

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Danijel I. Pantelić

ELONGACIONI FAKTOR TRANSLACIJE  
1A KOD KROMPIRA  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.):  
KARAKTERIZACIJA IZOFORMI,  
EKSPRESIJA I ULOGA U ODGOVORU  
BILJAKA NA TOPLOTNI STRES

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Danijel I. Pantelić

TRANSLATION ELONGATION FACTOR  
1A IN POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM*  
L.): CHARACTERISATION OF  
ISOFORMS, EXPRESSION, AND ROLE  
IN PLANT RESPONSE TO HEAT-STRESS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

---

**naučni savetnik dr Ivana Momčilović**

Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

---

**vanredni profesor dr Dušica Janošević**

Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

Član komisije:

---

**naučni savetnik dr Angelina Subotić**

Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ekperimentalni deo doktorske teze je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu u okviru projekta TR31049 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ivani Momčilović, bez čije podrške, nesebične pomoći, korisnim idejama i sugestijama, kao i posvećenosti, ne bih napisao ove redove.*

*Najiskrenije se zahvaljujem i svom mentoru dr Dušici Janošević, kao i dr Angelini Subotić na dragocenoj pomoći i korisnim savetima, kao i pomoći oko oblikovanja ove disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Snežani Zdravković-Korać koja me je naučila metodi Southern blot analize i dr Ani Simonović koja me je naučila tehnikama izolacije RNK i qPCR analize i pružila mi dragocenu pomoć u analizi ekspresije gena i tumačenju rezultata.*

*Zahvaljujem se i dr Ivani Dragičević na svemu što me je naučila o kulturi biljaka, kao i na zanimljivim diskusijama.*

*Zahvaljujem se i Jeleni Rudić na drugarskoj pomoći koju mi je pružila kad god mi je bila potrebna.*

*Od srca se zahvaljujem i Milošu Petroviću koji je sve vreme bio uz mene i pružao mi podršku tokom izrade ove teze.*

*Zahvaljujem se i svojoj porodici, na beskrajnoj ljubavi, strpljenju i podršci koju su mi pružali tokom svih ovih godina i nastavljaju da mi pružaju.*

*Na kraju želim da se zahvalim i svim kolegicama i kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka, na kolegijalnosti i prijatnim trenucima tokom zajedničkog laboratorijskog rada.*

## **Elongacioni faktor translacije 1A kod krompira (*Solanum tuberosum* L.): karakterizacija izoformi, ekspresija i uloga u odgovoru biljaka na toplotni stres**

### Sažetak

Eukariotski elongacioni faktor translacije 1A (eEF1A) je citosolni, multifunkcionalni protein koji ima ključnu ulogu u elongacionoj fazi tokom sinteze proteina, vršeći transport aa-tRNK do mesta A na ribozomima. Pored osnovne funkcije, ovaj elongacioni faktor može učestvovati i u eksportu molekula iz nukleusa, organizaciji citoskeleta, proteolitičkoj degradaciji proteina, kao i posedovati aktivnost molekularnog šaperona. U ovoj tezi ispitan je uticaj visoke temperature na proces tuberizacije, rastenje i razviće, kao i ekspresiju eEF1A u izdancima, listovima i krtolama kod različitih sorti krompira gajenih u kontrolisanim uslovima ili u polju. Pored toga, urađena je i karakterizacija izoformi eEF1A u listovima kod različitih sorti krompira gajenih *ex vitro* ili u polju. Kod različitih sorti krompira izvršena je procena broja kopija gena koji kodiraju eEF1A, a ekspresija *eEF1A* gena u uslovima visoke temperature je ispitana kod sorti Désirée i Festival. Analiza zastupljenost eEF1A u mikro- i minikrtolama kod toplotno-osetljive sorte Désirée, je pokazala da u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa dolazi do smanjenja zastupljenosti eEF1A, dok sa druge strane kod toplotno-tolerantne sorte Festival, dolazi do povećanja zastupljenosti eEF1A, kako u mikrokrtolama, tako i u starijim minikrtolama. Ovaj rezultat ukazuje na ulogu eEF1A u ublažavanju negativnog uticaja visoke temperature na proces tuberizacije kod krompira. Značajna korelacija ustanovljena je između zastupljenosti eEF1A u listovima krompira gajenih u polju tokom dve izuzetno tople godine (2011. i 2012.) i prinosa krompira. Rezultati eksperimenata u uslovima *ex vitro*, kao i polju, su pokazali da je relativna molekulska masa eEF1A krompira 49,2 kDa i da ima 5-8 izoformi. Povećanoj zastupljenosti eEF1A u uslovima visoke temperature, najviše su doprinela 2-3 polipeptida/izoforme iz bazne grupe. Genomska analiza je ukazala na postojanje više gena koji kodiraju eEF1A kod krompira, kao i da se ispitivane sorte razlikuju po broju kopija gena. Analiza ekspresije *eEF1A* gena u minikrtolama toplotno-osetljive sorte Désirée pokazala da je ekspresija većine gena osetljiva na delovanje visoke temperature, te dolazi do značajnog smanjenja broja većine *eEF1A* transkripata u uslovima toplotnog stresa. Sa druge strane, kod toplotno-tolerantne sorte Festival, visoka temperatura je imala blaži efekat

na ekspresiju većine *eEF1A* gena, odnosno zastupljenost pojedinih transkripata se blago povećala ili ostala na nivou kontrole u uslovima visoke temperature. Izuzetak je predstavljao transkript *eEF1A-12* gena koji se karakterisao izuzetnom inducibilnošću. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ekspresija gena *eEF1A-12* u uslovima visoke temperature najviše doprinosi povećanju zastupljenosti eEF1A proteina u krtolama toplotno-tolerantne sorte Festival, što otvara mogućnost za njegovo korišćenje u kreiranju novih, termotolerantnih sorti krompira putem klasičnih metoda selekcije ili metoda genetičkog inženjeringa.

**Ključne reči:** krompir, *Solanum tuberosum* L., eukariotski elongacioni faktor 1A, HSP, toplotni stres.

**Naučna oblast:** Biologija.

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

**Translation elongation factor 1A in potato (*Solanum tuberosum* L.):  
characterisation of isoforms, expression, and role in plant response to heat-stress**

Abstract

Eukaryotic elongation factor 1A (eEF1A) is a cytosolic, multifunctional protein that plays a central role in the elongation phase of translation by delivering aa-tRNA complex to the A site of the ribosome. The eEF1A is also implicated in the nuclear export of aa-tRNA, organization of the cytoskeleton, participates in proteolysis, and possess chaperone activity. In this thesis, the effects of high temperatures on tuberization, growth, and development, as well as the expression and accumulation of eEF1A in shoots, leaves, and tubers, were investigated in different potato cultivars grown in a controlled environment and field. In addition, the characterization of eEF1A isoforms in leaves of different potato cultivars grown *ex vitro* or in the field was done. Also, in different potato cultivars, the number of eEF1A-coding genes, as well as the *eEF1A* genes' transcript expression under a high-temperature treatment, were investigated. Investigation of eEF1A accumulation in micro- and minitubers of heat-sensitive cultivar Désirée revealed a lower level of eEF1A under prolonged heat-stress, while in heat-tolerant cultivar Festival, a higher level of eEF1A in microtubers and older minitubers was found. Also, a significant positive correlation between eEF1A abundance in potato leaves and the potato productivity in the field was observed in two extremely hot years 2001. and 2012. These results indicate an important eEF1A role in mitigation of the adverse impacts of high temperature on the tuberization in potato. Results from *ex vitro* and field experiments have shown that potato eEF1A is a protein of 49.2 kDa with multiple isoforms (5-8). Increase in eEF1A abundance under high-temperature condition was mainly due to 2-3 basic polypeptides/isoforms. Genomic analysis indicated the existence of multiple genes encoding eEF1A in potato. Analysis of *eEF1A* genes' transcripts in minitubers of heat-sensitive cultivar Désirée revealed that expression of the most genes was sensitive to high temperature, and there was a significant reduction in number of *eEF1A* transcripts. On the other hand, in heat-tolerant cultivar Festival, high temperature had a milder effect on *eEF1A* gene-expression. The abundance of most *eEF1A* transcripts slightly increased or remained unchanged under high-temperature condition, with the exception of the *eEF1A-12* transcript which was highly heat-inducible. Based on results obtained in this thesis, it can be concluded that

*eEF1A-12* gene expression mainly contributes to an observed increase in eEF1A abundance under high-temperature conditions in tubers of heat-tolerant cultivar Festival, which opens the possibility for its utilization in the development of new heat-tolerant potato varieties by classical breeding or genetic engineering.

**Key words:** potato, *Solanum tuberosum* L., eukaryotic elongation factor 1A, HSP, heat stress.

**Scientific field:** Biology.

**Specific scientific field:** Plant Physiology and Molecular Biology.



## Lista skraćenica

aa-tRNK	aminoacil-tRNK kompleks
ABA	apscisinska kiselina
ADP	adenozin difosfat
ANOVA	analiza varijanse
ATP	adenozin trifosfat
BAP	6-benzil aminopurin
bp	bazni parovi
CaM kinaze	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin zavisne kinaze
cDNK	komplementarna DNK
Ct	prag detekcije
CTAB	cetrimonijum bromid
DEPC	dietilpirokarbonat
DIG	digoksinin
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
dsDNK	dvolančana DNK
DTT	ditiotreitol
dUTP	deoksiuridin trifosfat
ECL	„enhanced chemiluminescence“, pojačana hemiluminiscencija
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
eEF	eukariotski elongacioni faktor
EF-Tu	elongacioni faktor Tu
eIF	eukariotski inicijacioni faktor
EtBr	etidijum bromid
GA	giberelin
GDP	guanozin difosfat
Glu	glutamin
GTP	guanozin trifosfat
Hr.	hromozom
HSP	„heat shock protein“, protein toplotnog stresa
HRP	„horseradish peroxidase“, peroksidaza rena
IEF	izoelektrofokusranje
IgG	imunoglobulin G
IPG	imobiliziran pH gradijent
kDa	kilo Dalton

LS	Linsmaier & Skoog
Lys	lizin
MS	Murashige & Skoog
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PCR	polimerazna lančana reakcija
PKC	protein kinaza C
PVDF	poliviniliden difluorid
qPCR	kvantitativni PCR
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	„reactive oxygen species“, reaktivne kiseonične vrste
rRNK	ribozomalna RNK
RT-PCR	metoda reverzne transkripcije
SDS	natrijum dodecil sulfat
SE	„standard error“, standardna greška
sHSP	„small HSP“, HSP male molekulske mase
SPS	saharoza-fosfat sintaza
SS	saharoza-sintaza
SSC	„saline-sodium citrate“, natrijum citrat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNK polimeraza
TBE	Tris-borat-EDTA pufer
TE	Tris-EDTA pufer
T-PBS	„tween 20 - phosphate-buffered saline“
tRNK	transportna RNK
TS	toplotni stres
VT	visoka temperatura

## Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Krompir, <i>Solanum tuberosum</i> spp. <i>tuberosum</i>	2
1.2. Poreklo, istorijat i proizvodnja krompira u Srbiji	3
1.3. Morfološke karakteristike krompira	4
1.4. Rastenje i razviće krompira	6
1.4.1. Tuberizacija	8
1.5. Uticaj visokih temperatura na formiranje i kvalitet krtola kod krompira	9
1.6. Uticaj visokih temperatura na membransku stabilnost	12
1.7. Uticaj visokih temperatura na fotosintezu i respiraciju	14
1.8. Uticaj visokih temperatura na particiju asimilata kod krompira	16
1.9. Elongacioni faktor translacije 1A (eEF1A)	19
1.9.1. Struktura eEF1A	20
1.9.2. Uticaj abiotičkog stresa na ekspresiju <i>eEF1A</i> gena	21
1.9.3. Posttranslacione modifikacije eEF1A i regulacija aktivnosti	22
1.9.4. Uloga eEF1A u eksportu molekula iz nukleusa	23
1.9.5. Uloga eEF1A u organizaciji citoskeleta	24
1.9.6. Proteolitička uloga eEF1A	25
1.9.7. Šaperonska uloga elongacionih faktora	26
1.9.8. Uloga eEF1A u procesu rastenja i razvića biljaka	27
1.10. Proteini toplotnog stresa	28
1.10.1. Familija HSP100	29
1.10.2. Familija sHSP	29
2. Ciljevi rada	32
3. Materijal i metode	33
3.1. Biljni materijal	33
3.2. Gajenje biljaka u kulturi <i>in vitro</i>	33
3.3. Eksperiment tuberizacije u kulturi <i>in vitro</i>	35
3.4. Eksperimenti sa biljakama gajenim <i>ex vitro</i>	36
3.5. Gajenje biljaka u eksperimentalnom polju	38
3.6. Izolacija proteina iz biljnog materijala	41
3.7. 1D SDS-PAGE elektroforeza i imunoblot analiza	41
3.8. 2D gel elektroforeza i imunoblot analiza	43
3.9. Izolacija genomske DNK iz biljaka krompira	44
3.9.1. Kvantifikacija i provera kvaliteta izolovane DNK	45
3.9.2. Analiza genomske DNK - Southern blotting	45

3.10. Izolacija ukupnih RNK iz listova i minikrtola krompira gajenih <i>ex vitro</i>	48
3.10.1. Kvantifikacija i provera kvaliteta izolovane RNK	50
3.10.2. Tretman deoksiribonukleazom	50
3.10.3. Reverzna transkripcija	51
3.10.4. PCR amplifikacija	51
3.11. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR)	54
3.11.1. Pripremanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju prečišćavanjem PCR produkata sa gela	54
3.11.2. Kvantitativni PCR	54
3.12. Statistička analiza rezultata	56
4. Rezultati	57
4.1. Ekspresija eEF1A kod različitih vrsta monokotiledonih i dikotiledonih biljaka	57
4.2. Uticaj temperature na preživljavanje eksplantata i rastenje izdanaka krompira gajenih pod tuber-indukujućim uslovima <i>in vitro</i>	58
4.3. Uticaj temperature na inicijaciju mikrokrtola krompira gajenih pod tuber-indukujućim uslovima <i>in vitro</i>	60
4.4. Uticaj visoke temperature na rastenje mikrokrtola kod odabranih sorti krompira gajenih pod tuber-indukujućim uslovima <i>in vitro</i>	61
4.5. Uticaj visoke temperature na dinamiku procesa tuberizacije <i>in vitro</i> kod odabranih sorti krompira	63
4.5.1. Distribucija različitih tipova mikrokrtola	66
4.6. Uticaj visoke temperature na zastupljenost eEF1A i HSP kod odabranih sorti krompira	67
4.7. Uticaj visoke temperature na rastenje, tuberizaciju i ekspresiju eEF1A u biljkama krompira gajenim <i>ex vitro</i>	70
4.7.1. 1D- i 2D-imunoblot analiza eEF1A u listovima sorte Désirée pri kratkotrajnom toplotnom stresu	70
4.7.2. Rastenje, tuberizacija i ekspresija eEF1A kod biljaka sorti Désirée i Festival u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa	72
4.7.2.1. Rastenje biljaka sorti Désirée i Festival u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa	72
4.7.2.2. Tuberizacija biljaka sorti Désirée i Festival u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa	74
4.7.2.3. Uticaj dugotrajnog toplotnog stresa na ekspresiju eEF1A i HSP-a u listovima	78
4.7.2.4. Ekspresija eEF1A i HSP-a tokom različitih faza tuberizacije u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa	80

4.8. Uticaj visoke temperature na ekspresiju eEF1A kod biljaka krompira gajenih u eksperimentalnom polju	83
4.8.1. 2D-imunoblot analiza ekspresije eEF1A kod biljaka krompira gajenih u eksperimentalnom polju	85
4.8.2. Korelacija relativne zastupljenosti eEF1A i visine primarnih izdanaka, sveža nadzemne biomase ili parametara prinosa kod krompira gajenih u eksperimentalnom polju	86
4.9. Analiza genomske DNK kod krompira	88
4.9.1. Struktura, veličina i pozicija gena na hromozomu koji kodiraju eEF1A kod krompira	89
4.10. Ispitivanje nivoa ekspresije <i>eEF1A</i> gena kod krompira u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa	92
5. Diskusija	104
5.1. Uticaj toplotnog stresa na rastenje, razviće i tuberizaciju biljaka krompira	104
5.2. Ekspresija eEF1A u uslovima toplotnog stresa	109
5.3. Karakterizacija izoformi eEF1A proteina	112
5.4. Uticaj visoke temperature na ekspresiju HSP-a	113
5.5. Uticaj visoke temperature na ekspresiju <i>eEF1A</i> gena	116
6. Zaključci	119
7. Literatura	122
Biografija autora	
Izjava o autorstvu	
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Izjava o korišćenju	

## 1. Uvod

Krompir, *Solanum tuberosum* L., predstavlja jednu od najvažnijih namirnica u ljudskoj ishrani i zauzima četvrto mesto po proizvodnji u svetu posle kukuruza, pšenice i pirinča (FAO, 2015). Krompir se u svetu gaji na približno 19 miliona hektara sa prosečnim prinosom od 17,26 t ha<sup>-1</sup>, ali uz veliki raspon prinosa od 2 t ha<sup>-1</sup> u nerazvijenim zemljama do 50 t ha<sup>-1</sup> u razvijenim zemljama (SAD, Holandija, Belgija, Nemačka, Francuska). Proizvodnja krompira u svetu je u stalnom porastu, naročito u nerazvijenim zemljama poput Kine, Indije i Brazila koje ujedno beleže i nagli ekonomski rast. Prema zvaničnim podacima statističkog biroa Evropske unije – Eurostat-a (2018) prosečan prinos krompira u Srbiji od 2013. do 2017. godine iznosio je približno 15 t ha<sup>-1</sup> što je vrlo nizak prinos u odnosu na neke evropske zemlje poput Belgije (46,49 t ha<sup>-1</sup>), Nemačke (44,45 t ha<sup>-1</sup>) ili Holandije (43,61 t ha<sup>-1</sup>)

Na proizvodnju krompira negativno utiču različiti spoljašnji faktori koji dovode do stresa, poput suše, niskih ili visokih temperatura (Bradshaw i Ramsay, 2009). Negativni efekti visoke temperature na rastenje i razviće biljaka krompira su brojni i uključuju: ubrzano rastenje izdanaka sa particijom asimilata ka nadzemnom delu biljke, usporavanje fotosinteze i intenziviranje reparacije, smanjenje rasta korenova, inhibiciju inicijacije i rastenja krtola, deformaciju krtola, smanjenje sadržaja suve materije u krtolama i povećanje sadržaja šećera (Struik, 2007a). Kao posledica globalnog zagrevanja u narednih 50 godina, predviđa se globalni pad prinosa krompira između 10% i 19% u periodu od 2010-2039. godine i između 18% i 32% u periodu od 2040-2069. godine u odnosu na referentnu 2003. godinu (Hijmans, 2003). Međutim, korišćenjem sorti krompira tolerantnih prema visokoj temperaturi, kao i promenom poljoprivredne prakse pomeranjem vremena sadnje od jednog do dva meseca, smanjenje prinosa može biti značajno manje, i to između 5% i 11% u periodu 2010-2039 i između 9% i 18% u periodu 2040-2069 u odnosu na 2003. godinu (Hijmans, 2003). Istraživanje proteina povezanih sa odgovorom krompira na delovanje visokih temperatura omogućava razumevanje molekularne osnove toplotne tolerancije ove značajne biljne vrste i otvara mogućnost za korišćenje datih proteina kako za brz i efikasan odabir

komercijalnih sorti krompira, tako i za kreiranje novih, termotolerantnih sorti krompira, koje bi bile pogodne za gajenje u izmenjenim klimatskim uslovima.

