sunčevog zračenja u svrhu sprečavanja prekomjerne transpiracije za vrijeme stresnog perioda, nestašice vode. Istraživanja su pokazala da biljke koje imaju zakašnjelo pomicanje lišća u stresnim uvjetima suše imaju sposobnost održavanja turgora lišća povećavanjem unosa vode (korijen) ili osmotskom regulacijom, dok biljke koje ranije uvijaju lišće kad nastupi suša, pokazuju zapravo da su na nju osjetljivije (Lu i sur., 2011.). To potvrđuju i istraživanja Effendi i sur. (2016) koji navode da je rano uvijanje listova proučavanih hibrida kukuruza tijekom razdoblja sušnog stresa pokazatelj veće osjetljivosti na sušu te je rezultiralo nižim prinosom zrna u odnosu na hibride čije se lišće počelo uvijati kasnije tijekom suše.



Slika 2.2. Uvijanje listova kukuruzau svrhu smanjenja transpiracije kao posljedica suše i visokih temperatura.

Izvor: <https://cropwatch.unl.edu/2016/impacts-extreme-heat-stress-and-increased-soil-temperature-plant-growth-and-development>

Neovisno o ovom mehanizmu uvijanja (rolanja) lista, neke biljne vrste mogu aktivno prilagoditi orijentaciju plojki listova paralelno sa smjerom sunčevog zračenja čime reguliraju količinu sunčevog zračenja. Uspravni listovi u deficitu vode primaju manje sunčevog zračenja što rezultira redukcijom gubitka vode i boljim vodnim statusom biljke. To znači da su uspravni listovi efikasan mehanizam izbjegavanja suše (Stevenson, 1971.). Obadvoje, i pasivno i aktivno pomicanje listova ima ulogu smanjenja količine sunčevog zračenja koja

pada na list, a to ima za posljedicu reduciranje površinske temperature lista i reduciranje gubitka vode (Fang i Xiong, 2015).

Uvijanje listova potiče turgorski tlak, a osmotsko prilagođavanje može odgoditi pojavu uvijanja listova. Biljke s povećanom otpornošću na sušu često imaju kseromorfne strukture poput manjih i debljih listova, više epidermalnih trihoma, manje i gušće puči, deblju kutikulu (voštanu prevlaku), deblja palisadna tkiva veći omjer palisade prema debljini spužvastog parenhima i razvijeniji omotač vaskularnog snopa (Fang i Xiong, 2015). Epidermalni trihomi lišća smanjuju transpiraciju biljaka pod uvjetima jakog svjetla i pomažu reflektirati svjetlost. Lipidi se nakupljaju u epidermi da formiraju vosak i povećavaju refleksiju sunčeve svjetlosti radi sprečavanja prekomjerne transpiracije i visoke temperature površine listova (Mohammadian i sur., 2007). Ojačani sklerenhim (mehanička tkiva) mogu smanjiti štetu od uvenuća i zaštićuju biljke od izravnog svjetlosnog zračenja. Palisadna tkiva i vaskularni snopovi osiguravaju prijenos i zadržavanje vode i hranjivih sastojaka. Sva ta svojstva smanjuju prekomjerni gubitak vode te poboljšavaju sposobnost zadržavanja vode kako bi se izbjegla oštećenja od suše (Fang i Xiong, 2015). Puči su vitalni organi koji služe za razmjenu plina i vode između biljaka i vanjskog okruženja, osiguravajući maksimalnu apsorpciju CO<sub>2</sub> za fotosintezu i kontroliraju optimalnu transpiraciju. Tako su gustoća i veličina otvora puči usko povezani s otpornošću biljke na sušu. Funkcija puči u podešavanju transpiracije je vrlo važna u uvjetima ograničavanja vode. Stanice zapornice, koje u parovima okružuju otvor puči, vrlo su osjetljive na okolinske uvjete. Nakon primanja podražaja iz okoline dolazi do promjene vodnog potencijala i promjene turgora u stanicama zapornicama te se na taj način kontrolira otvaranje i zatvaranje puči, a s time i daljna regulacija transpiracije i fotosinteze. Biljke koje štede vodu (izbjegavaju dehidraciju i reduciraju transpiraciju) osjetljive su na vodni deficit i zatvaraju puči prije nego list počne venuti, vršeći time funkciju izbjegavanja suše (Fang i Xiong, 2015). Puči reagiraju na stres od nestašice vode na dva načina: (1) kao izravna reakcija na vlažnost zraka u kojoj stanice zapornice i susjedne epidermalne stanice izravno isparavaju vlagu da izazovu zatvaranje puči i spriječe nestašicu vode za list i (2) puči reagiraju na promjene vodnog potencijala tako da se zatvore kada vodni potencijal lista padne ispod određenog praga. K<sup>+</sup> je jedan od glavnih iona koji utječe na osmotski potencijal u stanicama zapornicama i tako kontrolira otvaranje i zatvaranje puči (Li i sur., 2006). Dotok ili istjecanje K<sup>+</sup> iz stanica zapornica ima ulogu u promjeni osmotskog potencijala i pritiska turgora, što dovodi do otvaranja ili zatvaranja puči. Vanjski i unutarnji K<sup>+</sup> kanali koji se nalaze na plazma membrani stanica zapornica su vitalni za transmembranski prijenos K<sup>+</sup> iona. Postoje i specifični proteini koji se vežu na supstrat (uključujući i proteine koje se vezuju na apscizinsku kiselinu – ABA, acetilkolinski receptori, proteini koji se vezuju na GTP i svjetlosni receptori), pumpe i kanali koji se nalaze na plazma membrani stanica zapornica i također su uključeni u kontrolu otvaranja i zatvaranja puči. Ti proteini su presudni za prijem i pretvorbu signala stresa u zaštitnim stanicama i temeljni su za otvaranje i zatvaranje puči. Neke studije sugeriraju da je otvaranje i zatvaranje puči kontrolirano signalom ABA, to je kemijski signal koji se sintetizira u korijenu kao odgovor na isušivanje tla te putuje ksilemom do lista i potiče

zatvaranje puči. Međutim i druge osobine lišća poput epidermalnih dlačica, kutikularnog voska, vodnog potencijala lista, relativnog sadržaja vode, brzine gubitka vode, temperature površine lista koriste se kao kriterij za ocjenu mehanizma izbjegavanja suše - drought avoidance (Hi i Xiong, 2014.).

## Fotosinteza

Također uz osobine lišća i modulaciju građe korijenovog sustava, fotosinteza je mehanizam koji je povezan s izbjegavanjem suše. Fotosintezu biljaka uglavnom reguliraju puči koje su odgovorne za izmjenu CO<sub>2</sub> i vode. Biljke su razvile tri puta fotosinteze koji uključuju C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> i metabolizam krasulacenske kiseline (CAM) za asimiliranje atmosferskog CO<sub>2</sub>. C<sub>3</sub> biljke otvaraju svoje puči za apsorpciju CO<sub>2</sub> i fiksaciju tijekom dana, a tijekom noći ih zatvaraju. Ovaj C<sub>3</sub> mehanizam je manjkav kada se biljke suoče s nedostatkom vode jer ne zadržavaju vlagu u uvjetima suše. C<sub>4</sub> biljke su razvile metaboličku pumpu kako bi koncentrirale CO<sub>2</sub> u stanicama omotača snopa i izvršile fiksaciju CO<sub>2</sub> odvojeno u mezofilnim stanicama i stanicama omotača snopa. Mehanizam C<sub>4</sub> biljaka efikasniji je u korištenju vode (WUE) od onog kod C<sub>3</sub> biljaka. U putu CAM fotosintetskog ciklusa biljke otvaraju puči za apsorpciju i fiksaciju CO<sub>2</sub> noću, a tijekom dana ih zatvaraju kako bi smanjile gubitak vode transpiracijom. Primjeri C<sub>4</sub> biljaka u poljoprivrednoj proizvodnji su kukuruz i šećerna trska, a C<sub>3</sub> biljaka pšenica i riža. Potpuno novo otkriće i iznenađenje bilo je međutim ono kad su Rangan i sur. (2016) otkrili da pšenica kao tipična C<sub>3</sub> biljka ima u svom genomu gene i za C<sub>4</sub> fotosintezu te da su ti geni aktivni (eksprimirani) u perikarpu zrna pšenice, ali ne i u listovima. Biljke koje koriste C<sub>4</sub> i CAM fotosintetski mehanizam bolje se prilagođavaju klimi koja naginje suši od C<sub>3</sub> biljaka (Ashraf i Harris, 2013). U vrijeme stresa od nestašice vode neke biljke koje su smatrane kao CAM fakultativne vrste imaju sposobnost promijeniti svoj fotosintetski put sa C<sub>3</sub> na CAM ciklus. Istraživači su utvrdili da je ključni enzim u CAM putu, fosfoenolpiruvat karboksilaza, transkripcijski reguliran stresnim uvjetima suše.