### 1.1. Krompir, *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*

Krompir je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Solanaceae, rodu *Solanum*, sekciji *Petota*, podsekciji *Potatoe* (Hawkes, 1990) (**Slika 1.**). Pored krompira, porodici Solanaceae pripadaju i druge poznate kultivisane vrste poput paradajza (*Lycopersicon esculentum*), paprike (*Capsicum annuum*) i duvana (*Nicotiana tabacum*). Prema Burton-u (1989), rod *Solanum* obuhvata preko 2000 vrsta od kojih su najpoznatije plavi patlidžan (*S. melongena*), paradajz (*S. lycopersicum*) i pomoćnica ili kokošije grožđe (*S. nigrum*). Ovaj rod je podeljen u nekoliko podsekcija, od kojih podsekcija *potatoe* obuhvata sve biljne vrste koje formiraju krtole. Podsekcija *Potatoe* se deli na serije, od koje je serija *Tuberosa* obuhvata 54 divljih i kultivisanih vrsta, od kojih je jedna i *S. tuberosum* (Hawkes, 1990). *S. tuberosum* obuhvata dve podvrste: *tuberosum* i *andigena*. Obe podvrste su kultivisane; podvrsta *tuberosum* (Čileanski krompir) predstavlja najznačajniju i najrasprostranjeniju poljoprivrednu kulturu koja se gaji, na primer u Severnoj Americi i Evropi, dok je gajenje podvrste *andigena* (Andski krompir) ograničeno na Centralnu i Južnu Ameriku (Hawkes, 1990; Hanneman, 1994).

Carstvo:	Plantae
Potcarstvo:	Tracheobionta
Razdeo:	Magnoliophyta
Klasa:	Magnoliopsida
Potklasa:	Asteridae
Red:	Solanales
Familija:	Solanaceae
Potfamilija:	Solanoidae
Rod:	<i>Solanum</i>
Sekcija:	<i>Petota</i>
Podsekcija:	<i>Potatoe</i>
Serija:	<i>Tuberosa</i>
Vrsta:	<i>Solanum tuberosum</i> L.

**Slika 1.** Klasifikacija krompira.

Osnovni broj hromozoma kod roda *Solanum* je dvanaest. *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* može biti diploid ( $2n=24$ ) ili tetraploid ( $2n=48$ ). Krompir sa diploidnim brojem hromozoma je jedino nađen u Čileu, dok je tetraploidni krompir najčešća gajena poljoprivredna kultura u celom svetu. Pretpostavlja se da je do tetraploidije kultivisanog *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* došlo usled ukrštanja dve iste ili srodne diploidne vrste (Hawkes, 1990). Fenomen gameta sa dupliranim brojem hromozoma ( $2n$ ) je česta pojava kod vrsta roda *Solanum*. Ovakvi gameti se nalaze zajedno sa gametima sa haploidnim brojem hromozoma ( $n$ ) i na taj način omogućavaju da se prirodnim ukrštanjem poveća broj hromozoma (Hanneman, 1995). Watanabe i Peloquin (1991) su pokazali da većina od 38 vrsta roda *Solanum* koje su ispitivali formira dihaploidne gamete i da njihova učestalost pojavljivanja varira od 2 do 10%.

## 1.2. Poreklo, istorijat i proizvodnja krompira u Srbiji

Centar biodiverziteta divljeg krompira (podsekcije *Potatoe*) leži u Latinskoj Americi, koji se uzima i kao mesto porekla. Za seriju *Tuberosa*, kao i za većinu ostalih ostalih serija koje pripadaju podsekciji *Potatoe*, postoje dva centra biodiverziteta. Jedan centar predstavlja široku oblast Anda u Venecueli, Kolumbiji, Ekvadoru, Peruu, Boliviji i Argentini, dok je drugi centar u centralnom Meksiku. Areal rasprostranjenja ovih divljih krompira je mnogo veći i obuhvata delove od jugozapada SAD-a, pa sve do južne Argentine i Čilea (Child, 1990; Hawkes, 1990).

Kultivisane vrste roda *Solanum* su pronađene i unutar oba centra biodiverziteta divljeg krompira. Izuzetak predstavlja kultivisani diploid *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, koji je jedino pronađen u užoj oblasti na jugozapadu Čilea. Kultivisani tetraploid *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, koji je zastupljen u Evropi i ostalim delovima sveta, vodi poreklo od introdukovanog krompira *S. tuberosum* subsp. *andigena* iz Kolumbije i Perua. U prilog ovoj činjenici govori to što je prvi doneti krompir u Evropu imao osobine da je kasno cvetao i formirao krtole, kao i to da je morfološki odgovarao više *Andigena* tipu krompira (Howard, 1970). Tokom selekcije, doneti krompir se prilagodio uslovima dugog dana i različitim spoljašnjim uslovima koji vladaju u Evropi, zbog čega je kasnije svrstan u subsp. *tuberosum*. Simmonds (1966) je



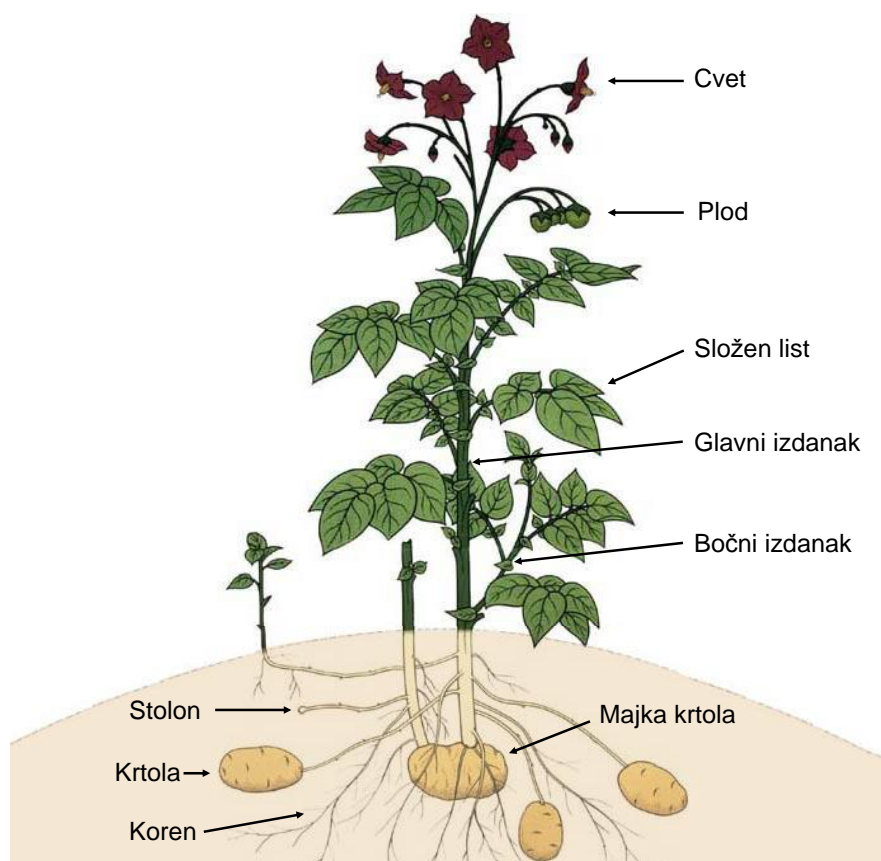
pokazao da takav prelaz može da se odvije za veoma kratak period od približno deset godina selekcije. Iz Evrope se ovaj novi tip krompira širio po celom svetu kao kultivisana poljoprivredna kultura. Alternativa ovoj teoriji o poreklu krompira bi bila ta da je nakon epidemije plamenjače koju prouzrokuje gljiva *Phytophthora infestans*, nova germplazma *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* iz Čilea doneta u Evropu (Hawkes, 1990).

Krompir se prvobitno gajio kao retka i lekovita biljka. Masovnija proizvodnja krompira je započela početkom 19. veka sa ciljem da se poveća lokalna poljoprivredna proizvodnja. Tada se krompir uglavnom koristio kao stočna hrana, ali kasnije počinje da se koristi i u ljudskoj ishrani zbog brzog smanjivanja osećaja gladi i niske cene, kao i drugih osobina poput mogućnosti dužeg čuvanja i manjeg kvarenja. Na području sadašnje Srbije, u Banat i Bačku, krompir donose seljaci kolonisti Nemci oko 1759. godine, a odatle, u Ovčarsko-kablarsku klisuru, u manastir Blagoveštenje, krompir donose kaluđeri iz Srema oko 1782. godine. Danas, nizak prinos krompira u Srbiji u odnosu na neke evropske zemlje poput Belgije ili Nemačke, nije rezultat samo nepovoljnih uslova za proizvodnju krompira, već i nekorišćenje najosnovnijih tehnoloških mera u zaštiti useva i za povećanje dostupnosti vode, kao i hranljive materije biljkama, zatim savremene mehanizacije i kvalitetnog sortnog semenskog materijala (npr. neoštećene krtole, odgovarajuće veličine i oblika; krtole koje daju odgovarajući broj izdanaka po jednoj semenskoj krtoli i sa pravim vremenom formiranja seta krtola) (Bročić i Stefanović, 2012; Haverkort i Struik, 2015).

### **1.3. Morfološke karakteristike krompira**

Sa stanovišta botanike, krompir je zeljasta, višegodišnja biljka skrivenosemenica, životne forme geofita, što znači da prezimljuje pomoću krtola, dok zeljasti, nadzemni delovi u potpunosti izumiru. Kod većine sorti krompira, krtole se razvijaju kao odgovor na skraćivanje dana, spoljašnjeg signala koji najavljuje dolazak zime i hladnijeg vremena (Jackson, 1999). Krompir se razmnožava generativnim (polnim) putem obrazujući semena. Klijanje semena je po tipu epigeično (nadzemno); izdužuje se hipokotil koji iznosi semenjaču i kotiledone iznad zemlje (Cutter, 1978). Za

potrebe proizvodnje, krompir se razmnožava krtolama i u tom smislu predstavlja jednogodišnju biljku. Na **Slici 2.** prikazana je shematska ilustracija biljke krompira.



**Slika 2.** Morfologija biljke krompira. Slika je preuzeta iz FAO (2009) i modificovana.

Stablo biljke krompira čine nadzemni i podzemni deo. Nadzemni deo stabla je uspravno i zeljasto u ranijim fazama, a kasnije se pojavljuje nekoliko aksilarnih grana i dobija polupolegljivu formu. Na stablu su prisutna tzv. „krilca“ koja predstavljaju mehaničko tkivo, a tip ovih „krilaca“ je značajan u taksonomiji za identifikaciju sorti, s obzirom da se njihova morfologija ne menja sa razlikama u spoljašnjem okruženju biljke. Najčešći tipovi „krilaca“ su pravi, dupli ili talasasti tip. Listovi krompira su po tipu složeni, neparno perasti i mogu biti otvorene ili zatvorene strukture. Tipičan list krompira se sastoji od dva do četiri pari primarnih liski raspoređenih oko lisne drške i na vrhu imaju jednu terminalnu lisku. Između primarnih liski se nalaze manje,

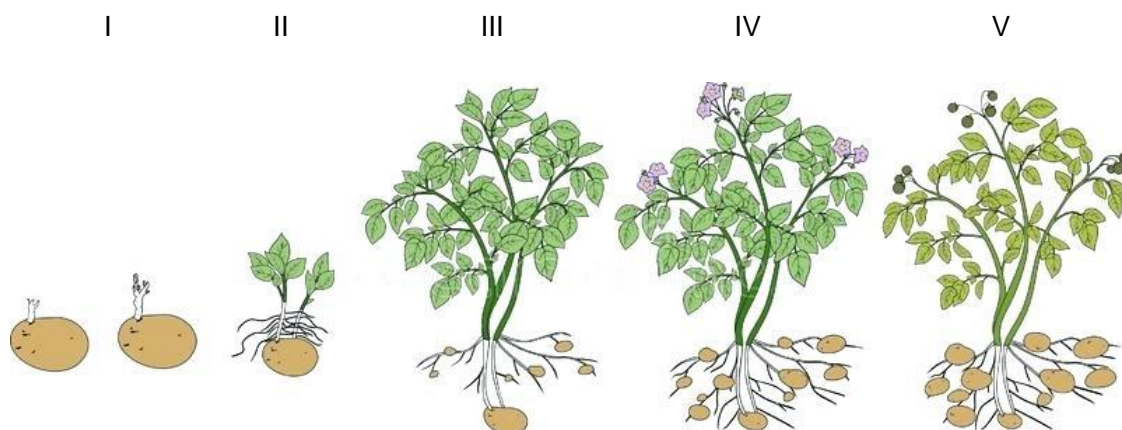
sekundarne liske koje su nepravilno raspoređene duž lisne drške. Takođe se mogu javiti i rudimentarne, neupadljive tercijerne liske duž lisne drške. Listovi su lisnom drškom povezani sa stablom i raspoređeni spiralno oko stabla. Cvet krompira je petočlan, dvopolan i organizovan u cimosne cvasti. Boja cveta varira od bele do ružičaste i ljubičaste, sa jarko žuto obojenim prašnicima. Oprašivanje je u većini slučajeva insektima ili ređe vetrom. Plod krompira su bobice zelene boje, a u plodu se mogu naći i do 300 semena. Na podzemnom delu stabla iz bočnih pupoljaka se razvijaju stoloni koji predstavljaju modifikovane izdanke. Stoloni se od pravih bočnih izdanaka razlikuju po tome što rastu plagiotropno i karakteriše ih mala količina hlorofila, izdužene internodije, rudimentarni listovi i vrh u obliku kukice (Cutter, 1978; Struik, 2007b). Na vrhovima stolona, obrazuju se krtole krompira. Koren krompira je žiličastog tipa koga čini mreža sitnih korenčića i najvećim delom je razvijen u površinskom delu zemljišta.

#### **1.4. Rastenje i razviće krompira**

Uzgajanje biljaka krompira iz semena se retko koristi za potrebe proizvodnje krompira, osim u slučaju stvaranja novih sorti i dobijanja prvih krtola. Proizvođači krompira najčešće koriste krtole kao sadni materijal zbog očuvanja sorte/genotipa krompira. Rastenje i razviće biljke krompira iz krtola, se odvija kroz pet glavnih faza (Rowe, 1993), i to:

1. **Klijanje.** Ova faza počinje sa razvojem klice iz okaca na krtolama koje rastu uspravno i traje do izlaska klice iz zemljišta kada se formira i prvi pravi list. Tokom ove faze, semenska krtola predstavlja jedini izvor energije, dok ne započne proces fotosinteze.
2. **Vegetativni rast.** U ovoj fazi se formiraju svi vegetativni delovi krompira (koren, stoloni, stablo i listovi). Tokom ove faze, započinje i fotosinteza, te dolazi do produkcije ugljenih-hidrata kao izvora energije za sintezu kompleksnih organskih molekula neophodnih za rastenje i razviće. Iako im ovaj proces omogućava da same proizvode potrebna organske jedinjenja, biljke i dalje koriste krtole kako dodatni izvor energije. Ova faza se završava početkom formiranja krtola na vrhovima stolona.

3. Inicijacija krtola. Dolazi do začetka krtola na vrhovima stolona, ali ne zadebljavaju i veoma su male u ovoj fazi. Kada biljka proizvodi mnogo više ugljenih-hidrata nego što joj potrebno za rast izdanaka, dolazi do formiranja začetaka krtola na vrhovima stolona. Na ovu fazu veoma utiču temperaturni uslovi i vlaga u zemljištu koji, ukoliko su nepovoljni, mogu izazvati neujednačen rast biljaka i smanjen broj krtola po biljci (Steyn, 1999).
4. Rast krtola. Tokom ove faze, krtole krompira se uvećavaju i dobijaju na masi. Čelije u krtolama krompira se šire i do 18 puta i akumuliraju vodu, ugljene hidrate (skrob) i hranljive materije. Nalivanje krtola je najduža faza tokom rasta i razvića i može da traje i do tri meseca.
5. Fiziološka zrelost. Ova faza započinje kada nadzemni delovi biljke počinju da žute i da opadaju listovi, učinak fotosinteze smanjuje, krtole usporavaju svoj rast i izdanak se potpuno osuši (**Slika 3.**).



**Slika 3.** Faze rastenja i razvića biljke krompira. Slika je preuzeta sa <https://www.naplanete.club> i adaptirana.

Dužina trajanja svake od navedenih faza varira i zavisi od faktora spoljašnje sredine, poput: temperature, tipa zemljišta, raspoloživosti vode i hranljivih materija, sorte krompira, geografske širine i primenjenih agrotehničkih mera. Mnogi faktori koji utiču na rasteenje i razviće krompira se ne mogu kontrolisati, ali proizvođači mogu da kontrolišu sortu krompira, veličinu semenske krtole, način i veličinu sečenja krtola, način sadnje, veličinu i oblik vegetacionog prostora, vreme sadnje i vreme ubiranja,

---

vlažnost zemljišta, mineralnu ishranu, strategiju zaštite useva (Bročić i Stefanović, 2012).