### **2.1.2. Mehanizam tolerantnosti na sušu (DT; Drought tolerance)**

#### Osmotska regulacija

Tolerantnost na sušu je zapravo tolerantnost na promjene koje suša izaziva na razini stanica i molekula, a biljke to postižu osmotskom regulacijom. Osmotska regulacija (OR) definirana je kao smanjenje osmotskog potencijala u stanici zbog aktivne akumulacije raznih vrsta organskih i anorganskih tvari poput šećera, poliola (manitol, sorbitol), aminokiselina, alkaloida i anorganskih iona (Fang i Xiong, 2015). Akumulacija raznih organskih i anorganskih tvari omogućava nastavak procesa koji ovise o turgoru. Dokumentirano je da osmotska



regulacija održava staničnu strukturu i fotosintezu s niskim vodnim potencijalom, odgađa venuće listova, omogućava otvorenost puči i nastavak izduživanja listova iako smanjenim intezitetom, poboljšava rast korijena te bolje nakupljanje suhe tvari i zbog svega navedenog daje zadovoljavajući prinos u stresnim uvjetima. Tvari koje su uključene u osmotsku regulaciju razlikuju se kod različitih vrsta te mogu biti organske ili anorganske. Glavnu ulogu u osmoregulaciji imaju organski osmoliti koje je moguće podijeliti u dvije kategorije: (1) osmolite koji sadrže dušik kao što su slobodne aminokiseline npr. prolin ili druge te kvaterni amonijski spojevi kao što su betain, poliamini i proteini; (2) ugljikohidratne osmolite poput šećernih alkohola (manitol, sorbitol), monosaharida (glukoza, fruktoza), oligosaharida (saharoza, trehaloza) te polisaharida (fruktan) (McCue i Hanson, 1990). Ti organski osmoliti mogu regulirati osmotski potencijal plazme te zaštititi enzime i plazma membranu.

Anorganski ioni uglavnom reguliraju osmotski potencijal vakuole kako bi se održao turgorski tlak, no visoka koncentracija anorganskih iona može izazvati metabolički poremećaj u biljnim stanicama.

Prolin ima vrlo jake hidratacijske sposobnosti, njegov hidrofobni dio se može vezati za proteine dok se njegov hidrofilni dio veže za molekule vode, omogućujući proteinima veći pristup vodi kako bi se povećala njihova topljivost i spriječila proteinska denaturacija od dehidracije u uvjetima osmotskog stresa. Također prolin djeluje ne samo kao citoplasmatsko zaštitno sredstvo za enzime i staničnu strukturu već i za podešavanje redoks potencijala i smanjenje kiselosti stanica (Venekamp i sur., 1989.).

Trehaloza je redukcijski disaharid. U uvjetima stresa od suše, sadržaj međustanične trehaloze se brzo povećava kako bi blokirao transformaciju dvoslojne membrane fosfolipida iz stanja tekućeg kristala u čvrsto stanje, te stabilizira strukturu proteina, nukleinskih kiselina i drugih bioloških makromolekula (Crowe i sur. 1984.).

Betain je metabolički međuprodukt koji pripada u vodi topljivim alkaloidnim kvaternim amonijskim spojevima i djeluje kao jedna od netoksičnih tvari osmotske regulacije u višim biljkama, stablašicama. Također pomaže stabilizirati strukture i aktivnost fotosinteze, uključujući i zaštitne enzime i pomaže u održavanju cjelovitosti membrane protiv prožimajućeg oštećenja u uvjetima stresa od suše (Ashraf i Foolad, 2007.).

Proteini kasne embriogeneze (LEA – late embryogenesis abundant proteins), akvaporini (AQP) i molekularni čaperoni su se također pokazali kao nositelji ključne uloge kod OR u biljnim stanicama. LEA proteini se formiraju tijekom procesa razvoja sjemena, to su proteini niske molekularne težine, a sastoje se od osnovnih aminokiselina bogatih lizinom, glicinom, serinom, a najčešće im nedostaju ostaci cisteina i tirozina. LEA proteini (zvani još i dehidrini) su hiperhidrofilni proteini izrazito visoke stabilnosti na visoke temperature, a mogu ostati u vodenom stanju čak i u uvjetima ključanja. LEA proteini mogu zaštititi biološke makromolekule, preusmjeriti unutarstaničnu raspodjelu vode, vezati anorganske ione kako bi se izbjegla šteta pripisana nakupljanju visokih koncentracija iona u uvjetima stresa od suše, sprječavaju prekomjernu dehidraciju tkiva biljke i kontroliraju ekspresiju drugih gena vezivanjem na nukleinske kiseline (Close, 1996.).

Akvaporini (AQP) su kanalni proteini koji su odgovorni za prijenos vode, oni formiraju selektivne kanale vodnog prometa u biljnim stanicama i reguliraju brzi transmembranski prijenos vlage tijekom procesa klijanja sjemena, izduživanja stanica, otvaranja i zatvaranja puči i reakcija na abiotički stres. Podijeljeni su u tri skupine prema njihovom subcelularnoj lokaciji: plazma-membranski intrinzični proteini (PIP), tonoplast-intrinzični proteini (TIP) i nodulinu-26 slični-intrinzični proteini (NLM). Akvaporini posreduju u pasivnom prijenosu vode duž osmotskog gradijenta tlaka unutar i izvan membrane i sposobni su regulirati ravnotežu vlage za cijelu biljku u uvjetima suše. Ovo je postignuto održavanjem ravnoteže vodnog potencijala između parenhimskih stanica ksilema i toka transpiracije, regulirajući prijenos vode kroz stanice i tkiva kao i podešavanje turgora i volumena stanica (Maurel, 1997).

#### Antioksidativni obrambeni sustav

Oksidativni stres događa se obično kao sekundarna pojava stresa suše (ali i drugih stresova). Antioksidativni obrambeni sustav je jedan od mehanizama reakcije na sušu. Aerobni metabolizam koji pribavlja energiju za rast i razvoj biljaka često je popraćen stvaranjem nusproizvoda, reaktivnih vrsta kisika (ROS) kao što su singlet kisik ( $^1\text{O}_2$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksid radikal ( $\text{O}_2^-$ ) i hidroksi radikal ( $\text{OH}\bullet$ ). Intracelularno stvaranje i uklanjanje ROS-a je u dinamičnoj ravnoteži u normalnim uvjetima, no u uvjetima stresa suše ta ravnoteža se poremeti i dolazi do prekomjernog nakupljanja ROS-a koji oštećuju stanice te takvo oksidativno pogoršanje može dovesti i do smrti biljke (Cruz, 2008). Membranski fosfolipidi i masne kiseline su osjetljivi na prekomjerno nakupljanje ROS-a, što rezultira peroksidacijom membranskih lipida. Pod ROS stresom, prostorne konfiguracije različitih membranskih proteina ili enzima su poremećene, što dovodi do povećanja propusnosti membrane i propuštanja iona, uništavanja klorofila, poremećaja metabolizma, pa čak teške ozljede ili smrti biljaka. Biljke proizvode ROS u kloroplastima, peroksisomima, mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu, plazma membrani i staničnoj stijenci zbog neravnoteže između stvaranja i korištenja elektrona u uvjetima stresa od suše. ROS napadju najosjetljivije makromolekule u biljnim stanicama te tako induciraju peroksidaciju lipida, karbonilaciju proteina i oštećenje DNA molekula što može rezultirati katastrofalnim posljedicama. Za zaštitu stanica od štetnih učinaka prekomjernog ROS-a, biljke su razvile niz sofisticiranih enzimskih i ne-enzimskih antioksidativnih obrambenih mehanizama kako bi održale homeostazu unutarstaničnih redoks stanja. Zaštitni enzimi uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), askorbat peroksidazu (APX), glutation peroksidazu (GPX), glutation reduktazu (GR), glutation S-transferazu (GST), dehidroaskorbat reduktazu (DHAR), monodehidroaskorbat reduktazu (MDAR), tioredoksin peroksidazu (TPX), alternativnu oksidazu (AOX), peroksideroksin (PrxR / POD) itd. SOD ciklus,  $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  ciklus, AsA-GSH, GPX i CAT zajedno grade glavne puteve za uklanjanje/izbacivanje ROS-a. Ravnoteže među SOD, APX i CAT aktivnosti ključne su za održavanje homeostaze  $\text{H}_2\text{O}_2$  u biljkama. Ne-enzimski