#### 1.4.1. Tuberizacija

Za ceo događaj od indukcije stolona, pa do inicijacije krtola se koristi termin „formiranje krtola“ ili „tuberizacija“ (Vreugdenhil i Struik, 1989). Formiranje krtola se kod krompira može podeliti na sledeće faze:

- indukcija i inicijacija stolona koje podrazumeva prvo vidljivo razrastanje bočnih podzemnih pupoljaka i plagiotropno rastenje,
- izduživanje stolona,
- zaustavljanje longitudinalnog rasteanja stolona,
- indukcija i inicijacija krtola,
- formiranje seta krtola po biljci,
- nalivanje i
- dostizanje fiziološke zrelosti krtola.

Krtole se mogu opisati kao delovi stolona koji zadebljavaju (rastu radijalno) i formiraju se subapikalno na ovim podzemnim izdancima. Razvoj stolona u velikoj meri zavisi od spoljašnjih uslova, naročito od svetlosti (Smith, 1977). Prema Steyn-u (1999) inicijacija krtola počinje kada indeks lisne površine<sup>1</sup> iznosi približno od 1,5-2. Na veličinu indeksa lisne površine utiču različiti faktori, pre svega dostupnost vode i mineralnih materija biljkama, gustina sadnje, i drugo. Ovaj indeks utiče na veličinu krtola kod krompira putem translokacije ugljenih hidrata koji se formiraju tokom procesa fotosinteze u nadzemnom delu biljke. Fotoperiod i temperatura su najznačajniji stimulusi iz spoljašnje sredine koji kontrolišu formiranje krtola kod krompira (Almekinders i Struik, 1996; Rodríguez-Falcón i sar. 2006). Uzimajući u obzir fotoperiod, podvrsta *S. tuberosum* ssp. *andigena* predstavlja krompir prilagođen uslovima kratkog dana (od 12-13 časova) i ove biljke će slabo ili uopšte neće formirati krtole ukoliko su izložene dužim danima (Ewing i Struik, 1992). Druga podvrsta, *S.*

---

<sup>1</sup> Ukupna površina listova biljaka po jedinici površine na kojoj su rasle (m<sup>2</sup>m<sup>-2</sup>).

---

*tuberosum* ssp. *tuberosum* je prilagođena uslovima dugog dana (12 do 18 časova) i kod ove biljke kratak dan dovodi do slabog vegetativnog razvoja što ima za posledicu loš prinos krtola (Ewing i Struik, 1992). Dnevne temperature vazduha ispod 30 °C i noćne temperature ispod 20 °C pogoduju formiranju krtola (Ewing, 1995). Više temperature vazduha od navedenih dovode do inhibicije tuberizacije kako u uslovima dugog dana, tako i kratkog (Jackson, 1999).

Tuberizacija kod krompira se može postići i u kulturi *in vitro*, gajenjem na veštačkoj hranljivoj podlozi uz dodavanje veće količine saharoze i/ili biljnih regulatora rastanja ili inkubacijom u uslovima mraka (Garner i Blake, 1989; Xu i sar., 1998a; Dragičević i sar., 2008). Krtole krompira dobijene korišćenjem kulture *in vitro* imaju slične morfološke i biohemijske karakteristike kao i krtole dobijene od biljaka gajenih u *ex vitro* uslovima, sa jednim izuzetkom, a to je zadržavanje razvića perimedularnog regiona u krtolama, što za posledicu ima ograničavanje rasta samih krtola (Xu i sar., 1998b). Zbog malih veličina, ove krtole se označavaju kao mikrokrtole. Pojedine faze tokom formiranja krtola se mogu razlikovati u kulturi *in vitro* u odnosu na *ex vitro* gajenje u zavisnosti od tretmana koji se primenjuje. Ukoliko se eksplantati<sup>2</sup> krompira gaje u mraku na hranljivoj podlozi sa povećanom koncentracijom saharoze, inicirane krtole su ili sedeće ili se formiraju na strukturama koje su slične stolonima (Vreugdenhil i sar., 1998), što nagoveštava promene u procesu formiranja stolona. *In vitro* sistem se često koristi za izučavanje procesa tuberizacije s obzirom da omogućava eksperimente pod strogo kontrolisanim uslovima i usklađivanje fiziološkog statusa biljaka krompira. Tuberizacija u uslovima visoke temperature u kulturi *in vitro* se od strane većeg broja autora predlaže kao dobra metoda za selekciju sorti krompira otpornih prema visokim temperaturama (Nowak i Colborne, 1989; Gopal i Minocha, 1998; Khan i sar., 2015, Pantelić i sar., 2018).

### **1.5. Uticaj visokih temperatura na formiranje i kvalitet krtola kod krompira**

S obzirom da krompir vodi poreklo iz regiona sa nižim dnevnim temperaturama (Hawkes, 1992), na rastenje i razviće, kao i prinos ove biljke, nepovoljno utiču visoke

---

<sup>2</sup> Deo biljke koji je isečen i sadrži jedan nodus sa pazušnim pupoljkom i/ili listićem.

temperature (Levy i Veilleux, 2007). Najbolji prinos kod krompira se postiže kada su srednje dnevne temperature u opsegu od 14-22 °C (van Dam i sar., 1996). Visoke temperature dovode do povećanja fotorespiracije i smanjenja produktivnosti fotosinteze u listovima krompira (Berry i Björkman, 1980), povećanja stope respiracije (Farrar i Williams, 1991) i promene u particiji asimilata tako da se oni zadržavaju u nadzemnim delovima biljke, a translokacija u krtola je sprečena (Wolf i sar., 1990, Jackson, 1999). Reynolds i sar. (1990) su pokazali da kod različitih vrsta roda *Solanum* koje su bile gajene u kontrolisanim uslovima 40/30 °C (dan/noć), a koje su osetljive na visoke temperature, dolazi do izraženije inhibicije usvajanja CO<sub>2</sub> i gubitka hlorofila u listovima u odnosu na vrste tolerantnije prema visokim temperaturama. Međutim, nekoliko studija na krompiru je pokazalo da do redukcije sinteze skroba pri visokoj temperaturi ne mora doći samo usled nedostatka snabdevanja krtola fotosintatima (Krauss i Marschner, 1984; Mohabir i John, 1988; Wolf i sar., 1991). U prilog ovome govori i to da inhibiciju rasta krtola pri povišenim temperaturama zemljišta prati povećanje nivoa saharoze u krtolama, slično kao i u listovima, što ukazuje na sprečavanje konverzije saharoze u skrob (Wolf i sar., 1991). Još jedan dokaz je i taj što su optimalne temperature za proces sinteze skroba znatno niže u odnosu na respiraciju koja se povećava na temperaturama do 40 °C (Mohabir i John, 1988). Kratkotrajni eksperimenti sa <sup>14</sup>C-obeleženom saharozom koja se nalazila u rastvoru u kojem su inkubirani odsecci (diskovi) krtola koje su bile u fazi rasta su pokazali da je optimalna temperatura za sintezu skroba 21,5 °C (Mohabir i John, 1988). Sa suprotne strane, povećanje temperature do 31 °C izazvala je povećano oslobađanje <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> što je ukazivalo na to da se <sup>14</sup>C-obeležena saharoza koristila u procesu respiracije, a da je sinteza skroba zaustavljena. Značaj niske temperature kao optimuma za sintezu skroba u krtolama se dovodi u vezu sa ograničavanjem prinosa kod krompira koji se dešava pri visokim temperaturama zemljišta. Ovo je potvrđeno i sa dugotrajnim eksperimentima na tri različite sorte krompira kod kojih je izučavana stopa rasta krtola i metabolizam ugljenih-hidrata (Kraus i Marshner, 1984). Kada se pojedinačne krtole krompira izlože temperaturi od 30 °C, 6 dana, dolazi do prestanka rasta krtola. Tokom ovog perioda, ugradnja <sup>14</sup>C-obeđenih asimilata (uglavnom u skrob) i sadržaj skroba u krtolama se značajno smanjuje, dok sa suprotne strane, na ugradnju u šećernu frakciju nije uticala visoka

temperatura (Kraus i Marshner, 1984). Smanjenje količine skroba u krtolama se može objasniti supresijom aktivnosti enzima, do čega je dovela visoka temperatura, a koji su značajni za metabolizam skroba (Kraus i Marshner, 1984). Iz ovih rezultata proističe zaključak da visoka temperatura zemljišta može dovesti do smanjenog sadržaja skroba i povećane količine šećera u krtolama kao posledica inhibicije konverzije šećera u skrob.

Visoka temperatura utiče i na morfološke osobine krtola uzrokujući nepravilni oblik krtola, formiranje lanaca i sekundarnih krtola što se često dovodi u vezu sa prekomernim izduživanjem i grananjem stolona, pojavu nekroze i pucanje krtola (Bodlaender i sar., 1964; Lugt i sar., 1964; Hiller i sar., 1985; Struik i sar., 1989, Sterrett i sar., 1991; Sterrett i sar., 2003). Krompir se gaji i zbog svojih nutritivnih vrednosti što se uglavnom svodi na sadržaj karotenoida, antocijanina i steroidnih alkaloidnih glikozida (solanin) koji pozitivno utiču na zdravlje ljudi (Brown, 2008; Ginzberg i sar., 2017). Poznato je da karotenoidi i antocijanini ispoljavaju antioksidativnu aktivnost zbog čega je poželjan povišen nivo ovih pigmenta u krtolama krompira koje se koriste u ljudskoj ishrani (Brown, 2005; Lachman i Hamouz, 2005; Brown i sar., 2007). Sa druge strane, glikoalkaloidi doprinose karakterističnom ukusu krtola i pokazuju antikarcinogeno delovanje, ali zbog njihove toksičnosti za ljude, nivo zastupljenosti u krtolama mora biti pažljivo regulisan (Friedman i sar., 2005). Iako je nivo zastupljenosti gore navedenih sekundarnih metabolita genetički determinisano, razvojni proces, tkivna specifičnost i spoljašnja sredina određuju njihov konačni sadržaj u krtolama (Ginzberg i sar., 2017). Ginzberg i sar. (2017) su pratili nivo zastupljenosti karotenoida, antocijanina i glikoalkaloida i ekspresiju gena uključenih u puteve njihove biosinteze u krtolama krompira tokom izlaganja visokoj temperaturi. Rezultati praćenja su pokazali da u uslovima visokih temperatura dolazi do smanjenja ekspresije gena u krtolama uključenih u sintezu karotenoida, antocijanina i glikoalkaloida. U krtolama je i sadržaj glikoalkaloida bio smanjen, što je u skladu sa smanjenim nivoom genskih produkata. Sa druge strane, sadržaj pigmenta antocijanina i ukupnih karotenoida je ostao neizmenjen. Ovi rezultati istraživanja Ginzberg i sar. (2017) pokazuju da gajenje krompira u toplim krajevima može izmeniti sekundarni metabolizam u krtolama na selektivan način,



menjajući njegovu nutritivnu vrednost i sastav komponenti koje su važne za ljudsko zdravlje.

### **1.6. Uticaj visokih temperatura na membransku stabilnost**

Održavanje funkcije ćelijskih membrana tokom delovanja visokih temperatura od krucijalnog je značaja za fiziološke procese, kao što su fotosinteza i disanje (Wahid i sar., 2007). Visoke temperature mogu promeniti aktivnost transportnih proteina i receptora lokalizovanih u membranama, denaturisati membranske proteine, povećati fluidnost lipidnog dvosloja i indukovati formiranje heksagonal-II faze, što krajnje dovodi do pucanja ćelijskih membrana i izlivanja ćelijskog sadržaja (Levitt, 1980; Fu i sar., 2012a). Promene u strukturi i funkciji bioloških membrana, usled delovanja visokih temperatura, utvrđene su za plastide, mitohondrije, endoplazmatični retikulum, jedro i plazmalemu (Čiamporová i Mistrík, 1993; Pareek i sar., 1997).

Dobro je poznato da biljke smanjuju nivo nezasićenosti lipida pri visokim temperaturama, a da sa druge strane povećavaju pri nižim temperaturama kako bi održale optimalnu fluidnost ćelijskih membrana (Larkindale i Huang, 2004; Chen i sar., 2006; Welti i sar., 2002, 2007). Biljke takođe regulišu i odnos lipida koji formiraju dvosloj i onih koji ne formiraju u cilju očuvanja stabilnosti membrana u zavisnosti od promene spoljašnje temperature (Webb i Green, 1991; Chen i sar., 2006; Welti i sar., 2007). Narayanan i sar., 2016 su sprovedi istraživanje na dve sorte pšenice sa različitim tolerancijama prema toplotnom stresu (TS); Ventnor koja je tolerantna i Karl 92 koja je osetljiva prema visokim temperaturama. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da pri visokim dnevnim i/ili noćnim temperaturama dolazi do značajnih promena u lipidnom profilu ispitivanih pšenica. Obe sorte pšenice su pokušale da se prilagode TS-u remodelovanjem svojih lipida i smanjenjem udela nezasićenih lipida. Remodelovanje lipida podrazumeva promene u lipidnom sastavu membrana (Zheng i sar., 2011). Narayanan i sar. (2016), su pokazali da je nivo sterol-glikozida bio za 23, 28 i 29% veći kod sorte Ventnor u odnosu na sortu Karl 92 prilikom izlaganja visokim dnevnim i/ili noćnim temperaturama. Sterol-glikozidi, kao membranske komponente, imaju značajan efekat na membrane kojima pomažu u sprečavanju fazne tranzicije iz tečno-kristalne u

heksagonal-II ili kubičnu fazu pri visokim temperaturama (Muramatsu i sar., 2000). Narayanan i sar., (2016) zbog toga predlažu korišćenje sterol-glikozida kao potencijalnih biomarkera za određivanje tolerancije prema visokim temperaturama kod pšenice. Rezultati daljeg istraživanja Narayanan i sar. (2016) su pokazali da obe sorte pšenice imaju niži sadržaj nezasićenih masti u membranama tokom toplotnog stresa, što je posledica, sa jedne strane nižeg udela polinezasićene linoleinske kiseline (18:3), a sa druge strane, višeg udela manje nezasićene oleinske 18:1 i zasićene palmitinske kiseline (16:0). Narayanan i sar. (2016), kao i drugi autori (Larkindale i Huang, 2004), su ovim pokazali da se nezasićenost membranskih lipida tokom delovanja TS-a menja što je u suštini opšti adaptacioni mehanizam biljaka na visoke temperature.

Na visokim temperaturama dolazi i do lakšeg raskidanja vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija između polarnih domena proteina u biološkim membranama, te se na taj način menja tercijarna i kvaternarna struktura proteina što dodatno narušava integritet i funkcionisanje ćelijskih membrana. Ćelijske membrane postaju manje selektivno propustljive, te dolazi do povećanog gubitka elektrolita iz ćelija. Gubitak elektrolita dobar je pokazatelj smanjene termostabilnosti ćelijskih membrana, a prvenstveno plazmaleme. Merenjem gubitka elektrolita može se odrediti stepen tolerancije prema visokim temperaturama kod različitih biljnih vrsta, što je i pokazano kod soje (Martineau i sar., 1979), krompira (Savić i sar., 2012), paradajza (Chen i sar., 1982), pšenice (Blum i sar., 2001), pamuka (Ashraf i sar., 1994), graška (Ismail i Hall, 1999), ječma (Wahid i Shabbir, 2005). Gubitak elektrolita zavisi od starosti biljaka i tkiva, izbora biljnog organa kao uzorka, razvojne faze, sezone rasta, čvrstine biljaka, kao i biljne vrste. Tako kod kukuruza, na primer, povreda plazmaleme tokom TS-a je mnogo više izražena u mladim listovima koji se razvijaju, nego u zrelih, starijim listovima (Karim i sar., 1997, 1999).

Veza između termostabilnosti ćelijskih membrana i samog prinosa biljaka u uslovima visokih temperatura zavisi od biljne vrste, te zahteva izučavanje pojedinačnih useva pre nego što se upotrebi kao važan fiziološki kriterijum selekcije. Tako na primer, kod biljke sirka postoji značajna korelacija između termostabilnosti membrana i prinosa (Sullivan i Ross, 1979), dok kod pšenice (Shanahan i sar., 1990) ili soje (Martineau i

sar., 1979), takva veza nije ustanovljena. Zbog toga, glavni uzrok(e) gubitka prinosa usled TS-a treba dodatno izučavati.

### **1.7. Uticaj visokih temperatura na fotosintezu i respiraciju**

Tokom izlaganja biljaka visokim temperaturama dolazi do remećenja metaboličkih procesa poput fotosinteze i respiracije, jer u njima učestvuju enzimi i prenosioci elektrona, koji su vezani za ćelijske membrane. Fotosinteza je posebno osetljiva prema visokim temperaturama i može predstavljati dobar indikator termotolerancije, s obzirom da pokazuje značajnu korelaciju sa rastenjem i razvićem biljaka. Tako svako ograničavanje fotosinteze može negativno uticati na produktivnost biljaka (Al-Khatib i Paulsen, 1990). Fotohemijske reakcije u membranama tilakoida i metabolizam ugljenika u stromi hloroplasta se smatraju primarnim mestima na koje utiče visoka temperatura (Wise i sar., 2004). Fotosistem II je izuzetno osetljiv na delovanje visokih temperatura koje dovode do značajnog smanjenja njegove aktivnosti, ili čak delimičnog zaustavljanja (Camejo i sar., 2005). Razlog tome, može biti narušavanja strukture tilakoidnih membrana u uslovima visokih temperatura, u kojima se ovaj fotosistem nalazi (McDonald i Paulsen, 1997). Pod uticajem visokih temperatura može doći i do disocijacije kompleksa koji razvija kiseonik (eng. „oxygen evolving complex”) sa fotosistema II i tako nastati poremećaj u transportu elektrona na ovom fotosistemu (De Ronde i sar., 2004). Visoke temperature mogu ugroziti i druge delove fotosistema II, poput D1 i/ili D2 proteina koji nose reakcioni centar (De Las Rivas i Barber, 1997). Sa druge strane, pod dejstvom visokih temperatura, fotosistem I je stabilan i na njemu se odvija cikličan transport elektrona koji doprinosi gradijentu protona na tilakoidnim mebranama, što omogućava sintezu adenzil-trifosfata (Bukhov i sar., 1999; Yang i sar., 2006; Laisk i sar., 2007). Pri visokim temperaturama smanjena je i stabilnost pojedinih enzima u hloroplastima, poput Rubisco aktivaze. Ovaj enzim učestvuje u aktivaciji Rubisco-a, tako što vrši hidrolizu adenzin-trifosfata i uklanja fosforilovane šećere iz njegovog aktivnog mesta što dalje omogućava spontanu karbamilaciju Rubisco-a (Portis, 1995; Salvucci i Ogren, 1996; Spreitzer i Salvucci, 2002). Termalna degradacija Rubisco aktivaze značajno smanjuje afinitet Rubisco-a za

CO<sub>2</sub>, što se negativno odražava na efikasnost fotosinteze i sadržaj suve materije u biljkama (Law i Crafts-Brandner, 1999).

Havaux (1993, 1995) je pokazao da temperaturni prag iznad kojeg dolazi do brzog i ireverzibilnog gubitka funkcije fotosistema II kod krompira iznosi oko 38 °C. Međutim, biljke krompira koje su prvobitno gajene na dnevnoj temperaturi od 25 °C, a potom gajene na temperaturi nešto nižoj od temperaturnog praga za fotosistem II (između 30 i 35 °C) ne pokazuje nikakve značajne promene aktivnosti fotosistema II, čak ni pri temperaturama od 40 °C. S toga se može zaključiti da se fotosistem II kod krompira dobro prilagođava na uslove TS-a.

Postoje suprotstavljena zapažanja o uticaju ograničavanja fotosinteze na prinos kod krompira. Dok su Prange i sar. (1990) i Timlin i sar. (2006) pokazali da do smanjenja fotosintetičke aktivnosti mnogo brže dolazi kod krompira na temperaturama preko 24 °C, a da se particija produkata fotosinteze do krtola obavlja optimalno pri temperaturi od 20 °C, Lafta i Lorenzen (1995) su sa druge strane pokazali da visoke temperature (31 °C tokom dana i 29 °C tokom noći) nemaju uticaja na fotosintezu ni kod sorte krompira koja je tolerantna, ni kod sorte osetljive na visoke temperature. Zajedničko za sve je da su visoke temperature uzrokovale smanjenje suve biomase krtola krompira. Ova različita zapažanja mogu biti posledica razlika u eksperimentalnim postavkama ili razlikama u genotipovima krompira koji su bili korišćeni u studijama.

Visoke temperature intenziviraju proces respiracije kod biljaka, a smanjuju fotosintetičku aktivnost. Temperatura na kojoj je količina CO<sub>2</sub> ugrađenog u organska jedinjenja u procesu fotosinteze jednaka količini CO<sub>2</sub> oslobođenog u procesu respiracije, tj. temperatura na kojoj biljka ne sintetiše organska jedinjenja, naziva se temperaturnom kompenzacionom tačkom. Na temperaturama iznad temperaturne kompenzacione tačke, rastenje i prinos biljaka znatno je smanjen, uglavnom zbog visoke potrošnje ugljenih hidrata u procesu disanja koji se fotosintezom ne mogu nadoknaditi. Kao rezultat toga, rezerve ugljenih hidrata se smanjuju (Taiz i Zeiger, 2002; Nešković i sar., 2003). Ovakav disbalans između fotosinteze i respiracije jedan je od osnovnih uzroka štetnog efekta visokih temperatura.

Stopa respiracije raste na visokim temperaturama. Visoka stopa respiracije može dovesti do poremećaja metaboličke ravnoteže ugljenih hidrata na nekoliko dana, naročito do kraja sezone, s obzirom da se smanjuje broj mladih listova. Wivutvongvana (1979) je poredila dva genotipa divljih vrsta krompira koja su se razlikovala u toleranciji prema visokim temperaturama, *S. chacoense* i *S. acauale*, u uslovima dugog dana koji ne dovodi do tuberizacije i pokazala da genotip koji je osetljiv na visoke temperature ima višu stopu respiracije u odnosu na tolerantan genotip, a da se genotipovi krompira nisu razlikovali u stopi usvajanja CO<sub>2</sub> tokom fotosinteze. Ovaj rezultat ukazuje na to da tolerancija prema visokim temperaturama kod krompira može biti povezana više sa razlikama u respiraciji nego u fotosintezi.

Kao posledica remećenja elektron transportnog lanca u hloroplastima i mitohondrijama usled delovanja visokih temperatura, dolazi do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. „reactive oxygen species“) u biljnim ćelijama (Bhattacharjee i Mukherjee, 1998; Liu i Huang, 2000; Narayanan i sar., 2015). Povećana koncentracija ROS u ćelijama dovode do oksidativnog stresa i obavljaju autokatalitičku peroksidaciju membranskih lipida, te nastaju oksilipidi zbog kojih se narušava integritet membrana i povećava njihova propustljivost (Sun i sar., 2000; Zoeller i sar., 2012). Reaktivne kiseonične vrste mogu značajno uticati i na pigmente, enzime i nukleinske kiseline, modifikujući njihovu strukturu i funkciju (Møller i sar., 2007).

### **1.8. Uticaj visokih temperatura na particiju asimilata kod krompira**

Particija asimilata kod biljaka predstavlja rezultat usklađenog skupa transportnih i metaboličkih procesa koji regulišu tok asimilata od organa izvora do organa akceptora. Aktivnosti ovih procesa su dinamične i mogu se menjati dnevno, kao i tokom rastenja i razvića biljaka (Patrick, 1988). Tako na primer kod krompira tokom ranih faza razvića veći deo suve materije je raspoređeno u listovima i stablu (Jenkins i Mahmood, 2003), dok se u kasnijim fazama najveći deo ovih materija transportuje u krtole, nakon njihove inicijacije. Asimilati se mogu skladištiti ili transportovati od izvora do različitih drugih organa putem floema. Često se smatra da je kretanje asimilata kroz floem biljaka

pasivan proces vođen gradijentom hidrostatičkog pritiska i osmotskog potencijala između organa izvora i akceptora (Ho, 1979a, 1979b; Wolswinkel, 1985; Lang i Thorpe, 1986; Patrick, 1988; Lang i Daring, 1991). Korišćenje i skladištenje asimilata u akceptorskim organima je od velikog značaja za održavanje ovog gradijenta. Kontrola transporta može biti na nivou izvora, akceptora i/ili floema. Ipak, nekoliko autora je naznačilo da na particiju asimilata do organa akceptora, utiču sami organi akceptori (Evans, 1975; Gifford i Evans, 1981; Farrar, 1988; Verkleij i Challa, 1988).

Radi postizanja optimalnog prinosa kod krompira, neophodna je veća stopa nalivanja krtola, kao i njegovo duže trajanje (Struik i sar., 1989). Umereni temperaturni režim može favorizovati veću particiju suve materije u krtole krompira i smanjiti rastenje nadzemnog dela biljke. Sa suprotne strane, visoka temperatura favorizuje particiju asimilata u nadzemne delove krompira, podstičući njihovo rastenje, a smanjuje u krtolama (Ewing i Struik, 1992; Levy i Veilleux, 2007). Zbog toga dolazi do redukcije broja krtola većih veličina (Lafta i Lorenzen, 1995). Jenkins i Mahmood (2003) su utvrdili da temperature iznad 23 °C favorizuju raspodelu suve materije u listove krompira na račun rasta krtola.

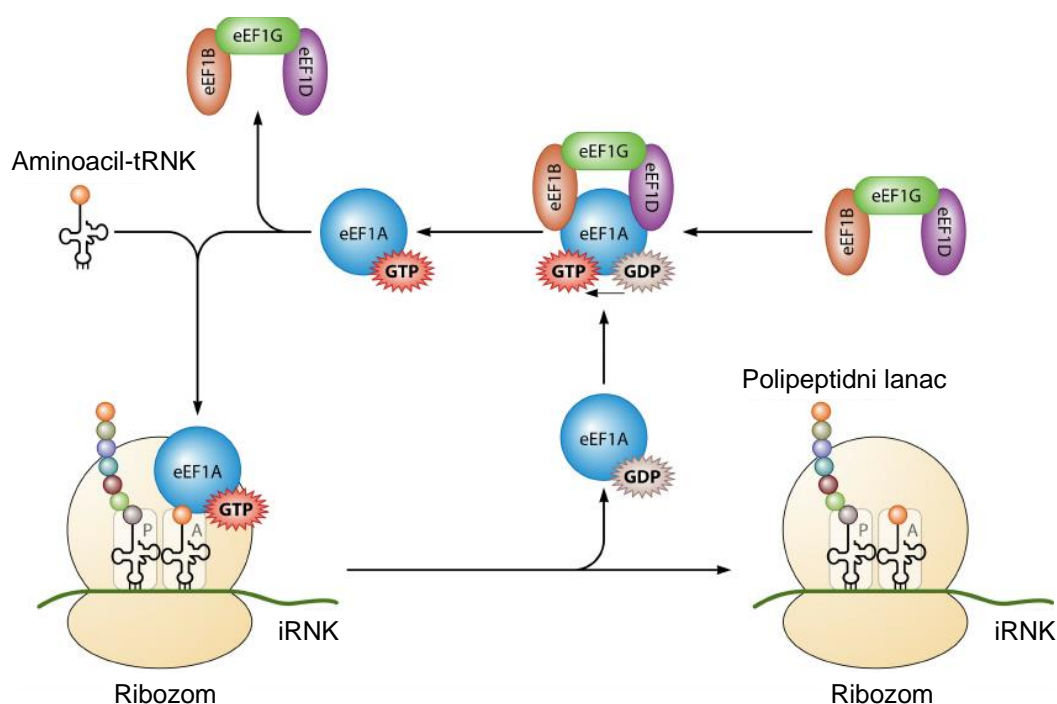
Visoke temperature mogu dovesti do remećenja metaboličke ravnoteže kod krompira, najverovatnije preko regulatora rasteња, enzima i drugih biohemijskih procesa (Ewing, 1981). Krauss (1978) i Krauss i Marshner (1982) su pokazali da visok odnos giberelina (GA)/apscisinske kiseline (ABA) podstiče rastenje i razviće izdanaka, a inhibira rast krtola, dok relativno niži odnos ovih regulatora rasteња ograničava rastenje izdanaka, a promovise rastenje krtola kod krompira. Inhibitorski efekat visoke temperature na inicijaciju i rastenje krtola kod krompira, može biti rezultat povećane koncentracije endogenog GA koji izaziva izduživanje nadzemnog izdanka i povećava particiju ugljenih-hidrata prema onim delovima biljke koji se izdužuje (Booth i Lovell, 1972; Mares i sar., 1981; Menzel, 1983). Korišćenjem transgenog krompira kod kojeg je povećana ekspresija transkripcionog faktora POTH1 koji kontroliše sintezu GA i povećava tuberizaciju, potvrđen je značaj GA u regulaciji procesa tuberizacije (Hannapel i sar. 2004). Prethodno su Xu i sar. (1998a) pokazali da istovremeno sa formiranjem novih krtola, dolazi do smanjenja GA u vrhovima stolona koje može biti i

do 50 puta. Ovo smanjenje se može objasniti vezom između visoke koncentracije solubilnih šećera u vrhovima stolona i formiranja krtola kod krompira u uslovima koji favorizuju tuberizaciju. Naime, šećeri potpomažu inicijaciju i rast krtola tako što dovode do smanjenja nivoa endogenog GA u vrhovima stolona, što govori o njegovom značaju u procesu tuberizacije (Xu i sar., 1998a). Zbog toga se i u medijum koji se koristi za tuberizaciju u uslovima *in vitro*, dodaje veća količina šećera (Lawrence i Barker 1963; Harmey i sar., 1966; Wang i Hu 1982; Levy i sar., 1993). Još jedan dokaz o važnosti GA u procesu tuberizacije su obezbedili Mares i sar. (1981). Naime, oni su primenili egzogeno giberelnu kiselinu (GA<sub>3</sub>) dodavajući je na vrh stolona na približno 1 cm od krtola koje su se razvijale. Već nakon 2-4 dana tretmana, Mares i sar (1981) su detektovali da je došlo do značajnog ulaska GA<sub>3</sub> u tkivo krtola. Ovaj visok nivo GA<sub>3</sub> u krtolama, doveo je do redukcije aktivnosti enzima ADP-glukoza-pirofosforilaze koji je uključen u sintezu skroba, što je usporilo ili zaustavilo rastenje krtola. Pored toga, GA<sub>3</sub> je dovela i do razvoj novih stolona iz okaca na krtolama, što ide u prilog da GA podstiče rastenje izdanaka (Mares i sar., 1981).

Saharoza predstavlja glavni transportni oblik šećera kod većine biljaka. U uslovima visokih temperatura, dolazi do povećane aktivnosti saharoze-fosfat-sintaze (SPS) u listovima (Aien i sar., 2011) i smanjene aktivnosti saharoze-sintaze (SS) u krtolama krompira (Lafta i Lorenzen, 1995). Saharoza-fosfat sintaza utiče na particiju fotoasimilata, tako što katališe sintezu saharoze (Huber i Israel, 1982; Lalonde i sar., 1999), dok sa druge strane enzim SS u krtolama predstavlja katalitički enzim koji razgrađuje saharozu i određuje sadržaj skroba u krtolama i totalni prinos kod krompira (Baroja-Fernández i sar., 2009). Aktivnost ova dva enzima utiče na koncentraciju saharoze na dve suprotne strane floema (listovi-krtole), te tako menjaju gradijent osmotskog potencijala na nivou cele biljke i određuju smer kretanje saharoze kroz floem. Zbog toga, nadzemni deo biljke krompira, u uslovima visokih temperatura postaje dominantan akumulator fotosintata, umesto krtole (Basu i Minhas, 1991).

### 1.9. Elongacioni faktor translacije 1A (eEF1A)

Eukariotski elongacioni faktor translacije 1A (eEF1A) predstavlja od 3-10% ukupnih solubilnih proteina, te se može smatrati jednim od najzastupljenijih solubilnih citoplazmatičnih proteina u ćeliji (Merrick, 1992). eEF1A nije samo glavni faktor u sintezi proteina (**Slika 4.**), već je i jedan od najznačajnijih multifunkcionalnih proteina u ćeliji, te tako učestvuje i u eksportu molekula iz nukleusa, organizaciji citoskeleta, a ima i proteolitičku ulogu i ulogu molekularnog šaperona (Ejiri, 2002).



**Slika 4.** Uloga eEF1A u elongacionoj fazi sinteze proteina. Modifikovano po Li i sar., (2013).

Elongaciona faza sinteze proteina kod eukariota se odigrava kroz sledeće faze:

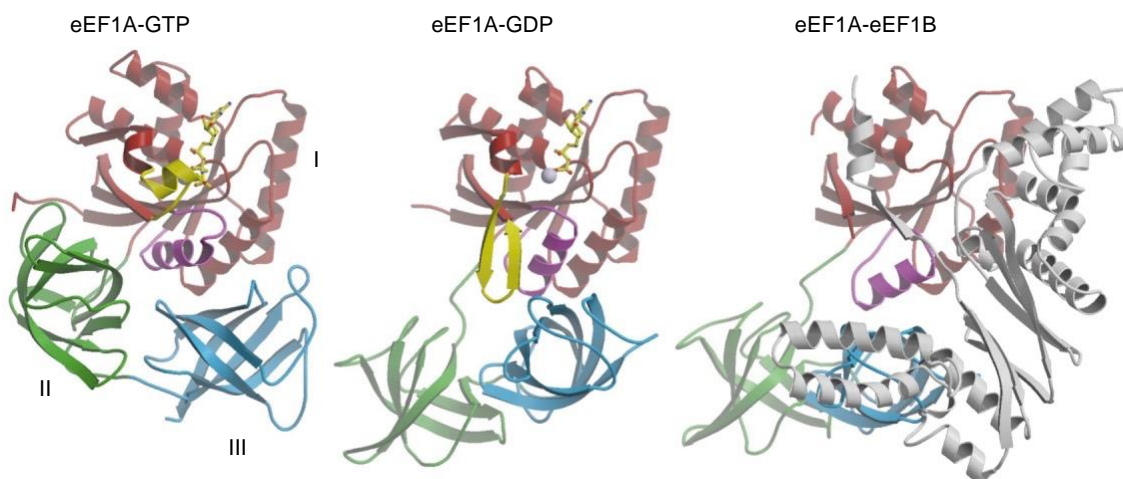
1. eEF1A vezuje GTP i aminoacil-tRNK, i transportuje je do mesta A na ribozomima; pravilno sparivanje kodon/antikodon aktivira GTPaza centar u ribozomima što dovodi do hidrolize GTP-a i konformacione promene eEF1A koji se zatim kao eEF1A-GDP oslobađa sa ribozoma.



2. eEF1B kompleks (eukariotski guanin-nukleotidni faktor zamene) pomaže zamenu GDP-a za GTP na eEF1A-GDP. Ovaj kompleks se sastoji od tri subjedinice  $\beta$ ,  $\beta'$  i  $\gamma$  (označavaju se i kao eEF1B, eEF1D i eEF1G).
3. Nakon što se uspostavi peptidna veza koju katališu ribozomi, eEF2 (eukariotski elongacioni faktor 2) omogućava pomeranje peptidil-tRNK sa A mesta na mesto P u ribozomima, te na taj način A mesto može da primi novu aminoacil-tRNK (Browning, 1996; Li i sar., 2013).

### 1.9.1. Struktura eEF1A

Eukariotski EF1A je izgrađen od jednog polipeptidnog lanca koji sadrži od 390-460 aminokiselina organizovanog u tri domena (**Slika 5.**).



**Slika 5.** Struktura eEF1A. Domen I eEF1A je crvene, domen II je zelene, a domen III je plave boje. eEF1B je sive boje. Guanin-nukleotidi su prikazani u formi kuglice i štapića. Preuzeto iz Andersen i sar. (2003) i modifikovano.