antioksidanski sustav sastoji se od nekoliko reducirajućih tvari poput askorbinske kiseline (AsA), glutationa (GSH), karotenoida (CAR),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), citokroma f (Cyt f), flavanona, antocijanina itd. Do danas je poznato dosta istraživanja u kojima su autori izvjestili da je postignuta povećana tolerancija na sušu eliminacijom prekomjernog nakupljanja ROS-a u stanicama (Cruz, 2008).

### Sadržaj fitohormona i klorofila

Endogeni fitohormoni osjetljivi su na promjene u okolišu, a nekoliko fitohormona imaju nezamjenjivu ulogu u reakcijama na stres od suše. Smatra se da je abscizinska kiselina (ABA) fitohormon koji je najuže povezan s reakcijama biljaka na stres od suše. Kada dođe do nestašice vode u tlu kroz korijenski sustav se šalje signal te se pokreće sinteza ABA-e. Stanice zapornice u listu prepoznaju ABA koja djeluje kao međustanični glasnik te se pokreće zatvaranje puči putem intracelularne signalne transdukcije i smanjuje se metabolička aktivnost povezana s rastom biljaka (Wilkinson i Davis, 2002). Osim što regulira zatvaranje puči u uvjetima stresa, ABA djeluje na aktivnosti kanala u stanicama zapornicama, na razinu transkripcije proteina kalmodulina te na ekspresiju nekih gena koji reagiraju na nju. Dokazano je i da ABA potiče sintezu i nakupljanje prolina tako utječući na aktivnost pirolin-5-karboksilat reduktaze (P5CR) i pojačavajući sintetičku aktivnost glutamol-fosfata. Ekspresija  $\lambda^1$ -pirolin-5-karboksilat sintetaze (P5CS) može se izazvati sušom i ABA-om. ABA je najvažnija signalna molekula za signalnu transdukciju suše. Postoje tri relativno nezavisna puta transdukcije signala koji djeluju u reakcijama biljaka na stres od suše, dva puta su ovisno o ABA-i, a jedan je neovisan. Stres koji je uzrokovan sušom potiče biosintezu intracelularne ABA-e koji onda aktivira odgovarajuće transkripcijske faktore i zatim pospješuje ekspresiju gena vezanih za sušu (Choi i sur., 2000). Tilakoidne membrane su strukturni temelj za apsorpciju, prijenos i pretvorbu svjetla u kloroplastima. Mnoge vrste pigmentno-proteinskih kompleksa koji su odgovorni za apsorpciju svjetlosti, prijenos i pretvorbu se nalaze u tilakoidnim membranama. U uvjetima stresa od suše, membranski sustav u stanici biljke, uključujući strukturu membrane povezane sa fotosintezom, uništava se zbog nedostatka vlage, hranjivih tvari i energije, što rezultira poremećajem u fiziološkim procesima. Ti čimbenici vjerojatno izravno ili neizravno utječu na sadržaj klorofila. Dokazano je da se sadržaj klorofila značajno smanjuje uz smanjenje sadržaja vode u tlu, a smanjenje ukupnog sadržaja klorofila uglavnom je posljedica smanjenja klorofila A. Za one biljke koje mogu održati viši sadržaj klorofila u uvjetima stresa od suše smatra se da sunčevu energiju troše učinkovitije te se stoga smatra da su razvile veću otpornost na sušu (Fang i Xiong, 2015).

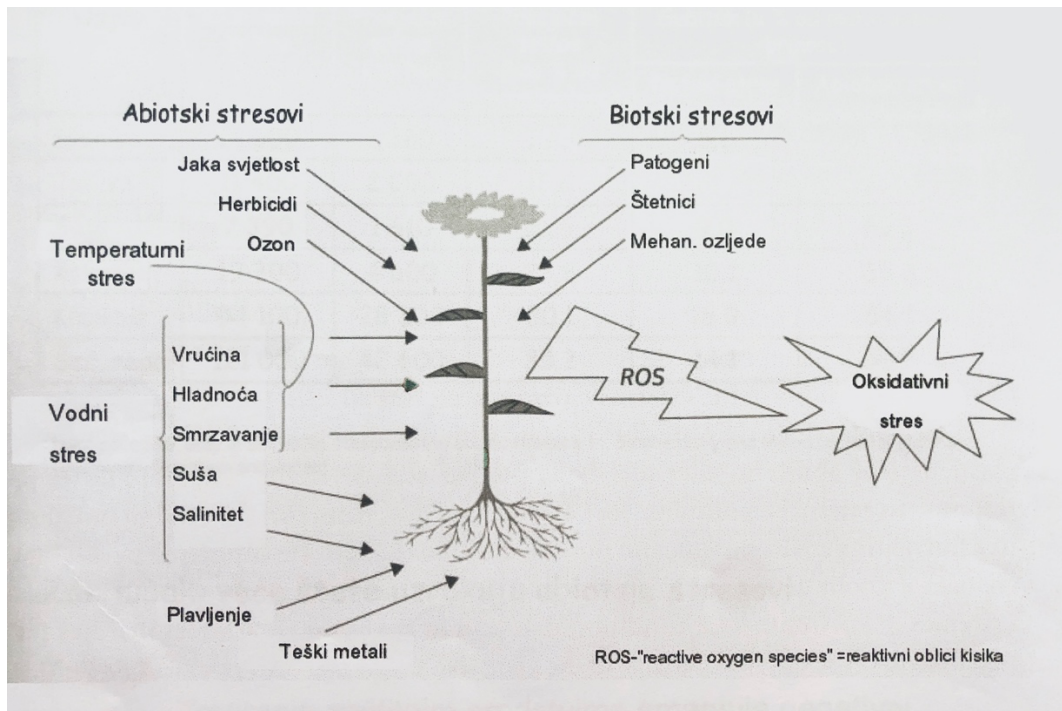
### **2.1.3. Mehanizam bijega od suše (DE; Drought escape)**

Bijeg od suše je morfološki fenomen koji biljke postižu ranijim dozrijevanjem. Genotipovi raznih vrsta kultiviranog bilja koje odlikuje ovaj fenomen ranozrelosti završe životni ciklus prije nastupa razdoblja intenzivne suše, a postižu to pojačanom metaboličkom aktivnošću i ubrzanim rastom (McKay i sur., 2003). Vrijeme cvatnje je važna osobina koja se odnosi na adaptaciju na sušu, gdje kratak životni ciklus može dovesti do bijega od suše. Trajanje usjeva je određeno genotipom i okolinom i omogućuje usjevu da pobjegne od stresa izazvanog sušom. Svojstva koja omogućuju intenzivan rast i ubrzani razvoj, ranozrelost, a time i izbjegavanje suše su: visoka provodljivost puči, visoka fotosintetska aktivnost, niska djelotvornost korištenja vode (WUE) i rana cvatnja (Kereša i sur., 2008).