Prvi domen eEF1A, domen I ili G domen, predstavlja N-terminalni deo molekula sačinje od oko 200 aminokiselina. To je ujedno i katalitički domen, koji uključuje vezujuće mesto za guanin nukleotide, GTP ili GDP. Ovaj domen ima istu strukturu kao i G domen drugih G proteina u ćeliji. Druga dva domena, domen II i domen III, sadrže približno 100 aminokiselima i oba su  $\beta$ -nabrane strukture i nemaju

katalitičku aktivnost (Berchtold i sar., 1993; Andersen, 2003). Opšta karakteristika ovog elongacionog faktora kod svih organizama, jeste da prolazi kroz velike konformacione promene između svojih aktivnih i neaktivnih oblika u zavisnosti od toga da li je vezan GTP ili GDP (Abel, 1996; Andersen i sar., 2003). Naime, nakon hidrolize GTP-a, dolazi do rotacije domena I, koji se tako udaljava od domena II i III, što prouzrokuje otvorenu konformaciju elongacionog faktora. Domeni II i III se drže zajedno u istoj orijentaciji i deluju kao jedna rigidna funkcionalna jedinica (Andersen i sar., 2003). Domen II je uključen u vezivanje aminoacil tRNK i zajedno sa domenom I, interaguje sa faktorom zamene guanin-nukleotida, eEF1B, koji regeneriše eEF1A, i vraća ga u početnu aktivnu konformaciju (Kawashima i sar., 1996; Wang i sar., 1997; Andersen i sar., 2003).

Kod eukariotskih organizama, eEF1B je kompleksan protein sastavljen od više različitih subjedinica. Kod biljaka, eEF1B čine  $\beta$ ,  $\beta'$  i  $\gamma$  subjedinice (Ejiri, 1986; Ejiri, 2002). Subjedinice  $\beta$  i  $\beta'$  katališu GDP/GTP nukleotidnu zamenu (Ejiri, 1986; Kamiie i sar., 1999), dok je za subjedinicu  $\gamma$  pokazano da ima ulogu enzima glutation S-transferaze (Koonin i sar., 1994).

### **1.9.2. Uticaj abiotičkog stresa na ekspresiju *eEF1A* gena**

Biljke obično poseduju veći broj gena koji kodiraju eEF1A nego životinje. Ovi geni čine familiju gena koja se sastoji od četiri kopije kod pirinča (Kidou i Ejiri, 1998) i *Arabidopsis thaliana* (Axelos i sar., 1989), četiri do osam kopija kod paradajza (Pokalsky i sar., 1989), devet kod pamuka (Xu i sar., 2007), deset do petnaest kod kukuruza (Carneiro i sar., 1999) i do dvadeset kopija gena kod šećerne repe (Vijaykumar i sar., 2002). Aminokiselinske sekvence proteina eEF1A su kod biljnih vrsta veoma konzervativne (Axelos i sar., 1989; Kidou i Ejiri, 1998; Xu i sar., 2007). Tri od četiri eEF1A gena kod *A. thaliana* su organizovani u klasteru smešteni u regionu od 10 kb i kodiraju identične proteine (Axelos i sar., 1989). Za razliku od životinja, biljke ne pokazuju izraženu tkivno-specifičnu ekspresiju *eEF1A* gena, te sama funkcija većeg broja kopija gena ostaje nerazjašnjena.

Ekspresija gena koji kodira eEF1A, može biti izmenjena različitim stimulusima iz spoljašnje sredine. Rezultati Bukovnik i sar. (2009) pokazuju da kod jare pšenice, nakon izlaganja TS-u dolazi do povećane ekspresije eEF1A i njegovog homologa u plastidima, EF-Tu. Značajno povećanje ekspresije gena koji kodiraju eEF1A je zabeleženo i kod pirinča nakon izlaganja klijanaca suši, solima, niskim i visokim temperaturama (Ziyin i Shouyi, 1999). Ranija istraživanja su pokazala da kod ječma i kukuruza stres niskom temperaturom može da indukuje ekspresiju eEF1A (Dunn i sar, 1993; Berberich i sar., 1995). U ćelijskoj kulturi krompira, dolazi do povećane zastupljenosti eEF1A transkripta kada se ćelije izlože osmotskom stresu posredstvom polietilen glikola i visoke koncentracije soli (Costa i sar., 2010). Takođe, *eEF1A* geni su identifikovani i kao jedni od najranije indukovanih gena u ćelijama krompira kao odgovor na vodni deficit (Ambrosone i sar., 2013). Kao dodatak, sprovedene proteomske analize abiotički stres-inducibilnih proteina kod biljaka, često otkrivaju elongacione faktore kao pozitivno regulisane proteine (Cui i sar., 2005; Lee i sar., 2007; Ge i sar., 2007; Cui i sar., 2009; Folgado i sar., 2013).

### **1.9.3. Posttranslacione modifikacije eEF1A i regulacija aktivnosti**

Različite posttranslacione modifikacije elongacionog faktora 1A su dokumentovane i uključuju fosforilaciju, metilaciju, metilesterifikaciju, acetilaciju i specifičnu glicerilfosforiletanolamin modifikaciju (Laursen i sar., 1981; Dever i sar., 1989; Ransom i sar., 1998; Kraal i sar., 1999; Zobel-Thropp i sar., 2000; Kunze i sar., 2004). Kod eukariotskih organizama, fosforilaciju aminokiselinskih ostataka u eEF1A obavljaju brojne serin/treonin proteinske kinaze (Sasikumar i sar., 2012). Jedna takva kinaza, zečja kinaza C (PKC, eng. „Proteine Kinase C“), koja je ključni promoter ćelijske proliferacije i diferencijacije i ima značajnu ulogu u imunom odgovoru, vrši fosforilaciju hidroksilnih grupa serinskih i treoninskih aminokiselinskih ostataka eEF1 subjedinicama, eEF1A i eEF1B, i na taj način stimuliše nukleotidnu zamenu GDP/GTP i povećava elongacionu aktivnost i do 2,2 puta (Venema i sar., 1991; Peters i sar., 1995).

Za adaptaciju na visoke temperature veoma je važan uticaj kalcijuma ( $Ca^{2+}$ ), koji se nalazi u ćeliji. Visoke temperature menjajući propustljivost membrana za pojedine

jone, povećavaju koncentraciju intraćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  (Gong i sar., 1998). U putu unutarćelijskog prenosa signala posredstvom jona  $\text{Ca}^{2+}$ , dolazi do njegovog vezivanja za kalcijum-vezujući protein kalmodulin, čime se formira  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin kompleks koji dalje aktivira kalcijum-zavisne proteinske kinaze (CaM kinaze) (Knight, 1999). Ova serin/treonin specifična kinaza vrši fosforilaciju različitih proteina, uključujući i eEF1A (Wang i Poovaiah, 1999; Izawa i sar., 2000). Kod ljljana, thr257 predstavlja mesto fosforilacije koje je smešteno u tRNK-vezujućem regionu LIEF1 $\alpha$ 1, homologa eEF1A (Wang i Poovaiah, 1999). Protein eEF1A je takođe i supstrat drugih serin/treonin specifična kinaza, kao što je Ro-vezana kinaza (Izawa i sar., 2000). Ro kinaza direktno fosforiliše eEF1A, što je pokazano u *in vitro* esejima sa rekombinantnim eEF1A kao supstratom (Izawa i sar., 2000). Fosforilacija posredstvom Ro kinaza dovodi do smanjenog vezivanja, kao i smanjenja aktivnosti za vezivanje eEF1A za F-aktin, čime se sugeriše da na ovaj način Ro kinaze regulišu organizaciju aktinskog citoskeleta (Izawa i sar., 2000).

#### **1.9.4. Uloga eEF1A u eksportu molekula iz nukleusa**

Transport RNK molekula i proteina u/iz nukleusa se obavlja posredstvom specifičnih proteina eksportina koji su zavisni od svojih kofaktora, GTPaza. Međutim, u nekoliko studija se navodi da i eEF1A učestvuje u ovom procesu. Istraživanja na mutantima kvasca koji su nosili letalnu mutaciju u *LOS1* genu koji kodira za eksportin Los1p, su pokazala da nije došlo do značajnog uticaja na eksport tRNK iz nukleusa (Grosshans i sar, 2000a). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da postoji alternativni put transporta, a eEF1A je identifikovan kao neophodni faktor koji olakšava eksport tRNK iz nukleusa. Dalja istraživanja na mutantima kvasca koji su imali smanjenu ekspresiju eEF1A ili su nosili mutacije blizu vezujućeg mesta (Glu268Lys ili Glu291Lys) na eEF1A za aminoacil i aminoacil-tRNK (aa-tRNK) pokazuju smanjeni eksport tRNK iz nukleusa, kao i akumulaciju aa-tRNK u nukleusu (Grosshans i sar., 2000a; Grosshans i sar., 2000b). Eksport tRNK je takođe bio smanjen i u uslovima smanjene tRNK aminoacilacije, što vodi ka zaključku da su tRNK aminoacilacija i eEF1A neophodni za eksport tRNK iz nukleusa kod kvasca. Tako, formiranje ternarnog kompleksa eEF1A-

GTP-aa-tRNK može biti značajno ne samo za citosolni transport aa-tRNK do ribozoma, već i za eksport iz nukleusa i sprečavanje vraćanja aa-tRNK u nukleus.

### **1.9.5. Uloga eEF1A u organizaciji citoskeleta**

Otkriveno je da postoji fizička veza između komponenti citoskeleta i nekoliko tipova translacionih efektor, poput aminoacil-tRNK sintaze (Mirande i sar., 1985), eukariotskih inicijacionih faktora (Howe i Hershey, 1984; Heuikerjans i sar., 1989; Pincheira i sar., 2001; Carotenuto i sar., 2005) i eukariotskih elongacionih faktora (Bektaş i sar., 1994; Furukawa i sar., 2001; Gross i Kinzy, 2005; Kim i sar., 2007a). Aktinski filamenti (F-aktin) se predlažu kao glavni citoskeletni elementi koji učestvuju u organizaciji mašinerije za sintezu proteina (Stapulionis i sar., 1997; Morelli i sar., 1998; Gross i Kinzy, 2007). Prvobitno je identifikovana interakcija između eEF1A i F-aktina kod sluzave gljive *Dyctiostelium sp.* (Yang i sar., 1990), a onda i kod niza drugih vrsta, počev od kvasaca, pa sve do biljaka i životinja (Edmonds i sar., 1996, 1998; Suda i sar., 1999; Munshi i sar., 2001; Lopez-Valenzuela i sar., 2003; Gross i Kinzy, 2005). *In vitro* studije su pokazale da ne samo da se eEF1A vezuje za aktinske filamente, već ima i ulogu u povezivanju F-aktina i formiranju snopova aktinskih filamenata (Owen i sar., 1992). Sa druge strane, vrlo verovatno i sam aktin utiče na funkcionisanje eEF1A (Owen i sar., 1992). Liu i sar. (1996) su pokazali u svojim *in vitro* studijama da GTP nije potreban da bi se eEF1A vezao za aktin, kao i da F-aktin sprečava vezivanje aa-tRNK za eEF1A. Zbog toga je moguće postojanje dve forme eEF1A u ćelijama: translaciono aktivna GTP-vezana forma i translaciono neaktivna F-aktin-vezana forma. Uzimajući u obzir da se vezujuće mesto za eEF1B na eEF1A preklapa sa mestom za aminoacil-tRNK (Andersen i sar., 2000), a i da se aktin verovatno vezuje za isto mesto na eEF1A, nije bilo iznenađujuće da se vezivanje eEF1A za eEF1B i F-aktin takođe međusobno isključuju (Pittman i sar., 2009). Sve zajedno ukazuje na mogućnost za recipročnu regulaciju dva ćelijska procesa, translaciju proteina i organizaciju aktinskih filamenata, koja se zasniva na stehiometrijskom odnosu između eEF1A, aa-tRNK, eEF1B i F-aktina u živim ćelijama (Kim i Coulombe, 2010).

Postoje izveštaji i o tome da eEF1A učestvuje i u organizaciji mikrotubula tokom ćelijskog ciklusa, ali tačna uloga ostaje još uvek neodređena. Eksperimenti na šargarepi u *in vitro* uslovima, su pokazali da eEF1A može da se veže, kao i da stabilizuje mikrotubule u  $Ca^{2+}$ /kalmmodulin zavisnom maniru (Durso i Cyr, 1994).

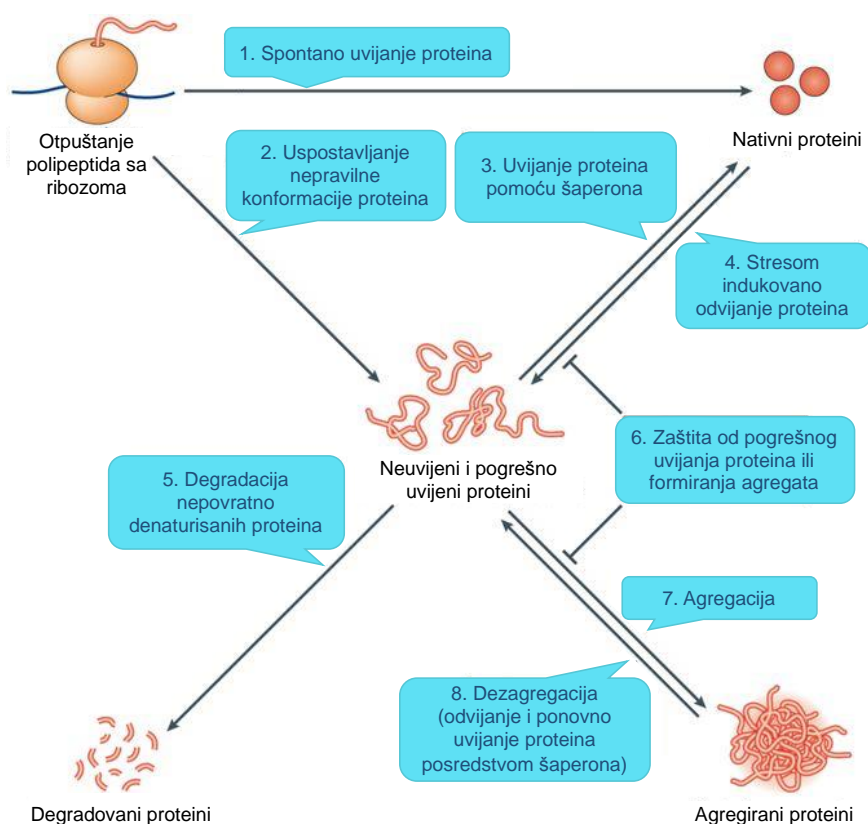
### **1.9.6. Proteolitička uloga eEF1A**

Iako se čini kontradiktornim, eEF1A može imati značajnu ulogu i u degradaciji proteina, pored svoje osnovne uloge u sintezi proteina. Gonen i sar. (1994) su predložili da aktivnost eEF1A u procesu sinteze proteina i putu njihove degradacije zavisi od zasićenosti elongacionog faktora sa aa-tRNK. Tokom faze brze sinteze proteina, eEF1A je uglavnom povezan sa GTP-om i aa-tRNK, čime se inaktivira proces degradacije proteina. U uslovima stresa, međutim dolazi do opadanja nivoa aa-tRNK i eEF1A postoji uglavnom u apoproteinskoj formi koja je aktivna u proteolizi.

Dobro je poznato da se nesavijeni ili oštećeni proteini popravljaju nakon translacije od strane molekularnih šaperona ili se markiraju za degradaciju koju obavljaju proteini, proteaze. Ipak, znatan deo oštećenih, novosintetisanih proteina u eukariotskim ćelijama biva obeleženo ubikvitinom još tokom sinteze na ribozomima, a njihova degradacija se obavlja kotranslaciono. Chuang i sar. (2005) su pružili *in vivo* dokaze o mogućoj ulozi eEF1A u degradaciji kotranslaciono-oštećenih proteina posredstvom proteaza. U ovoj studiji je pokazano da eEF1A potiskuje defektni rast kvasca koji nosi delecije gena *Rad23* i *Rpn10* značajnih u proteolitičkom putu. Ustanovljeno je da eEF1A interaguje sa proteinima označenim ubikvitinom i proteazomskom subjedinicom Rpt1, te tako zamenjuje aktivnost Rad23 i Rpn10 u prepoznavanju označenih proteina. Način delovanja eEF1A se malo razlikuje od Rad23 i Rpn10. Dok se eEF1A vezuje za oštećene proteine koji nose poliubikvitinske lance, Rad23 i Rpn10 interaguju sa poliubikvitinskim lancima. Autori su takođe pokazali i da eEF1A interaguje specifično sa nascentnim proteinima koji su označeni ubikvitinom nakon oštećenja posle translacije, što govori o ulozi eEF1A u kontroli kvaliteta novosintetisanih proteina.

### 1.9.7. Šaperonska uloga eEF1A

Pravilno funkcionisanje proteoma zavisi od ravnoteže procesa sinteze, uvijanja i degradacije proteina u ćelijama. Ćelije poseduju veliku mrežu proteina koji su prisutni da održavaju homeostazu drugih proteina. Jedna značajna grupa proteina koja je uključena u regulaciji kvaliteta proteoma obuhvata molekularne šaperone (**Slika 6.**). Ova grupa omogućava efikasnije prostorno uvijanje primarnog polipeptidnog lanca u pravilnu trodimenzionalnu strukturu, udruživanje proteina u kvaternarnu strukturu, učestvuje u procesu translokacije proteina, ali i pomaže proces degradacije proteina (Mayer, 2010; Lindquist i Kelly, 2011; Priya i sar., 2013). Šaperoni su u ćelijama izuzetno zastupljeni, a za mnoge od njih se nivo ekspresije dodatno povećava u uslovima stresa. Šaperoni utiču na skoro sve ćelijske funkcije i nalaze se u većini kompartmenata, poput citoplazme, periplazme, mitohondrija, endoplazmatičnog retikuluma i hloroplasta.



**Slika 6.** Uloga molekularnih šaperona. Preuzeto iz Doyle i sar. (2013) i modifikovano.

Nakon translacije proteina, neki spontano zauzimaju ispravnu konformaciju (1). Međutim, u toku prelaska iz forme otvorene i fleksibilne strukture polipeptida u formu sa konačnom trodimenzionalnom strukturom, javljaju se intermedijarne forme proteina koje ne pokazuju biološku aktivnost (2). Molekularni šaperoni prepoznaju takve proteine i pomažu im da zauzmu ispravnu, funkcionalnu konformaciju (3). U uslovima stresa česta je pojava da se već pravilno savijeni proteini parcijalno odmotavaju (4), te molekularni šaperoni sprečavaju ovaj proces (6). Proteini koji denaturišu na visokim temperaturama, izlažu hidrofobne regione i formiraju velike, amorfne agregate u ćelijama radi smanjenja ukupne površine koja je izložena vodi (7). Molekularni šaperoni, interagujući sa hidrofobnim regionima denaturisanih proteina, privremeno sprečavaju formiranje ovih proteinskih agregata (6), a takođe mogu vršiti i disagregaciju već formiranih proteinskih agregata (8) dajući im novu šansu da se ponovo uviju u biološki aktivan oblik. Na kraju, molekularni šaperoni omogućavaju i degradaciju nepovratno denaturisanih proteina (5) (**Slika 6.**).