## **2.2. Genetičke modifikacije za otpornost biljaka na sušu**

### **2.2.1. Abiotski i biotski stresovi**

Biljke su tijekom rasta i razvoja izložene različitim okolišnim uvjetima, od kojih neki predstavljaju stres za samu biljku. Nepovoljni uvjeti mijenjaju fiziološke procese biljke, utječu na metabolizam, rast i razvoj te dovode do promjena na staničnoj i molekularnoj razini. Ti stresovi kojima su izložene poljoprivredne kulture nazivamo abiotskim i biotskim stresovima (Slika 2.1.).



Slika 2.1. Abiotski i biotski stresovi koji utječu na biljke

Izvor: Slater, Scott and Fowler (2008) Plant Biotechnology, the genetic manipulation of plants. Second edition.

Veće štete mogu izazvati abiotski stresovi od biotskih jer se tretiranjem zaštitnim sredstvima može smanjiti negativan učinak biotskih stresova. Mehanizam za postizanje tolerantnosti na različite abiotske stresove je sličan kod biljaka jer suša, salinitet tla, vrućina, ali i smrzavanje za posljedicu imaju isti fiziološki efekt, a to je dehidracija citoplazme koja dovodi do smanjenja turgora te zatvaranja puči. Na taj način dolazi do smanjenja transpiracije i fotosinteze, a rezultat toga je redukcija rasta. Da bi biljka stvorila tolerantnost na stres od suše mora održavati rast u uvjetima deficita vode tako da održava turgor i transpiraciju. Ako nema dovoljno dostupne vode u tlu, biljka održava turgor listova smanjenjem osmotskog potencijala listova, tj pojačanom sintezom osmolita. Na staničnoj i molekularnoj razini posljedica dehidracije je denaturacija staničnih proteina i membrana. Do denaturacije dolazi koncentracijom iona u stanici koji narušavaju vodeni zaštitni omotač koji štiti proteine. Nakupljeni osmoliti štite proteine od denaturacije (Slater i sur., 2008).

Geni koji se induciraju pod uvjetima stresa kako bi se smanjile štetne posljedice osmotskog stresa kodiraju proteine LEA (engl. *late embryogenesis abundant*). Proteini LEA se eksprimiraju u vegetativnim tkivima tijekom uvjeta manjka vode. Uloga proteina LEA je zadržavanje vode, sekvencijacija iona te molekularnih čaperona. Također dolazi do ekspresije mnogih membranskih transportera i kanala koji prenose vodu kako bi se kontrolirao prijenos vode u uvjetima kada nedostaje. Kako osmotski stres proteine čini podložnijima agregaciji i denaturaciji dolazi i do nakupljanja proteina toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock protein*) koji štite stanične proteine (Zhu, i sur., 1997). Dolazi i do povećane sinteze antioksidacijskih

enzima i spojeva koji neutraliziraju reaktivne oblike kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) stvorene zbog sekundarnog oksidativnog stresa (Xiong i Zhu, 2002).

Odgovor na stres se javlja na morfološkoj, molekularnoj i staničnoj razini, na razini ekspresije gena te na razini cijele biljke u obliku razvojnih promjena, prilagodbe transporta iona te metaboličkih promjena (Xiong i Zhu, 2002). Tijekom osmotskog stresa dolazi do aktivacije raznih signalnih puteva koji dovode do promjena u staničnom odgovoru, sinteze proteina uključenih u odgovor na stres, antioksidansa ili nakupljanja kompatibilnih osmolita (Szekely, 2007; Zhu i sur., 1997). Osmoliti se nakupljaju u citoplazmi, gdje održavaju osmotski potencijal i fiziološku aktivnost stanice te je njihova biosinteza pod utjecajem okolišnih signala.

U biljkama dolazi do akumulacije više vrsta osmolita istovremeno, a njihova količina ovisi o staničnom organelu i organu biljke u kojem dolazi do nakupljanja, razvojnom stadiju biljke i okolišnim uvjetima u kojima se biljka nalazi: količini svjetlosti, dostupnosti kisika i količini prisutnih ugljikohidrata (Hare i sur., 1998). Različite biljke mogu akumulirati različite osmolite, a takva raznolikost može biti posljedica različitog metabolizma biljke i tla na kojem se nalazi. U suhim tlima biljke najviše nakupljaju betain (eng. *glycine betaine*). U sušnim uvjetima žitarice nakupljaju najviše šećera i aminokiselinu prolin, a mahunarke šećerne alkohole i prolin (Szabados i sur., 2011).

Unutar stanice, osim regulacije osmotskog potencijala, osmoliti imaju važnu ulogu u očuvanju makromolekulskih i staničnih struktura te neutralizaciji reaktivnih oblika kisika.

Genetička transformacija biljaka genima koji omogućuju pojačano nakupljanje osmolita ili kojih drugih tvari ili povećavaju ekspresiju endogena odgovornih za tolerantnost na sušu je efikasna strategija kojom se može postići tolerantnost biljaka na stres.

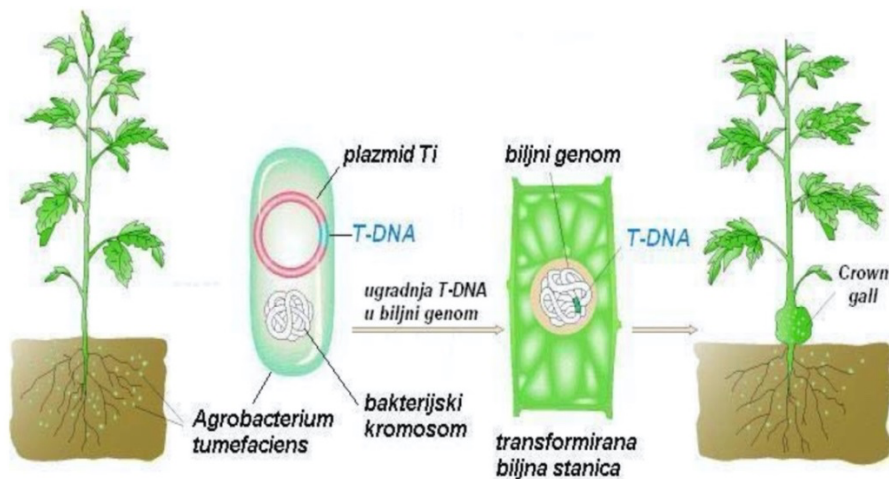
### **2.2.2. Metode genetičkih modifikacija biljnih stanica**

Genetičko inženjerstvo ili tehnologija rekombinantne DNA je proces mijenjanja genoma nekog organizma, a da bi ga se provelo prethodi mu cijeli niz tehnika kojima je moguće pronaći točno određeni gen u genomu neke vrste, izolirati ga, klonirati, odrediti redoslijed nukleotida, promijeniti ga, te ugraditi u genom iste ili neke druge vrste. Neovisno o tome da li se genetičko inženjerstvo provodi na prokariotskim organizmima, biljkama ili životinjama, temeljne tehnike su vrlo slične i redovito uključuju ugradnju željenih fragmenata DNA u bakterijski plazmid pomoću restrikcijskih endonukleaza i DNA-ligaza. Fragment (gen) koji se želi ugraditi u genom ciljanog organizma priprema se, analizira i umnaža pomoću plazmida u bakteriji *Escherichia coli*. Za genetičke modifikacije biljnih stanica najčešće se koristi metoda pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* ili se pak željeni gen unosi u stanicu pomoću uređaja „gene gun“. Druge metode genetičkih transformacija biljnih stanica, a ima ih još dosta, rjeđe se koriste. Nakon što ugradimo željeni gen u genom stanice određene biljke, iz

te/tih se stanica, obično na selektivnom mediju, trebaju regenerirati čitave biljke koje nazivamo genetički modificirane ili transgene biljke.

### Genetičke modifikacije pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterija *A. tumefaciens* je gram-negativna bakterija koja živi u tlu. Njezin genetski materijal se sastoji od kružne dvolančane molekule DNA (bakterijski kromosom) i plazmida Ti (tumor-inucirajući). Ta bakterija se kemotaksijom kreće prema ozljeđenom mjestu na biljci, ulazi u međustanični prostor, veže se za zdrave biljne stanice te u biljni genom pronesi i ugradi točno određeni dio svog plazmida, T-DNA (transferna DNA) (Slater i sur., 2008) (Slika 2.2.). Na T-DNA se nalaze dvije skupine gena: geni za regulatore rasta (biljne hormone) i geni za proizvodnju opina. Stanica u čiji je genom bakterija ugradila T-DNA naziva se genetički modificirana (transformirana) stanica. Regulatori rasta transformiranu biljnu stanicu tjeraju na nekontroliranu diobu pa se iz takve stanice razvije nakupina identičnih stanica tzv. tumor (engl. Crown gall). Zbog skupine gena za proizvodnju opina na T-DNA, stanice tumora proizvode i izlučuju u međustanični prostor opine koje bakterije koriste kao hranu.



Slika 2.2. u prirodi bakterija *Agrobacterium tumefaciens* ugrađuje dio svojih gena u genom biljne stanice

Izvor: [http://www.hugi.hr/files/Biljke\\_oplemenjene\\_genetickim\\_inz.\\_u\\_komercijalnoj\\_upotrebi\[1\].pdf](http://www.hugi.hr/files/Biljke_oplemenjene_genetickim_inz._u_komercijalnoj_upotrebi[1].pdf)

U genetičkom inženjerstvu iz bakterije *A. tumefaciens* se izolira plazmid Ti te se iz T-DNA izrežu svi geni koji se tamo nalaze osim rubne sekvence T-DNA koja je u prosjeku dugačka 25 nukleotidnih parova i ključna je za prijenos T-DNA iz bakterije u biljni genom. U T-DNA se pomoću restriksijskih endonukleaza i DNA ligaze ugradi željeni gen (npr. za tolerantnost na sušu) koji je prije toga pripremljen i umnožen pomoću drugog plazmida u bakteriji *E. coli*. Takav rekombinanti plazmid Ti se unese u bakteriju *A. tumefaciens*, bakterije se uzgoje u tekućoj podlozi, te se u takva bakterijska suspenzija dodaje suspenziji stanica ili nanosi na

komadiće tkiva biljke u čiji smo genom htjeli ugraditi određeni gen. Bakterija ne razlikuje originalnu T-DNA od T-DNA u koju su ugrađeni željeni geni te će zato ugraditi željene gene u genom biljne stanice istim mehanizmom kojim to radi u prirodi. Iz biljnih stanica u koje je ugrađen željeni gen regenerirat će se na odgovarajućoj hranidbenoj podlozi biljke koje se potom zakorijene i sade u zemlju (slika 2.3.).

Postoji i nešto jednostavnija metoda primjenom bakterije *A. tumefaciens*. Naziva se transformacija *in planta* - *floral dip method*. Tom se metodom biljke ne regeneriraju u kulturi tkiva i stanica nego se biljke u koje se želi unijeti određeni gen uzgoje u zemlji u posudi, a onda se cvjetni pupovi uranjaju u bakterijsku suspenziju na nekoliko desetaka minuta i nakon toga se biljka ostavi da proizvede sjeme. Određeni postotak sjemenki sadrži embrio u čijim se stanicama nalazi ugrađen željeni gen pa se izravno iz tih sjemenki razviju transgene biljke (Jan i sur, 2016).



Slika 2.3. unošenje željenih gena u biljni genom pomoću bakterije *A. tumefaciens*

Izvor: [http://www.hugi.hr/files/Biljke\\_oplemenjene\\_genetickim\\_inz.\\_u\\_komercijalnoj\\_upotrebi\[1\].pdf](http://www.hugi.hr/files/Biljke_oplemenjene_genetickim_inz._u_komercijalnoj_upotrebi[1].pdf)

### Metoda bombardiranjem česticama (biolistic metoda)

Druga metoda za unošenje željenih gena u biljni genom provodi se uz pomoć aparata popularno zvanog „gene gun“ (Slika 2.4.). Najprije je potrebno prirediti veliki broj kopija željenog gena, a to se najčešće radi umnožavanjem (kloniranjem) u bakteriji *E. coli*. Male čestice zlata ili volframa oblože se s pročišćenim rekombinantnim plazmidom koji sadrži željeni gen, te se pomoću uređaja „gene gun“ ispucavaju pod visokim pritiskom u prethodno pripremljeno biljno tkivo, prolaze kroz biljno tkivo te u nekim stanicama željeni geni dospiju



u jezgru gdje ih stanični enzimi ugrade u genom. Nakon toga se iz takvih stanica regeneriraju transgene biljke (Slater i sur., 2008).



Slika 2.4. aparat „gene gun“

Izvor: [http://www.hugi.hr/files/Biljke\\_oplemenjene\\_geneticim\\_inz.\\_u\\_komercijalnoj\\_upotrebi\[1\].pdf](http://www.hugi.hr/files/Biljke_oplemenjene_geneticim_inz._u_komercijalnoj_upotrebi[1].pdf)

### 2.3. Genetički modificirane biljne vrste tolerantne na sušu

Ukupno su tri biljne vrste genetički modificirane za tolerantnost na sušu registrirane u bazi priznatih (odobrenih) genetički modificiranih biljaka (GM Approval Database). To su na sušu tolerantni GM kukuruz, soja i šećerna trska (Tablica 1.2.). Međutim, samo su kukuruz i soja i komercijalizirani. GM šećerna trska tolerantna na sušu još je u fazi ispitivanja.

Tablica 1.2. Komercijalna GM svojstva: tolerantnost na abiotički stres

Event Name and Code	Trade Name
<b>Maize - <i>Zea mays L.</i> : 7 Events</b>	
Name: <b>MON87427 x MON87460 x MON89034 x TC1507 x MON87411 x 59122</b> Code: <b>MON-87427-7 x MON-87460-4 x MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-87411-9 x DAS-59122-7</b>	not available
Name: <b>MON87460</b> Code: <b>MON-87460-4</b>	<b>Genuity® DroughtGard™</b>
Name: <b>MON87460 x MON88017</b> Code: <b>MON-87460-4 x MON-88017-3</b>	not available
Name: <b>MON87460 x MON89034 x MON88017</b> Code: <b>MON-87460-4 x MON-89034-3 x MON-88017-3</b>	not available
Name: <b>MON87460 x MON89034 x NK603</b> Code: <b>MON-87460-4 x MON-89034-3 x MON-00603-6</b>	not available
Name: <b>MON87460 x NK603</b> Code: <b>MON-87460-4 x MON-00603-6</b>	not available
Name: <b>MON89034 x MON87460</b> Code: <b>MON-89034-3 x MON-87460-4</b>	not available
<b>Soybean - <i>Glycine max L.</i> : 2 Events</b>	
Name: <b>HB4</b> Code: <b>IND-00410-5</b>	<b>Verdeca HB4 Soybean</b>
Name: <b>HB4 x GTS 40-3-2</b> Code: <b>IND-00410-5 x MON-04032-6</b>	not available
<b>Sugarcane - <i>Saccharum sp</i> : 3 Events</b>	
Name: <b>NXI-1T</b> Code: <b>NXI-1T</b>	not available
Name: <b>NXI-4T</b> Code: <b>NXI-4T</b>	not available
Name: <b>NXI-6T</b> Code: <b>NXI-6T</b>	not available

Izvor:

<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/commercialtrait/default.asp?TraitTypeID=6&Trait=Abiotic%20Stress%20Tolerance>

### 2.3.1. Genetički modificirani kukuruz tolerantan na sušu – Genuity® DroughtGard™

Genuity® DroughtGard™ kukuruz je prvi komercijalizirani genetički modificirani usjev tolerantan na sušu. Komercijaliziran je 2013. g u SAD-u. DroughtGard kukuruz sadrži u sebi „cold shock protein B“ (CspB) iz bakterije *Bacillus subtilis*. „Cold shock“ proteini (CSP) pronađeni su u bakterijama, a sintetiziraju se kada temperature za preživljavanje bakterija

padnu ispod optimalnih. CSP kao i CspB ponašaju se kao RNA čaperoni koji pomažu u održavanju normalnih fizioloških funkcija za vrijeme stresa tako što imaju sposobnost nekovalentnog vezanja na pogrešno uvijenu RNA te ih odvijaju i vraćaju takve RNA molekule u normalnu biološku funkciju (Nemali i sur., 2015).