Istraživanja Hotokezaka i sar. (2002) su pokazala da deo eEF1A distalno od peptidiltransferaza centra interaguje sa nesavijenim polipeptidnim lancima, kao i da eEF1A ne interaguje sa pravilno savijenim proteinima. Mesto-specifična mutageneza u domenu I eEF1A koji je značajan za vezivanje GTP-a i čija je uobičajena uloga u sintezi proteina, nije potisnula šaperonsku ulogu eEF1A (Shin i sar., 2009). Shin i sar. (2009) su dalje pokazali da delecije delova N- i C-terminalnih krajeva AtEF1A dovode do značajnog povećanja šaperonske aktivnosti u odnosu na šaperonsku aktivnost celog AtEF1A ili sa deletiranim nekim drugim delovima AtEF1A. Eksperimenti sa delecijama delova eEF1A su pokazali da je domen II eEF1A ključan za njegovu šaperonsku aktivnost (Shin i sar., 2009).

### **1.9.8. Uloga eEF1A u procesu rastjenja i razvića biljaka**

Veoma malo se zna o ulozi eEF1A u procesu rastjenja i razvića biljaka. Istraživanja na kukuruzu, *A. thaliana* i pamuku su pokazala da se ceo set gena koji kodiraju eEF1A eksprimira u mladom tkivu koje se razvija, u kojem je inače i viši nivo sinteze proteina. Međutim, u par studija je pokazano da ekspresija gena koji kodiraju



eEF1A može varirati tokom procesa rastenja i razvića biljaka (Xu i sar., 2007; Suhandono i sar., 2014). Istraživanja na biljci banana, *Musa acuminata* L. sorti Brazilian koja pripada grupi AAA, su pokazala da je ekspresija gena *MaEF1A* veoma visoka kada dolazi do brzog uvećanja ploda, što ukazuje na značajnu ulogu eEF1A u ovoj fazi rastenja i razvića biljke (Liu i sar., 2016). Kako je dalje ustanovljeno da je ovaj protein kodiran *MaEF1A* genom uglavnom lokalizovan u nukleusu, to nagoveštava na moguću ulogu eEF1A i u regulaciji samog procesa rastenja i razvića kod biljke banane (Liu i sar., 2016). Ovo je interesantan nalaz za eEF1A koji se smatra citosolnim proteinom. Dalja istraživanja na transgenim biljkama *A. thaliana* kod kojih je prekomerno ekspimiran gen *MaEF1A* iz banane su pokazala da je kod ovih biljaka pospešeno rastenje i razviće, koje se odražavalo kroz veću visinu biljaka, dužinu korenova i svežu masu u odnosu na netransformisane biljke (Liu i sar., 2016). Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je uočeno da su ćelije transformisanih biljaka *A. thaliana* bile duže i šire u odnosu na ćelije netransformisanih biljaka, što ukazuje da je povećani rast ovih biljaka bio posledica uvećanja ćelija na koje je uticala povećana zastupljenost eEF1A.

### **1.10. Proteini toplotnog stresa**

Proteini toplotnog stresa, HSP (eng. „Heat-Shock Protein“) su molekularni šaperoni prisutni u svim živim organizmima, od bakterija do ljudi. Sinteza HSP-a se kod različitih biljnih vrsta odigrava kada se izlože temperaturi koja je za 10-15 °C viša od optimalne temperature za rastenje i razviće (Cooper i Ho, 1983; Kanabus i sar., 1984; Kee i Nobel, 1986; Mansfield i Key, 1988; Singla i Grover, 1994; Cordewener i sar., 1995; Waters i sar., 1996). Izuzetno važan odgovor biljaka na TS je i brza sinteza HSP-a, zbog čega se mogu koristiti kao marker proteini za TS kod biljaka (Sullivan i sar., 1990; Jespersen i sar., 2017). Indukcija sinteze HSP-a se odvija paralelno sa povećanjem temperature, a specifičnost odgovora biljaka na TS leži u činjenici da visoke temperature indukuju ekspresiju čitavog komplementa (grupe) HSP-a.

Proteini toplotnog stresa najčešće se klasifikuju na osnovu svojih molekularnih težina, homologije aminokiselinskih sekvenci i funkciji. Prema molekularnoj težini, ovi

proteini se mogu podeliti u dve glavne klase. Prva klasa obuhvata proteine većih molekularskih masa i označava se kao HMM (eng. „High Molecular Mass“), a uključuje sledeće familije proteina: HSP100/Clp (100 kDa), HSP90 (90 kDa), HSP70/DnaK (70 kDa) i HSP60/GroEL (60 kDa) (dati su različiti nazivi kod eukariotskih/prokariotskih organizama). Druga klasa proteina TS-a označava se kao LMM (eng. „Low Molecular Mass“) i obuhvata familiju proteina manjih molekularskih masa (12-40 kDa) ili „small heat-shock“ proteine (sHSP) (Vierling, 1991; Wang et al., 2004; Wahid et al., 2007). Pored navedenih glavnih familija HSP-a, postoje i drugi proteini sa sličnim funkcijama molekularnih šaperona koji pomažu uvijanje proteina, poput kalneksina ili kalretikulina u endoplazmatičnom retikulumu (Boston i sar., 1996; Helenius i sar., 1997; Crofts i Denecke, 1998).

#### **1.10.1. Familija HSP100**

Članovi familije HSP100 su u biljnim ćelijama konstitutivno eksprimirani, ali je njihova ekspresija regulisana, kako stadijumom razvića biljaka (Sanchez i Lindquist, 1990; Singla i sar., 1998; Nieto-Sotelo i sar., 2002), tako i različitim stresogenim faktorima (Sanchez i sar., 1992; Campbell i sar., 2001; Carr i sar., 2006). Jedinствena funkcija HSP100 proteina jeste u reaktivaciji agregiranih proteina resolubilizacijom nefunkcionalnih proteinskih agregata (Parsell i Lindquist, 1993) i takođe pomažu u uklanjanju ireverzibilno oštećenih polipeptida (Bösl i sar., 2006; Kim i sar., 2007b). Članovi ove familije pripadaju velikoj AAA<sup>+</sup> (ATP-aze povezane sa različitim ćelijskim aktivnostima) superfamiliji proteina. Visokom temperaturom indukovana ekspresija ovih proteina je fenomen koji je ostao sačuvan tokom evolucije od prokariotskih mikroba, pa sve do viših biljaka, ali ne i kod životinja i ljudi (Zolkiewski i sar., 2012). Razlog je verovatno što ljudi i životinje mogu fizički da izbegnu uslove koji dovode do TS-a.

#### **1.10.2. Familija sHSP**

Više biljke karakteriše prisustvo najmanje 20 tipova sHSP-a, ali neke vrste mogu da sadrže čak i 40 tipova ovih proteina (Vierling, 1991). Obično se ne mogu detektovati

u ćelijama pod normalnim fiziološkim uslovima, a njihovu ekspresiju mogu izazvati različiti stresni uslovi (Löw i sar., 2000; Hamilton i Heckathorn, 2001; Scharf i sar., 2001; Zhang i sar., 2008). U odsustvu spoljašnjih faktora koji dovode do stresnog stanja, produkcija sHSP-a je ograničena na pojedine faze razvića, kao što su embriogeneza, klijanje, obrazovanje polena i sazrevanje plodova (Sun i sar., 2002). Proteini koji pripadaju familiji sHSP-a se mogu podeliti u nekoliko klasa na osnovu lokalizacije u ćelijama i homologije u DNK sekvencama (Sun i sar., 2002). Dve klase lokalizovane su u citoplazmi (klase I i II), a ostale klase lokalizovane su u plastidima (klasa III), endoplazmatičnom retikulumu (klasa IV), mitohondrijama (klasa V), i membranama (klasa VI) (Vierling, 1991; Waters i sar., 1996; Sun i sar., 2002).

Mali HSP-i predstavljaju prvu liniju odbrane u ćeliji kada pod uticajem stresa započinje i proces odvijanja proteina (Waters, 2012). Uloga ovih proteina jeste da se vežu za delimično denaturisane proteine i spreče njihovu agregaciju (Sun i sar., 2002). To su molekularni šaperoni koji su nezavisni od ATP-a, sa funkcijom vezivanja za delimično denaturisane proteine putem hidrofobnih interakcija (Miernyk, 1999; Lee i Vierling, 2000). Ovi proteini ne interaguju sa nativnim proteinima, kao ni sa potpuno denaturisanim prteinima (Treweek i sar., 2000). Supstrati mogu biti od peptida, pa sve do oligomernih proteina, pri čemu se sHSP-i vezuju bez obzira na njihovu aminokiselinsku sekvencu ili strukturnu specifičnost. Sami sHSP-i ne mogu da renaturišu denaturisane proteine, već u saradnji sa drugim ATP-zavisnim šaperonima im pomažu da se pravilno uviju i steknu funkcionalnu konformaciju. Pored toga, sHSP-i mogu učestvovati i u degradaciji denaturisanih proteina, takođe posredstvom ATP-zavisnih šaperona (Veinger i sar., 1998; Mogk i sar., 2003).

Nivo akumulacije sHSP-a u ćelijama zavisi od temperature i od dužine trajanja stresnog perioda (Sun i sar., 2002). Već na samom početku od izlaganja biljaka visokim temperaturama, se može detektovati transkripcija gena za sHSP-e (DeRocher i sar., 1991). Maksimum transkripcije gena za sHSP-e se obično postiže za sat do dva nakon izlaganja biljaka TS-u, posle čega taj nivo opada, dok sHSP-i koji su se sintetisali tokom delovanja TS-a mogu ostati na sličnom nivou i nakon stresa u biljnim ćelijama (Chen i sar., 1990; DeRocher i sar., 1991). S obzirom na dug poluživot ovih proteina,

koji iznosi i do 50 h (DeRocher i sar., 1991), može se zaključiti da su oni veoma značajni i tokom perioda oporavka biljaka od delovanja visokih temperatura, a mogu ukazivati i da su biljke bile, u nekom trenutku, bile pod uticajem TS-a.

## 2. Ciljevi rada

- Ispitivanje ekspresije eEF1A u listovima različitih vrsta monoploidnih i diploidnih biljaka gajenih *ex vitro* u uslovima visoke temperature.
- Ispitivanje uticaja visoke temperature na proces tuberizacije, rasteenje i razviće različitih sorti krompira gajenih *in vitro*, *ex vitro* i u eksperimentalnom polju.
- Ispitivanje ekspresije eEF1A u uslovima visoke temperature u izdancima, listovima i krtolama kod različitih sorti krompira gajenih *in vitro*, *ex vitro* i u eksperimentalnom polju.
- Karakterizacija izoformi eEF1A u listovima kod različitih sorti krompira u uslovima visoke temperature, gajenih *ex vitro* i u eksperimentalnom polju.
- Procena broja kopija gena koji kodiraju eEF1A kod različitih sorti krompira.
- Ekspresija *eEF1A* gena u uslovima visoke temperature u minikrtolama kod krompira gajenih *ex vitro*.
- Identifikacija inducibilnih *eEF1A* gena u uslovima toplotnog stresa.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Biljni materijal

U ovom radu su korišćene sledeće sorte krompira, *Solanum tuberosum* L.: Désirée (ZPC, Leuwarden, Holandija), Liseta (R.K. Wiersma, Holwerd, Holandija), Laura (Europlant Pflanzenzucht GmbH, Lineburg, Nemačka), Agria (Kartoffelzucht Böhm GmbH, Lineburg, Nemačka), Cleopatra (HZPC B.V., Joure, Holandija), Jelly (Kartoffelzucht Bohm GmbH, Lineburg, Nemačka), Marabel (Mansholt Beheer B.V., Vierhuizen, Holandija) i Arnova (Agrico Research B.V., Bant, Holandija) koje su dobijene od Solanum Komerc-a (Guča, Srbija), kao i sorta Festival (Agrico Research B.V., Bant, Holandija) koja je dobijena od kolege dr M. Hfidan-a. Krtole sorti krompira su čuvane na temperaturi od 5 °C u mraku.

Pored različitih sorti krompira, korišćene su i sledeće vrste monokotiledonih biljaka: praziluk (*Allium porrum* L. sorta Kumuš), kukuruz (*Zea mays* L. convar. *saccharata* Koern sorta Union F-1), pšenica (*Triticum aestivum* L. sorta Romansa) i dikotiledonih biljaka: uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L.), paradajz (*Solanum lycopersicum* L. sorta Novosadski jabučar), cvekla (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* sorta Detroit).

#### 3.2. Gajenje biljaka u kulturi *in vitro*

Za uspostavljanje kulture izdanaka krompira *in vitro*, kao početni materijal su korišćeni izbojci dužine od 4-6 cm koji su odvajani od naklijalih krtola prethodno izlaganih sobnoj temperaturi tokom 60 dana. Izbojci krompira ispirani su pod mlazom česmene vode, a potom površinski sterilisani prvo sa 70% etanolom uz dodatak nekoliko kapi deterdženta, a zatim sa 20% rastvorom komercijalnog preparata natrijum hipohlorita (4% aktivnog hlora). Nakon površinske sterilizacije, izbojci su ispirani sterilnom dejonizovanom vodom, a odsecci izbojaka sa jednim nodusom dužine od 5-10 mm su postavljeni na osnovnu MS hranljivu podlogu koja je sadržala mineralne soli po Murashige i Skoog-u (1962), vitamine po Linsmaier i Skoog-u (1965), kao i organske

komponente prikazane u **Tabeli 1.**, uz dodatak 0,5 mg l<sup>-1</sup> 6-benzil aminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri).

**Tabela 1.** Sastav osnovne MS hranljive podloge za kultivaciju izdanaka krompira *in vitro*. MS-Murashige i Skoog (1962) i LS-Linsmaier i Skoog (1965).

MS Makroelementi (mg l <sup>-1</sup> )		MS Mikroelementi (mg l <sup>-1</sup> )		LS Vitamini (mg l <sup>-1</sup> )	
KNO <sub>3</sub>	190	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3	Vitamin B1	0,4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6	Vitamin B2	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	Nikotinska kiselina	0,5
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440	KI	0,83	Glicin	2,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025	<b>Organske materije (g l<sup>-1</sup>)</b>	
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	Agar	7,0
		CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	Saharoza	30,0
		FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8	Myo-inozitol	0,1
		Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,3		

Izdanci koji su se potom formirali su dalje gajeni na osnovnoj MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja. Za multiplikaciju su korišćeni odsecci stabla izdanaka dužine 10-15 mm sa jednim nodusom i listom. Subkultivacija je obavljena svakih 30 dana na istu hranljivu podlogu.

Podloge, instrumenti za rad i laboratorijsko posuđe sterilisani su prema standardnim procedurama kulture biljnih ćelija, tkiva i organa *in vitro*, a rad sa biljnim materijalom obavljan je u aseptičnim uslovima, u komori sa laminarnim protok vazduha (laminar).

Kulture *in vitro* su rasle u klimatizovanoj sobi pod standardnim uslovima: temperatura 21±2 °C, 16 h fotoperiod i bela fluorescentna svetlost gustine fluksa fotona 90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 3.3. Eksperiment tuberizacije u kulturi *in vitro*

Za ispitivanje uticaja visoke temperature na formiranje mikrokrtola kod različitih sorti krompira u kulturi *in vitro*, korišćeni su jednonodalni odsecci stabla izdanaka dužine od 10-15 mm koji su dobijeni od biljaka krompira gajenih 30 dana na osnovnoj MS hranljivoj podlozi. Ovi jednonodalni odsecci su postavljeni na hranljivu podlogu za tuberizaciju koja predstavlja osnovnu MS hranljivu podlogu sa dodatkom 8% saharoze. Po 10 eksplantata je postavljeno na 50 ml ove podloge u staklenim bočicama od 270 ml ( $\emptyset$  60 x 120 mm) koje su potom zatvorene sa perforiranim polipropilenskim zapašaćima, a perforacije su zapašene vatom radi dobre razmene gasova, kako bi se izbegao efekat nakupljanja etilena.

Kulture *in vitro* su gajene 30 dana u uslovima stalnog mraka na dva temperaturna tretmana:  $21\pm 1$  °C (kontrola, K) i  $29\pm 1$  °C (visoka temperatura, VT) u komori za gajenje biljaka (Frigoline-Star, Beograd, Srbija).

Radi utvrđivanja uticaja visoke temperature na preživljavanje eksplantata i formiranje mikrokrtola kod krompira u uslovima *in vitro*, nakon 30 dana gajenja, izmereni su sledeći parametri:

- procent preživelih eksplantata,
- procent eksplantata sa mikrokrtolama,
- dužina izdanaka,
- broj mikrokrtola po teglici,
- dijametar mikrokrtola,
- masa mikrokrtola i
- ukupna masa mikrokrtola po jednoj teglici (prinos).

Radi određivanja dinamike tuberizacije u *in vitro* uslovima, formirane mikrokrtole brojane su u svakoj teglici pod zelenim svetlom u intervalima od 5 dana, tokom 30 dana trajanja eksperimenta. Eksperiment je ponovljen 2 puta sa 5 ponavljanja po temperaturnom tretmanu (10 eksplantata po ponavljanju).

Za potrebe analize proteina, izdanci i mikrokrtole sa oba temperaturna tretmana su sakupljeni i zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani na - 70 °C.