Kako navode Castiglioni i sur. (2008) nakon Monsantoovih početnih istraživanja *Arabidopsis* biljaka i riže koje su transformirane sa *cspA* i *cspB*, kukuruz je transformiran sa *cspB* i ocijenjen u nizu terenskih eksperimenata. Ukupno 22 neovisna *cspB* genetička događaja (events) testirani su u preliminarnom terenskom pokusnom ispitivanju gdje su bili izloženi stresu od suše tijekom razdoblja od dva tjedna neposredno prije cvatnje, kada su žitarice najosjetljivije na gubitke. Gubici biomase izazvani sušom koji nastaju početkom sezone i gubici zbog slabijeg nalijevanja zrna, koji nastaju nakon cvatnje, mogu se djelomično nadoknaditi ako sušni period ne traje predugo. Međutim, stres od suše tijekom cvatnje dovodi do gubitaka zrna (formiranja malog broja zrna u klipu) s nepovratnim utjecajem na prinos. U prvom provedenom eksperimentu ne-transgene biljke izložene suši pretrpjele su 50 % -tno smanjenje stope rasta u odnosu na kontrolne biljke koje su zalijevane (Slika 2.5.). Unutar ove sheme, *cspB* transgene sorte kukuruza pokazale su povećanje stope rasta od 24 % u uvjetima suše u odnosu na ne-transgene biljke (što je bilo popraćeno poboljšanim sadržajem klorofila i fotosintetskim stopama), dok su pokazale uobičajene performanse u uvjetima uobičajene količine vode. Istraživanja su pokazala 4 % veći broj biljaka s klipovima koji daju zrnje i 11,7% veći broj zrna po biljci za *cspB* transgene linije u odnosu na ne-transgene u sušnim uvjetima. Pokazalo se, dakle, da je *cspB* gen sposoban spriječiti gubitak zrna, što je nepovratna (i stoga vrlo važna) komponenta gubitka prinosa u vrijeme suše.

Ispitivanja prinosa zrna potom su provedena na linijama 10 *cspA* i 10 *cspB* na četiri lokacije. Opet, tretman u uvjetima suše primijenjen je neposredno prije cvatnje, u jačini koja je rezultirala gubitkom uroda od 50 % za ne-transgene genotipove. Ovdje su *cspA* linije pokazale prosječno 4,6 %, veći prinos od ne-transgenih linija, dok je za *cspB* linije prosječni prinos bio veći 7,5%. Linije s najboljim učinkom za *cspA* i *cspB* pokazale prinos veći za 30,8 %, odnosno 20,4 % u odnosu na ne-transgene linije. Najbolje dvije *cspB* linije (CspB-Zm događaj 1 i 2) također su se pokazale značajno bolje u rastu lišća, udjelu klorofila i fotosintetskoj stopi. Monsanto vrši testiranja u različitim klimatskim regijama u SAD-u te cijeli postupak za jedan transgeni događaj traje oko 12 godina. Uz ispitivanje agronomskih svojstava, Monsanto je morao prikupiti ogromne količine podataka kako bi podnio zahtjev za deregulaciju kako bi omogućio da se njihov novi transgeni proizvod uzgaja u SAD-u i izvozi u inozemstvo. Takav genetički modificiran kukuruz komercijaliziran je 2013. godine u SAD-u pod imenom Genuity DroughtGard (genetički događaj MON87460).



Slika 2.5. Lijevo: netransformirane biljke i desno: Genuity DroughtGard u uvjetima suše 2007. g

Izvor: [https://www.nytimes.com/2008/10/23/business/23drought.html?pagewanted=2&\\_r=1](https://www.nytimes.com/2008/10/23/business/23drought.html?pagewanted=2&_r=1)

### **2.3.2. Genetički modificirana soja tolerantna na sušu – Verdeca HB4 soybean**

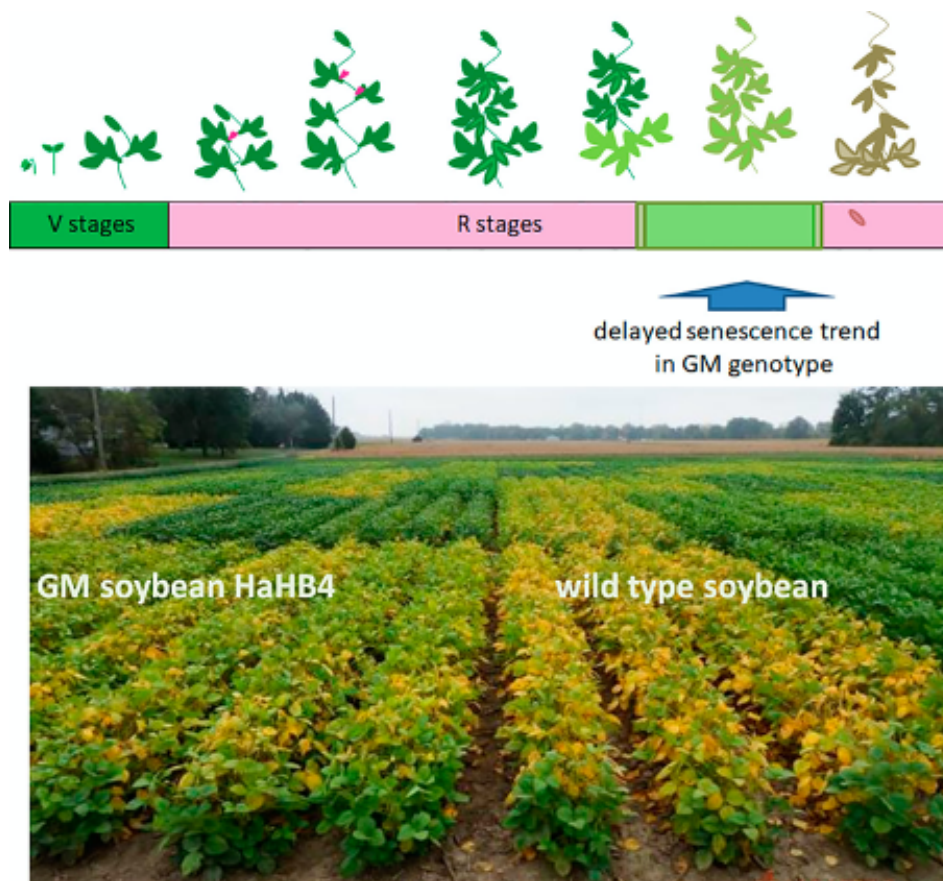
Soja je jedna od najvažnijih usjeva u svijetu. Prerađena soja je najveći izvor proteina i drugi najveći izvor jestivog ulja. Uzgaja se na 6% obradivih svjetskih površina, a od 1970-ih, površine namijenjene soji imaju najveći porast u usporedbi s drugim važnim usjevima (Hartman i sur., 2011.). Soja i njeni derivati su najprodavaniji poljoprivredni proizvodi kojima se trguje, čak preko 10% od sveukupne poljoprivredne trgovine (Lee i sur., 2016.). Prinos soje je pod utjecajem različitih faktora kao što je genetska adaptabilnost, bolesti, insekti, nedostatak hranjiva i drugi okolišni stresovi. Okolišni stresovi imaju veliki utjecaj na redukciju prinosa u vrijeme rasta usjeva. Od svih stresova, stres od suše je glavni limitirajući čimbenik koji vodi smanjenju prinosa. Suočene sa stresom, biljke su razvile niz mehanizama pomoću kojih prevladavaju stres, a jedan od tih je i aktivacija određenih gena (Zhao i sur., 2018.). Genetsko inženjerstvo je odgovarajući pristup za genetsko poboljšanje usjeva soje. Posljednjih godina su predloženi razni transgenetski pristupi temeljeni na proteinima, među njima je ekspresija osmoprotektanata, čaperona, transportera membranskih proteina i različitih enzima (Valliyodan i Nguyen, 2006), ali niti jedan od tih nije izašao na tržište. Uzimajući u obzir da odgovori na okolišni stres uključuju transkripcijsku regulaciju nekoliko gena, transkripcijski faktori (TF) se čine kao odgovarajući za genetsko inženjerstvo za tolerantnost na stres (Host i sur., 2016.). Vodeći se time, pristupi koji su temeljeni na

transkripcijskim faktorima (TF) su objavljeni, ali pošto rezultati nisu zadovoljili kriterije u nestresnom periodu (Skiryecz i sur., 2011.), nisu izašli na tržište. HD Zip (Homeodomain Leucine Zipper) koji spada u porodicu TF-a, jedinstven za biljno carstvo, prikazuje skup posebnih fizioloških funkcija koji su povezani razvojnim događajima u kojima abiotički čimbenici stvaraju stres. Ekspresija gena iz HD Zip podporodice I je regulirana vanjskim faktorima kao što su suša, visoke temperature, osmotski stres i svjetlosni uvjeti (Ariel i sur., 2007).

Ekspresija *HaHB4* gena (*Helianthus annuus* homeobox 4), koji spada u podporodicu HD-Zip, osigurava povećanu toleranciju na nedostatak vode kada je eksprimiran u vrsti *Arabidopsis* (Dezar i sur., 2005.). Dosljedno ovom dokaznom konceptu, uvođenje gena *HaHB4* dovelo je do tolerancije na sušu kod soje i kod pšenice (González i sur., 2019.). Gen *HaHB4* eksprimiran u soji pokazuje fenotip koji je otporan na stres. Gen *HaHB4* (sa svojim stres inducibilnim promotorom) kodira za HB4 transkripcijski faktor. HB4 smanjuje osjetljivost na etilen, koji regulira rast biljaka u abiotičkom stresu. Posljedica ekspresije ovog transkripcijskog faktora je odlaganje venuća uslijed pojačane sinteze antioksidansa i osmoprotektanata. Odlaganje venuća znači da su fotosintetski procesi duže aktivni tijekom suše što vodi povećanju prinosa. Pokusi u različitim proizvodnim okruženjima omogućili su odabir genetičkog događaja (*event*) soje modificiranog genom *HaHB4* (jedinstveni OECD-ov identifikator IND-ØØ41Ø-5) koji je imao povećan prinos u stresnim uvjetima suše, a isto tako zadržao visok prinos u normalnim, kontrolnim uvjetima (González i sur., 2019.). Iz perspektive sigurnosti hrane, nekoliko važnih značajki proizlazi iz upotrebe gena *HaHB4* u soji u događaju IND-ØØ41Ø-5. Prvo, izvor ovog proteina je suncokret koji je već dugo u prehrambenom lancu te stoga ima povijest sigurne upotrebe. Drugo, *HaHB4* se ponaša kao transkripcijski regulator endogenih puteva, oslanjajući se na prirodnu fiziologiju biljke. Stoga se u transgenom događaju ne izražavaju proteini ili metaboliti osim onih iz prirodne biljke. Treće, *HaHB4* je izražen u izuzetno niskim razinama što njegovu prisutnost čini zanemarivom iz perspektive sigurnosti hrane. Terenska ispitivanja provedena su u Argentini i Sjedinjenim Državama tijekom sezone 2012. i 2013. godine, na glavnim proizvodnim područjima soje, koji su pokrivali različite okolišne uvjete za usjev. Odabrano je šest lokacija u Argentini (u provincijama Buenos Aires, Cordoba, Entre Rios i Santa Fe) i pet lokacija u SAD-u (u državi Illinois, Indiana, Iowa, Kansas i Ohio).

Genetički modificirana soja s ovim genom trgovačkog naziva Verdeca HB4 soybean (Slika 2.6.) je komercijalizirana je 2015. g u Argentini, a 2019. također u SAD-u i Brazilu.





Slika 2.6. GM soja Verdeca HB4 u uvjetima suše

Izvor: Gonzales i sur. (2020) An Interdisciplinary Approach to Study the Performance of Second-generation Genetically Modified Crops in Field Trials: A Case Study With Soybean and Wheat Carrying the Sunflower HaHB4 Transcription Factor

### 2.3.3. Genetički modificirana šećerna trska tolerantna na sušu

Vlada Indonezije odobrila je prvi modificirani usjev šećerne trske koji će uskoro biti komercijaliziran (slika 2.6.). U ovu trsku uveden je *betA* gen koji kodira za kolin dehidrogenazu (CDH) iz bakterije *Rhizobium meliloti* (Australian Patent Oice, Patent No. 737600). Ekspresija gena pod kontrolom je jakog promotora CaMV35S. Kolin dehidrogenaza, enzim za kojeg kodira ovaj gen katalizira pretvorbu kolina u betain aldehyd koji se onda djelovanjem drugog enzima pretvara u betain. Betain je osmoprotektant koji se i inače nakuplja u mnogim biljnim vrstama u stresu suše, a koji djeluje zaštitno na makromolekule, uključujući i zaštitne enzime i pomaže u održavanju cjelovitosti membrane. Indonezijsko Ministarstvo poljoprivrede je u kolovozu 2018. godine GM šećernu trsku klasificiralo kao sigurnu za korištenje u prehrambenoj industriji.



Slika 2.7. GM šećerna trska

Izvor: <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=16962>

### 3. Zaključak

- Suša kao i ostali abiotški stresovi čini najveće ograničenje u biljnoj proizvodnji te se uz sve izraženije globalne klimatske promjene situacija pogoršava
- Biljke su razvile niz mehanizama kojima prevladavaju nedostatak vode, a to su (1) mehanizam izbjegavanja suše (*drought avoidance*), (2) mehanizam tolerantnosti na sušu (*drought tolerance*), (3) mehanizam bijega od suše (*drought escape*)
- Za mehanizam izbjegavanja suše kod biljaka su ključni modulacije građe korijenskog sustava, osobine lišća i fotosinteza
- Kod mehanizma tolerantnosti na sušu bitna je osmotska regulacija, antioksidativni obrambeni sustav te sadržaj fitohormona i klorofila
- Mehanizam bijega od suše je morfološki fenomen koji biljke postižu ranijim dozrijevanjem
- Genetička transformacija biljaka genima koji omogućuju pojačano nakupljanje osmolita ili kojih drugih tvari koji doprinose tolerantnosti ili povećavaju ekspresiju endogena odgovornih za tolerantnost na sušu je efikasna strategija kojom se može postići tolerantnost biljaka na stres.
- Tri biljne vrste genetički modificirane za tolerantnost na sušu registrirane su u bazi priznatih genetički modificiranih biljaka, a to su GM kukuruz, GM soja i GM šećerna trska. Samo su GM kukuruz i GM soja komercijalizirani
- Genuity DroughtGard kukuruz sadrži u sebi „cold shock protein B“ (CspB) iz bakterije *Bacillus subtilis* te je komercijaliziran 2013. godine u SAD-u. To je prvi komercijalizirani genetički modificirani usjev tolerantan na sušu
- Verdeca HB4 soybean je genetički modificirana soja koja je transformirana genom *HaHB4* iz suncokreta (*Helianthus annuus*) i komercijalizirana je 2015. godine u Argentini
- U genetički modificiran usjev šećerne trske uveden je gen *betA* koji kodira za CDH iz bakterije *Rhizobium meliloti*. GM šećerna trska nije komercijalizirana nego je još u fazi ispitivanja