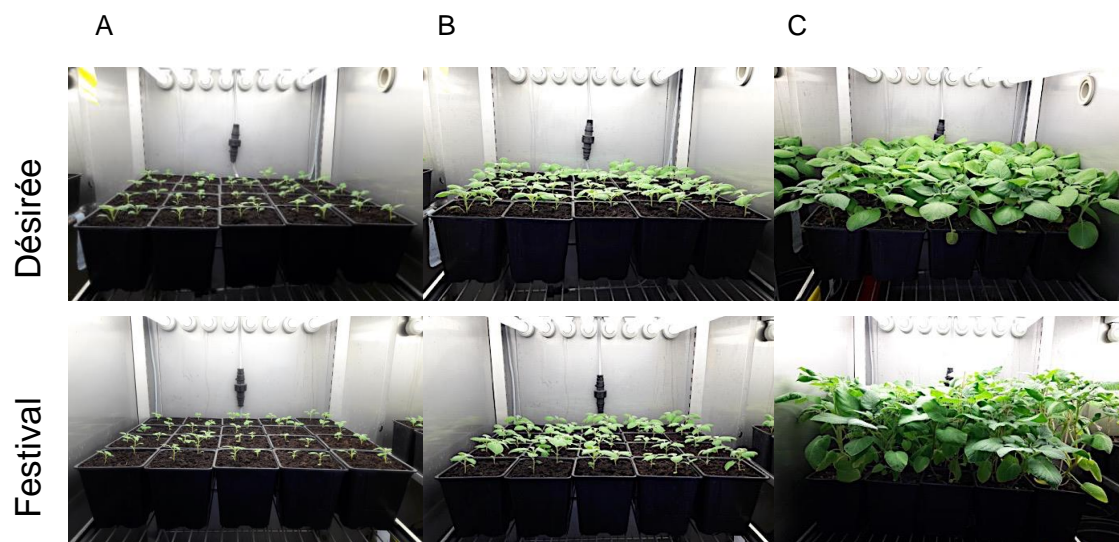
### 3.4. Eksperimenti sa biljakama gajenim *ex vitro*

U cilju ispitivanja akumulacije eEF1A u uslovima visoke temperature, uzgajano je nekoliko vrsta monokotiledonih: praziluk, kukuruz, pšenica, i dikotiledonih biljaka: uročnjak, cvekla, krompir. Krtole krompira sorte Désirée su 50 dana izlagane sobnoj temperaturi. Naklijale krtole su potom deljene na delove, a svaki deo je sadržao po jedan izbojak. Po jedan odsečak krtole zasađen je u polipropilenske saksije (11 x 11 x 12 cm) napunjene smešom komercijalnog supstrata (Floran, Beograd, Srbija) i vermikulita u odnosu 3:1 (v/v) na dubini od oko 10 cm, a ukupno je tako zasađeno 10 saksija. Semena različitih vrsta drugih dikotiledonih biljaka, kao i monokotiledonih biljaka su zasađene na isti način kao i odsecci krtola krompira sorte Désirée u saksije napunjene smešom komercijalne zemlje i vermikulita. Zasađeno je po 1 seme ovih biljaka u 10 saksija. Ovako posađeni odsecci krtola krompira i semena biljaka su dalje gajeni u klimatizovanoj sobi. Biljke su zalivane svakog drugog dana odstajalom vodom sa česme. Nakon 30 dana od izbijanja prvih listova, biljke su izlagane visokoj temperaturi (postepen porast od 23-40 °C prva 2 h, 40 °C tokom 6 h; VT) ili su ostavljene na regularnoj temperaturi od 23 °C (kontrola, K). Po tretmanu su uzorkovani prvi potpuno formirani listovi sa svih biljaka koji su potom zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani na -70 °C. Takođe, radi izučavanja razlike u ekspresiji eEF1A u listovima različitih starosti, sakupljeni su i listovi sa po pet biljaka nakon oba temperaturna tretmana kod sorte krompira Désirée i to sa različitih pozicija: prvi list od vrha izdanka (mladi list koji se još razvija), četvrti list od vrha izdanka (prvi potpuno razvijeni list) i osmi list od vrha izdanka (najstariji list). Sakupljeni listovi su odmah zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani na -70 °C.

Kulture *ex vitro* su rasle u klimatizovanoj sobi pod standardnim uslovima: temperatura 23±2 °C, 16 h fotoperiod i bela fluorescentna svetlost gustine fluksa fotona 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Uticaj visoke temperature na rastenje i razviće biljaka, formiranje krtola i ekspresiju eEF1A u listovima i minikrtolama ispitivan je *ex vitro* kod dve sorte krompira: Désirée i Festival, a takođe su ispitivani i proteinski markeri toplotnog stresa: HSP17.6 i HSP101. Kao polazni materijal korišćene su 15 dana stare biljke uzgojene *in*

*in vitro*. Biljke su ispirane vodom radi uklanjanja zaostale hranljive podloge i sađene su u polipropilenske saksije zaprimine 3l koje su bile napunjene do pola visine komercijalnim supstratom Floradur B Pot Medium-Coarse (Floragard, Oldenburg, Nemačka). Biljke i površina zemlje su tretirani fungicidom Ridomil gold MZ 68 WG (aktivna materija: Metalaksil-m 40 g kg<sup>-1</sup> + Mankozeb 640 g kg<sup>-1</sup>, Syngenta, Bazel, Švajcarska). Preko saksija je postavljena providna PVC folija sa perforiracijama radi razmene gasova i zasađene biljke su potom ostavljene da se aklimatizuju u komori za gajenje biljaka, Fitoclima PLH 1200 (Aralab, Sintra, Portugal). Nakon 5 dana aklimatizacije, folija je sklonjena sa saksija da bi biljke nastavile sa rastenjem. Dva dana nakon toga, biljke su rasađene u polipropilenske saksije (11 x 11 x 12 cm) i dopunjene komercijalnim supstratom Floradur B Pot Medium-Coarse (**Slika 7. A**). U svaku saksiju je zasađeno po dve biljke, a ukupno je tako zasađeno 20 saksija po jednoj sorti i tretmanu što je ukupno 40 biljaka po sorti i tretmanu. Biljke su zalivane svakog drugog dana odstajalom vodom sa česme. Posle nedelju dana gajenja biljaka u fitoklimi, je bilo vidno da su se biljke uspešno aklimatizovale (**Slika 7. B**), a već nakon mesec dana gajenja, biljke su obrazovale bujnu nadzemnu biomasu (**Slika 7. C**).



Nakon 33 dana gajenja, biljke su dalje gajene 7 dana na standardnom temperaturnom tretmanu (kontrola) ili izlagane tretmanu visokom temperaturom. Potom su mereni sledeći morfološki parametri koji se odnose na rasteenje i razviće biljaka krompira: visina i masa nadzemnog dela biljaka, broj nodusa i broj listova.

Kako bi se izučio uticaj visoke temperature na proces tuberizacije u uslovima *ex vitro*, izmeren je broj stolona, broj stolona sa iniciranim minikrtolama, prinos mase i broj minikrtola po jednoj biljci, kao i ukupan broj minikrtola. Radi izučavanja uticaja visoke temperature na rast minikrtola, dobijene minikrtole su podeljene u kategorije na osnovu dijametra i to: <5 mm, 5-10 mm, 10-15 mm, 15-20 mm i >20 mm. Za svaku od ovih kategorija je određen broj minikrtola i njihova pojedinačna masa, kako na kontrolnom tretmanu, tako i nakon tretmana visokom temperaturom kod obe sorte krompira. Eksperiment je ponovljen tri puta.

Kako bi se ispitala ekspresija proteina u podzemnim delovima biljaka, isti eksperiment je postavljen, a sakupljeni su stoloni, stoloni sa iniciranim minikrtolama, i tri kategorije veličina minikrtola (<5 mm, 5-10 mm, 10-15 mm) koji su potom zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -70 °C.

Kulture *ex vitro* su rasle u komori za gajenje biljaka pri dnevnoj temperaturi od 20±0,1 °C i noćnoj od 18±0,1 °C, 16 h fotoperiod i bela fluorescentna svetlost gustine fluksa fotona 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, a vlažnost vazduha 70% (kontrolni uslovi). U tretmanu visokom temperaturom, dnevna temperatura je iznosila 30±0,1 °C, a noćna 24±0,1 °C, 16 h fotoperiod i bela fluorescentna svetlost gustine fluksa fotona 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, a vlažnost vazduha 70%. Izmerena temperatura zemljišta na dubini od 4 i 8 cm, tokom tretmana visokom temperaturom je odgovarala temperaturi u komori.

### **3.5. Gajenje biljaka u eksperimentalnom polju**

Za eksperimente u polju, krtole krompira su zasađene početkom aprila meseca 2011. i 2012. godine na eksperimentalnom polju koje predstavlja deo šireg lokaliteta Zemun Polja u Srbiji, odnosno Jugoistočnog Srema (**Slika 8.**). Eksperimentalno polje se

nalazi na 79 m nadmorske visine, 44°88' severne geografske širine i 20°35' istočne geografske širine.



**Slika 8.** Izgled eksperimentalnog polja, lokalitet Zemun Polje.

Jugoistočni deo Srema odlikuje se umereno-kontinentalnom klimom, toplim letima, neravnomernom količinom padavina i čestom pojavom suše tokom leta. Tokom perioda od aprila do septembra, sakupljani su meteorološki podaci za godine ispitivanja (2011. i 2012. god.) i za višegodišnji prosek (1980-2010. godine) koji su prikazani u **Tabeli 2.**

**Tabela 2.** Srednje mesečne temperature vazduha i sume padavina u toku vegetacionog perioda (od aprila do septembra) za dve uzastopne godine (2011. i 2012. god.) i višegodišnji prosek (1980-2010. god.) na lokalitetu Zemun Polje, Srbija.

Mesec	2011		2012		1980-2010	
	°C	mm	°C	mm	°C	mm
April	14,7	14,1	14,6	66,9	12,3	54,6
Maj	18,3	66,8	18,0	127,9	17,7	56,0
Jun	21,9	41,1	24,6	16,0	20,9	101,0
Jul	24,3	95,0	27,0	39,0	22,6	69,2
Avgust	24,6	14,0	26,0	4,5	22,4	55,4
Septembar	23,0	47,7	22,0	30,7	17,5	64,7
Prosek	<b>21,1</b>	<b>278,7</b>	<b>22,0</b>	<b>285,0</b>	<b>18,9</b>	<b>400,9</b>

Srednje mesečne temperature vazduha u 2011. i 2012. godini bile su u proseku više za 2,2-3,1 °C u odnosu na referentni period od 1980-2010. godine. Ovom povećanju temperature su najviše doprinele temperature tokom juna, jula i avgusta. U najznačajnijem periodu za razvoj krompira tokom jula i avgusta, srednja mesečna temperatura vazduha je bila iznad 24,0 °C, što je dosta više iznad optimalne temperature za razvoj krompira. Naročito nepovoljni uslovi za proizvodnju krompira su bile temperature tokom jula i avgusta 2012. godine kada je zabeležena prosečna temperatura vazduha od 27 °C i 26 °C, tim redosledom.

Eksperiment je postavljen kao dvofaktorijalni ogled po metodi randomizovanog potpunog blok dizajna, u četiri ponavljanja. Faktori koji su bili obuhvaćeni istraživanjem su sorta krompira i vegetaciona sezona (2011. prva sezona i 2012. druga sezona). U okviru bloka, svaka sorta je zasađena na plotu površine 7 m<sup>2</sup> (4 reda razdvojeni između sebe 0,8 m, a razmak između krtola u redovima je iznosio 0,3 m). Zalivanje biljaka je bilo po sistemu kap-po-kap. Tip zemljišta je karbonatni černo zem. Tokom celog vegetacionog perioda, primenjivane su standardne agrotehničke mere koje su navedene u radu Momčilović i sar. (2016). Za folijarnu prehranu biljaka upotrebljeno je đubrivo Haifa Bonus (N:P:K = 13:2:44, Haifa Chemicals, Hajfa, Izrael). Uzorci listova za analizu proteina su sakupljeni tokom sredine dana (12 - 13 h) u mesecu junu 2011. i 2012. godine. Sakupljanje je vršeno danima kada je temperatura vazduha bila između 24-26 °C nakon nekoliko dana izmerenih maksimalnih dnevnih temperatura koje su bile ≤ 26 °C. Takođe su listovi krompira sakupljeni i kada je temperatura vazduha iznosila 33-35 °C nakon nekoliko dana izmerenih maksimalnih dnevnih temperatura ≥ 30 °C. Vremenski interval između sakupljanja listova je bio 4-5 dana. Sakupljeni su prvi potpuno razvijeni listovi (četvrti list od vrha izdanka) sa pet biljaka i zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani na -70 °C.

Na kraju vegetacionog perioda za sva četiri plotu izvršeno je merenje sledećih parametara:

- visina primarnih izdanaka,
- nadzemna biomasa,
- broj krtola po biljci,

- masa krtola i
- masa krtola po plotu.

### **3.6. Izolacija proteina iz biljnog materijala**

U prvoj fazi izolacije proteina, zamrznuti biljni materijal mase od 250-400 mg koji je čuvan na -70 °C, mehanički je usitnjen u tečnom azotu u porculanskim avanima koji su prethodno sterilisani i rashlađeni. Sledeća faza postupka bila je ekstrakcija proteina korišćenjem ekstrakcionog pufera [50 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM EDTA (pH 8), 10% (v/v) glicerol, 10 mM β-merkaptoetanol i 1% (v/v) proteazni inhibitor koktel za biljne proteinske ekstrakte (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri)]. Po 1 ml ekstrakcionog pufera dodavan je na 1 g biljnog materijala i uzorci su zatim ostavljeni da se odlede na sobnoj temperaturi. Ovako dobijeni homogenati su prebačeni u mikrotube (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i centrifugirani 15 min, 14000 rpm, +4 °C. Supernatant dobijen centrifugiranjem predstavljao je sirovi ekstrakt proteina koji je alikvotiran. Dobijeni uzorci čuvani su na -70 °C do obrade i analize.

Koncentracija proteina u uzorcima određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976), a za to je korišćen komercijalni rastvor Bradford reagensa (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets). Uzorci su pre očitavanja apsorbance na talasnoj dužini od 595 nm ( $A_{595}$ ), razblaženi 200x u ovom reagensu, a svako razblaženje je napravljeno u triplikatu radi povećanja preciznosti rada. Apsorbanca je očitavana korišćenjem spektrofotometra Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija). Koncentracije proteina određene su na osnovu standardne krive koja je kreirana na osnovu serije koncentracija proteinskog standarda i apsorbance dobijene za date koncentracije. Kao standard korišćen je goveđi serum albumin (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri).

### **3.7. 1D SDS-PAGE elektroforeza i imunoblot analiza**

Za razdvajanje proteina 1D natrijum dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE), korišćeni su diskontinuirani poliakrilamidni gelovi (12%

gel za razdvajanje i 4% gel za koncentrisanje). Ekstrakti proteina mešani su sa Laemmli puferom (Laemmli, 1970) u odnosu 1:1. Pripremljeni uzorci od 15 µg proteina, nanešeni su na gel. Pored uzoraka, na nekim gelovima je nanet Spectra Multicolor Broad Range (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets) i/ili Cruz Marker standard molekulskih masa proteina (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, Teksas). Vertikalna elektroforeza izvedena je na sistemima Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell ili Criterion Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) pri konstantnoj voltaži od 150 V, 1h.

Po završenoj elektroforezi, urađen je transfer proteina sa gelova na poliviniliden difluorid (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) metodom „mokrog” transfera. Pre transfera, membrane su aktivirane potapanjem u metanol 5 s. Transfer proteina sa gelova na membrane, vršen je na sistemu Criterion Blotter (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) pri konstantnoj voltaži od 100 V, 45 min. Nakon završenog transfera, urađena je imunoblot analiza po Momcilovic i Ristic (2007). Blotovi su potapani u 10% (w/v) rastvor obranog mleka Blotting-Grade Blocker, (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) u T-PBS puferu [PBS pufer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) sa dodatkom 0,05% (v/v) Tween 20 (Fisher Bioreagents, Pitsburg, Pensilvanija)] preko noći na +4 °C. Nakon završenog blokiranja, blotovi su ispirani 2x1 min T-PBS puferom i inkubirani 2 h u rastvoru primarnih antitela, na sobnoj temperaturi na šejkeru.

Za imunoblot analizu, korišćena su poliklonalna zečija anti-HSP17.6-CI (Agrisera, Vännäs, Švedska), anti-HSP101/ClpB (Agrisera, Vännäs, Švedska) i anti-eEF1A (Bukovnik i sar., 2009) antitela. Anti-HSP17.6-CI i anti-HSP101/ClpB razblažena su u odnosu 1:2000, dok je anti-eEF1A antitelo razblaženo 1:4000 u 5% (w/v) rastvoru obranog mleka u T-PBS puferu. Po inkubaciji u primarnim antitelima, blotovi su ispirani 2x1 min i 3x10 min u T-PBS puferu i potom inkubirani 2 h, na sobnoj temperaturi, na šejkeru u rastvoru sekundarnog antitela. Korišćena su anti-rabbit IgG-HRP (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri) ili Cruz Marker MW Tag-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, Teksas) sekundarna antitela. Sekundarno antitelo anti-rabbit IgG-HRP razblaživano je u odnosu 1:20000, dok je sekundarno antitelo Cruz Marker

MW Tag-HRP razblaživano u odnosu 1:1000 u 5% (w/v) rastvoru obranog mleka u T-PBS puferu. Sekundarno antitelo Cruz Marker MW Tag-HRP korišćeno je za inkubaciju onih blotova na kojima se nalazio Cruz Marker proteinski standard.

Nakon reakcije sa sekundarnim antitelom, blotovi su ispirani isto kao i po završetku inkubacije u rastvoru primarnih antitela, a potom je detekcija proteina izvršena metodom pojačane hemiluminiscencije (ECL; eng. „Enhanced Chemiluminescence”) prema ECL protokolu Vettermann i sar. (2002). Reaktivne trake vizualizovane su korišćenjem X-Omat LS filma (Kodak, Ročester, Njujork). Relativni volumen proteinskih traka određen je uz pomoć ImageQuant kompjuterskog softvera (v. 5.2, Molecular Dynamics, Sanivejl, Kalifornija).