## 4. Popis literature

1. Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL. (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.*;12:419–426. doi:10.1016/j.tplants.2007.08.003.
2. Ashraf M, Foolad M (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206–216
3. Ashraf M, Harris P (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51:163–190
4. Beck E.H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress, *J.Biosci.* 32: 501–510.
5. Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R.J., Anstrom, D.C., Harrison, J., Stoecker, M., Abad, M., Kumar, G., Salvador, S., D’Ordine, R. & (2008). Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions, *Plant Physiology.* 147 (2): 455.
6. Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem.* 275: 1723–1730
7. Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plantarum* 97:795–803
8. Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701–703
9. Cruz CM (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav* 3:156–165
10. Dai, A. (2011). Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 2(1): 45–65
11. Dezar CA, Gago GM, Gonzalez DH, Chan RL. (2005) Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res.*;14:429–440. doi:10.1007/s11248-005-5076-0.
12. Fang Y, Du Y, Wang J, Wu A, Qiao S, Xu B, Zhang S, Siddique KHM and Chen Y (2017). Moderate Drought Stress Affected Root Growth and Grain Yield in Old, Modern and Newly Released Cultivars of Winter Wheat. *Front. Plant Sci.* 8:672.
13. Fang Y., Xiong L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(4):673-689
14. González FG, Capella M, Ribichich KF, Curín F, Giacomelli JI, Ayala F, Watson G, Otegui ME, Chan RL. (2019) Field-grown transgenic wheat expressing the sunflower gene HaHB4 significantly outyields the wild type. *J Exp Bot.*;70:1669–1681. doi:10.1093/jxb/erz037.
15. González F.G., Rigalli N., Miranda P.V., Romagnoli M., Ribichich K.F., Trucco F., Portapila M., Otegui M.E. & Chan R.L. (2020). An Interdisciplinary Approach to Study the Performance of Second-generation Genetically Modified Crops in Field Trials: A

- Case Study With Soybean and Wheat Carrying the Sunflower HaHB4 Transcription Factor. *Front. Plant Sci.* 11: doi:10.3389/fpls.2020.00178
16. Hare, P., Cress, W., i Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment.* 21: 535-553.
  17. Hartman G. L., West E. D., Herman T. K.. (2011) Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Secur.* 3:5–17.
  18. Hazman M., Brown K. (2018). Progressive drought alters architectural and anatomical traits of rice roots. *Rice* 11:62.
  19. Host R, David A, Ceasar SA, Ignacimuthu S. (2016) Genetic engineering of crop plants for drought tolerance: role of transcription factors. *South Indian J Biol Sci.* 2:272–286. doi:10.22205/sijbs/2016/v2/i2/100317.
  20. Hu H, Xiong L (2014) Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annu Rev Plant Biol* 65:715–741
  21. Jan S. A., Shinwari Z. K., Shah S. H, Shahzad A., Zia M. A, Ahmad N. (2016). In-planta transformation: recent advances. *Romanian Biotechnological Letters.* 21 (1): 11085-11091.
  22. Kereša S., Barić M., Horvat M., Habuš Jerčić I. (2008) Mehanizmi tolerantnosti na sušu i njihova genska osnova kod pšenice. *Sjemenarstvo* 25 (1), 35-45
  23. Lee T, Tran A, Hansen J, Ash M. (2016.) Major factors affect- ing global soybean and products trade projections. Washington (USA): United States Department of Agriculture, Economic Research Service
  24. Li L, Kim B-G, Cheong YH, Pandey GK, Luan S (2006) A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K channel for low-K response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12625–12630
  25. Lu Y, Hao Z, Xie C, Crossa J, Araus J-L, Gao S, Vivek BS, Magorokosho C, Mugo S, Makumbi D, Taba S, Pan G, Li X, Rong T, Zhang S and Xu Y 2011 Large-scale screening for maize drought resistance using multiple selection criteria evaluated under water-stressed and well-watered environments. *Field Crops Res.* 124 37
  26. Maurel C (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:399–429
  27. McCue, K. F. and Hanson, A. D. (1990): Drought and salt tolerance. Towards understanding and application. *Trends Biotech.* 8: 358-362.
  28. McKay, J. K., Richards, J. H., Mitchell-Olds, T. (2003): Genetics of drought adaptation in Arabidopsis thaliana. I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. *Mol. Ecol.* 12: 1137-1151.
  29. Mohamed MF, Keutgen N, Tawfika AA, Noga G (2002) Dehydration-avoidance responses of tepary bean lines differing
  30. Mohammadian MA, Watling JR, Hill RS (2007) The impact of epicuticular wax on gas-exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae). *Acta Oecol* 31:93–101

31. Nemali K. S, Bonin C., Dohleman F. G, Stephens M., Reeves W. R., Nelson D. E. et al. (2015). Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize. *Plant Cell Environ.* 38: 1866–1880.
32. Effendi R, Priyantol S B , Aqil M, and Azrai M (2016). Drought adaptation level of maize genotypes based on leaf rolling, temperature, relative moisture content, and grain yield parameters. *The 1st Biennial Conference on Tropical Biodiversity IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 270 (2019) 012016
33. Rangan P., Furtado A, Henry RJ (2016). New evidence for grain specific C4 photosynthesis in wheat. *Scientific Reports* 6:31721.
34. Skiryecz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci A, Gonzalez N, Hoerberichts F, Tognetti VB, et al. (2011) Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nat Biotechnol.*;29(3):212–214. doi:10.1038/nbt.1800.
35. Slater a., Scott N. W., Fowler R. (2008) *Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants.* Oxford University Press. Oxford
36. Stevenson K, Shaw R (1971) Effects of leaf orientation on leaf resistance to water vapor diffusion in soybean (*Glycine max L. Merr*) leaves. *Agron J* 63:327–329
37. Szabados, L., Kovacs, H., Zilberstein, A., i Bouchereau, A. (2011). Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. U: Kader, J-C i Delseny, M. (ur.) *Advances in Botanical Research.* 57: 105-150.
38. Szekely, G. (2007). Osmotic stress in plants. *Acta Scientiarum Transylvanica.* 15: 5-25.
39. Taiz, L., i Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology.* Sunderland. Sinauer Associates.
40. Tardieu F (2013) Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Front Physiol* 4:17
41. Tekle A. T., Alemu M. A. (2016) Drought tolerance mechanisms in Field crops. *World J. Biol. Med. Science* 3(2): 15-39
42. Valliyodan B, Nguyen H. T. (2006.) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 9:189–195. doi:10.1016/j.pbi.2006.01.019.
43. Venekamp J, Lampe J, Koot J (1989) Organic acids as sources for drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba L.* *J Plant Physiol* 133:654–659
44. Wilkinson S, Davis WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25:195–210
45. Wu, Y., Cosgrove, D. J., (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J Exp Bot.* 51(350):1543-1553
46. Xiong, L., i Zhu, J.-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment.* 25: 131-139.
47. Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY (2005) Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing

transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J* 42:689–707

48. Zhao T, Aleem M, Sharmin R. Adaptation to water stress in soybean: morphology to genetics. [Internet]. In: Andjelkovic V, editor. *Plant, abiotic stress and responses to climate change*. London (UK): IntechOpen; 2018. p. 33–68, doi:10.5772/intechopen.72229 [https:// www.intechopen.com/books/plant-abiotic-stress-and-responses-to-climate-change/adaptation-to-water-stress-in-soybean-morphology-to-genetics](https://www.intechopen.com/books/plant-abiotic-stress-and-responses-to-climate-change/adaptation-to-water-stress-in-soybean-morphology-to-genetics).
49. Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., i Bohnert, H. J. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 16(3): 253-277.

## 5. Životopis

Mara Merlak rođena je 26. 10. 1993. godine u Rijeci. Pohađa osnovnu školu u Rijeci nakon čega upisuje „Prvu riječku hrvatsku gimnaziju“, opći smjer. Godine 2012. upisuje preddiplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Preddiplomski studij završava 2017. godine obranom završnog rada na temu „Morfološke karakteristike i sindromi trovanja otrovnih vrsta gljiva iz roda Cortinarius “ nakon čega, iste te godine upisuje diplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.