### **3.8. 2D gel elektroforeza i imunoblot analiza**

Po 100 µg ukupnih solubilnih proteina izolovanih iz listova biljaka krompira su prečišćeni korišćenjem ReadyPrep 2D Cleanup Kit-a (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) prema uputstvu proizvođača. Nakon postupka prečišćavanja, proteini su rehidratirani u 125 µl ReadyPrep 2D Rehydration/Sample pufera (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija), a potom naneti na 7 cm dugačke IPG trake (NL 3-10; Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) i inkubirani 16 h na sobnoj temperaturi. Razdvajanje u prvoj dimenziji (izoelektrofokusanje, IEF) je obavljeno korišćenjem Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) prema uputstvu proizvođača. Nakon izoelektrofokusanja, IPG trake su ekvilibrisane 10 min u SDS-PAGE ekvilibracionom puferu I [6 M Urea, 2% (w/v) SDS, 0,375 M Tris (pH 8,8), 130 mM DTT i 20% (v/v) glicerol], a odmah zatim i 10 min u SDS-PAGE ekvilibracionom puferu II [6 M Urea, 2% (w/v) SDS, 0,375 M Tris (pH 8,8), 2.5% (w/v) jodoacetamid i 20% (v/v) glicerol]. Tako ekvilibrisane IPG trake su postavljene na 12% poliakrilamidne gelove, a razdvajanje proteina u drugoj dimenziji je obavljeno na sistemu Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis. Po završenom razdvajanju proteina u drugoj dimenziji, urađen je transfer proteina sa gelova na PVDF membrane i imunoblot analiza po istom postupku kao što je opisano u odeljku 3.7. Za imunoblot analizu su korišćena anti-eEF1A primarna antitela i njima odgovarajuća sekundarna



antitela. pI vrednosti proteinskih tačaka koje su se pojavile nakon detekcije metodom pojačane hemiluminiscencije su izračunate prema instrukcijama proizvođača (Ready Strip IPG Strip Instruction Manual, Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, Kalifornija) uzimajući u obzir imobilizovani nelinearni gradijent pH 3-10.

### **3.9. Izolacija genomske DNK iz biljaka krompira**

Genomska DNK je izolovana iz kulture izdanaka šest sorti krompira (Agria, Bellarosa, Carrera, Désirée, Jelly i Marabel) prema metodi Murray i Thompson (1980). Odmereno je od 500-1000 mg biljnog materijala koje je, pomoću tečnog azota, mehanički usitnjeno do praha u porculanskim avanima koji su prethodno sterilisani i rashlađeni. Prah je potom prebačen u sterilne polipropilenske tube od 50 ml (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) i ostavljen u zamrzivaču na -20 °C do potpunog isparavanja tečnog azota. U tube je potom dodato 7.5 ml/g ekstrakcionog pufera [2% (w/v) CTAB, 20 mM NaEDTA (pH 8), 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1,4 M NaCl, 1% (w/v) polivinilpirolidon (PVP-40) sa 0,5% (v/v) β-merkaptoetanolom] koji je prethodno zagrejan na 60 °C. Sadržaj je izmešan okretanjem tuba i inkubiran 30 min na 60 °C. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi u svaku tubu je dodata jednaka zapremina Sevagovog reagensa (hloroform:izoamilalkohola, 24:1 v/v) koja odgovara zapremini smeše u tubi, a potom je sve izmešano okretanjem tuba i centrifugirano 10 min, 3500 rpm na sobnoj temperaturi. Vodena faza je prebačena u nove polipropilenske tube, a ekstrakcija Sevagovim reagensom i centrifugiranje još jednom ponovljeno. Vodena faza je potom prebačena u nove polipropilenske tube i dodato joj pola zapremine 4 M NaCl, nakon čega je sve pomešano okretanjem tuba i zatim je dodata ista zapremina hladnog izopropanola; smeša je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi i 30 min na +4 °C. Sadržaj je nakon završene inkubacije centrifugiran 10 min na 2000 rpm na sobnoj temperaturi. Supernatant je odstranjen, a pelet je ispran dodavanjem 5 ml hladnog 70 % etanola. Nakon centrifugiranja (10 min, 2000 rpm na sobnoj temperaturi), etanol je pažljivo odliven, a talog osušen u laminaru preko noći. Talog je sledećeg dana resuspendovan dodavanjem 1 ml TE pufera [10 mM Tris-HCl (pH 8) i 1mM EDTA (pH 8)] i tretiran sa RNazom A [(10 mg/ml)/g tkiva], a nakon toga i inkubiran 60 min na 37

°C. Nakon ovog koraka, ekstrakcija Sevagovim reagensom je još jednom ponovljena, smeša je centrifugirana 10 min, 12000 rpm, +4 °C, a vodena faza je prebačena u sterile mikrotube (Eppendorg, Hamburg, Nemačka). Uzorci izolovane genomske DNK su čuvani na +4 °C do trenutka korišćenja.

### **3.9.1. Kvantifikacija i provera kvaliteta izolovane DNK**

Koncentracija izolovane DNK određena je spektrofotometrijski na Agilent 8453 UV-visible prema apsorbanci na talasnoj dužini od 260 nm ( $A_{260}$ ), a prema formuli:

$$[\text{ukupna DNK}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{faktor razblaženje} / 1000$$

gde 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  predstavlja koncentraciju dvolančane DNK pri  $A_{260} = 1$ .

Takođe je izmerena i apsorbance na talasnim dužinama od 230 nm ( $A_{230}$ ) i 280 nm ( $A_{280}$ ). Odnos  $A_{260}/A_{230}$  pokazuje nivo kontaminacije polisaharidima. Prihvatljive su bile one vrednosti koje su se kretale u granicama od 2,2-2,5. Odnos  $A_{260}/A_{280}$  pokazuje nivo kontaminacije proteinima, a prihvatljive su bile one vrednosti koje su se kretale u granicama od 1,8-1,9.

Kvalitet izolovane DNK proveren je elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu u 1xTBE (0,04 M Tris-borat i 0,001 M EDTA, pH 8) sa dodatkom 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  etidijum-bromida pri konstantnoj voltaži od 40 V, 2 h. Pre lodiranja je određena zapremina izolovane DNK (5  $\mu\text{g}$ ) pomešana sa rastvorom brom-fenol plavo boje [0,1% (w/v) boje, 50% (v/v) glicerol] (Sigma, Sent Luis, Misuri) koja je dodata u količini 10% od zapremine uzoraka. Za procenu veličine fragmenata koji daju signal, korišćen je ZipRuler 2 (Fermentas, Voltam, Masačusets). Gelovi su nakon elektroforeze vizualizovani pomoću transluminatora (UltraLum Inc, Gel Exlorer, Ekston, Pensilvanija) radi procene i podešavanja koncentracije DNK.

### **3.9.2. Analiza genomske DNK - Southern blotting**

Za Southern blot analizu, 30  $\mu\text{g}$  genomske DNK izolovane iz odabranih sorti krompira je digerirano sa restrikcionom FastDigest *Hind*III endonukleazom (Thermo

Fisher Scientific, Voltam, Masačusets). Po inkubiranju 15 min na ledu sa 0,6 volumena 5 M sterilnog amonijum-acetata (NH<sub>4</sub>-Ac) i 2 volumena (na zbir volumena DNK i NH<sub>4</sub>-Ac) 100% etanol koji je prethodno rashlađen na -20 °C, digerirana DNK je precipitirana centrifugiranjem na 12000xg (5 min, +4 °C). Supernatan je odbačen, a pelet je ispran sa 70% hladnim etanolom i ponovo centrifugiran. Pelet je osušen na struji vazduha i rastvoren u 26 µl TE pufera. Ovako rastvorena digerirana DNK je pomešana sa 4 µl rastvora brom-fenol plavo boje [0,1% (w/v) boje, 50% (v/v) glicerol] i kratko zagrejana na 55 °C radi raskidanja vodonične veze između fragmenata DNK. Uzorci su ohlađeni na led, kratko centrifugiran, naneti na 1% (w/v) agarozni gel i razdvojeni elektroforezom (16 h, 28 V). Pored uzoraka, na gel su naneti i ZipRuler 1+2 (Fermentas, Voltam, Masačusets) i Molecular Weight marker II (Roche, Manhajm, Nemačka). Elektroforeza je vršena na aparatu za horizontalnu forezu BlueMarine 200 (Serva Electrophoresis, Hajdelberg, Nemačka).

Nakon završene elektroforeze, gel je obojen u vodenom rastvoru etidijum-bromida (Et-Br) (1 µg/ml) i slikan na transluminatoru radi provere kvaliteta digerirane DNK. Nakon slikanja, gel je ispran sa 200 ml sterilne vode, a potom inkubiran 10 min u rastvoru za depurinizaciju (0,2 N HCl) na sobnoj temperaturi na šejkeru. Gel je ispran ponovo sa sterilnom vodom i inkubiran u rastvoru za denaturaciju (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) 2x15 min na sobnoj temperaturi na šejkeru. Gel je ispran sa sterilnom vodom i zatim inkubiran 2x20 min u rastvoru za neutralizaciju (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl) na sobnoj temperaturi na šejkeru. Ekvilibracija gela je potom urađena u 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat, pH 7) tokom 30 min inkubacije. Nakon ekvilibracije gela, DNK je kapilarnim transferom u trajanju od 24 h, prebačena na pozitivno naelektrisanu membranu (Roche, Manhajm, Nemačka). DNK je fiksirana za membranu inkubacijom na 120 °C, 30 min u termostatu.

Proba StEF-1α dužine 412 bp je dizajnirana na osnovu sekvence krompira sorte Désirée (GenBank pristupni broj AJ536671.1). Proba je obeležena sa digoksininom (DIG)-dUTP PCR-om (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche, Manhajm, Nemačka) korišćenjem DNK izolovane iz sorte Désirée kao templet za amplifikaciju i prajmera „forward“ 5'-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-3' i „reverse“ 5'-

CATGGGCTTGGTGGGAATCA-3'. Za PCR obeležavanje probe je korišćen enzim AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija) umesto enzima iz kita. Sastav PCR reakcije je prikazan u **Tabeli. 2**.

**Tabela. 2** Komponente reakcione smeše za obeležavanje probe PCR-om.

<b>Komponente reakcione smeše za PCR</b>	<b>µl</b>
DNK (250 ng/µl)	2,3
10x PCR pufer	7
Prajmer F (2 µM)	7
Prajmer R (2 µM)	7
Taq DNK polimeraza (5 U/µl)	1,5
dNTP (2mM)	7
ddH <sub>2</sub> O	38,2
Ukupno	70

Uslovi PCR-a za obeležavanje probe su bili sledeći:

- inicijalna denaturacija (5 min, 95 °C),
- denaturacija 36 ciklusa (1 min, 94 °C),
- vezivanje prajmera 36 ciklusa (1 min, 60 °C),
- elongacija 36 ciklusa (1 min, 72 °C),
- finalna elongacija (5 min, 72 °C),
- na kraju hlađenje do +4 °C.

Hibridizacija je urađena u puferu DIG Easy Hyb (Roche, Manhajm, Nemačka) na temperaturi od 48 °C, 16 h. Membrana je potom ispirana 2x5 min u svakom od sledećih pufera: 2x SSC + 0,1% SDS i 1x SSC + 0,1% SDS na 48 °C i 0,5x SSC + 0,1% SDS i 0,1x SSC + 0,1% SDS na 68 °C. Hibridi su detektovani na osnovu interakcije specifičnih anti-DIG antitela (Roche, Manhajm, Nemačka), a vizuelizacija je postignuta sa hemiluminiscentnim supstratom CDP-Star (Roche, Manhajm, Nemačka) i signali su zabeleženi na X-filmu (Kodak, Ročester, Njujork).

Broj gen-kodirajućih sekvenci za eEF1A je utvrđen pretragom genomske baze EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org>) kod *S. tuberosum* grupe phureja duplog monoploidnog klona DM1-3516R44. Podaci su dobijeni i deponovani od strane The Potato Genome Sequencing Consortium (2011). EnsemblPlants pristupni brojevi gena korišćenih u ovoj tezi su: *eEF1A-I* (PGSC0003DMG400023270), *eEF1A-II* (PGSC0003DMG400023272), *eEF1A-III* (PGSC0003DMG400020775), *eEF1A-IV* (PGSC0003DMG400020772), *eEF1A-V* (PGSC0003DMG400008117), *eEF1A-VI* (PGSC0003DMG400019677), *eEF1A-VII* (PGSC0003DMG400037830), *eEF1A-VIII* (PGSC0003DMG400005728), *eEF1A-IX* (PGSC0003DMG400016556). Za utvrđivanje identičnosti sekvence probe StEF-1 $\alpha$  (412 bp) sa preuzetim *eEF1A* sekvencama korišćen je NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Takođe je utvrđeno i da nema restrikcionih mesta u okviru homolognog regiona StEF-1 $\alpha$  probe i bilo koje od DM1-3516R44 genskih eEF1A sekvenci koje prepoznaje *HindIII*.

### **3.10. Izolacija ukupnih RNK iz listova i minikrtola krompira gajenih *ex vitro***

Izolacija totalne RNK iz minikrtola krompira veličine 10-15 mm sorti Désirée i Festival (*ex vitro* gajene biljke - tretmani opisani u sekciji 3.4), je urađena prema metodi Destefano-Beltrán i sar. (2006) korišćenjem natrijum-sulfita ili korišćenjem trizola prema metodi Chomczynski i Sacchi (1987), dok je izolacija iz listova krompira sorte Désirée urađena korišćenjem trizola takođe prema metodi Chomczynski i Sacchi (1987).

Za izolaciju totalne RNK trizolom iz listova krompira sorte Désirée i minikrtola sorti Désirée i Festival, odmereno je po 350 mg listova i 500 mg minikrtola koji su bili čuvani na -70 °C. Odmereni biljni materijal je mehanički usitnjen u tečnom azotu u porculanskim avanima koji su prethodno sterilisani i rashlađeni. Usitnjenom materijalu je dodat 1 ml rashlađenog trizola (Invitrogen TRIzol Reagent, Thermo Fischer Scientific, Voltam, Masačusets) na 100 mg biljnog tkiva. Nakon otapanja, homogenat je prebačen u sterilne „RNase-free“ mikrotube (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi radi potpune disocijacije nukleoproteinskih kompleksa. Homogenatu je dodato 200  $\mu$ l smeše rastvora hloroform-izoamil alkohol

(24:1, v/v), pa je inkubiran 3 min na sobnoj temperaturi. Radi razdvajanja faza, uzorci su centrifugirani 10 min, 12000xg, +4 °C. Vodena faza u kojoj je rastvorena RNK, je prebačena u nove sterilne mikrotube i odmah potom je dodat izopropanol (250 µl/1 ml upotrebljenog Trizola) i 250 µl rastvora za precipitaciju RNK (0,4 M NaCl, 0,8 M natrijum-citrat, 0,8 M HCl u dietilpirokarbonatom (DEPC) tretiranoj vodi). Uzorci su inkubirani pola sata na -20 °C, a potom centrifugirani 10 min, 12000 g, +4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a na dnu mikrotube je ostala izolovana RNK u vidu precipitata bele boje slične gelu. Sledeći korak je bio ispiranje RNK peleta sa 1 ml 75% etanola i potom centrifugiranje 10 min, 7500xg, +4 °C. Supernatant je odbačen, a mikrotube u kojima je ostao pelet na dnu su ostavljene otvorene da se suše na struji vazduhu, ali ne potpuno. Za rastvaranje RNK, korišćena je voda koja je tretirana DEPC-om, a tako rastvorena RNK je odložena na -70 °C do daljeg korišćenja.

Za izolaciju totalne RNK natrijum-sulfitom iz minikrtola, korišćeno je od 350-650 mg minikrtola sorte Désirée koje su bile čuvane na -70 °C. Biljni materijal je mehanički usitnjen u tečnom azotu u porculanskim avanima koji su prethodno sterilisani i rashlađeni. U usitnjeni materijal dodat je izolacioni pufer [50% (v/v) smeše 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 sa 1% (w/v) natrijum-sulfita i 50% (v/v) fenola zasićenog vodom]. Po topljenju, homogenat je prebačen u sterilne „RNase-free“ mikrotube i centrifugiran 10 min, 14000xg. Vodena faza je prebačena u nove sterilne mikrotube i odmah potom je dodata ista zapremina kiselog fenola:hloroforma (5:1, v/v). Uzorci su centrifugirani 20 min, 14000xg, a supernatant je prebačen u nove sterilne mikrotube. Za precipitaciju RNK, dodavana je jednaka zapremina izopropanola i 0,1 zapremina 3 M Na-acetata (pH 5,2) i inkubacija preko noći na -20 °C. Uzorci su potom centrifugirani 10 min, 14000xg, +4 °C. Po uklanjanju supernatanta, RNK pelet je ispiran sa 1 ml 75% etanola i centrifugiran 10 min, 7500xg, +4 °C. Supernatant je ponovo odbačen, a mikrotube u kojima je ostao pelet na dnu su ostavljene otvorene da se suše na struji vazduha, ali ne potpuno. Za rastvaranje RNK, korišćena je voda koja je tretirana DEPC-om, a tako rastvorena RNK je odložena na -70 °C do daljeg korišćenja.

### 3.10.1. Kvantifikacija i provera kvaliteta izolovane RNK

Određivanje koncentracije RNK je urađeno na aparatu NanoPhotometer N60 (Implen, Minhen, Nemačka), na talasnim dužinama od 260 nm (totalni sadržaj nukleinskih kiselina) i 280 nm (sadržaj proteina). Kvalitet RNK je određen na osnovu odnosa apsorbanci uzoraka 260/280 nm, pri čemu su bile prihvatljive vrednosti od 1,8-2,1. Nakon kvantifikacije, kvalitet izolovanih RNK je bio proveren i elektroforetski. Ukupna izolovana RNK je razdvojena elektroforetski na 1,5% agaroznom gelu u 1x TBE (0,04 M Tris-borat i 0,001 M EDTA, pH 8) sa dodatkom 0,5 µg/ml etidijum-bromida pri konstantnoj voltaži od 100 V, 1 h. Pre nanošenja na gel, 1 µg izolovane RNK je pomešan sa gel „loading“ puferom tipa III 6x [0,25% (w/v) bromfenol plavo, 30% (v/v) glicerol]. Elektroforeza je vršena na aparatu za horizontalnu forezu BlueMarine 100 (Serva Electrophoresis, Hajdelberg, Nemačka), a gelovi su nakon foreze fotografisani na transluminatoru.

### 3.10.2. Tretman deoksiribonukleazom

Uklanjanje genomske DNK iz uzoraka nakon izolacije RNK je vršeno pomoću enzima DNKaze I (Fermentas, Voltam, Masačusets). Komponente reakcione smeše su prikazane u **Tabeli. 3**. Reakcione smeše su inkubirane 30 min na 37 °C. Enzim je potom inhibiran dodavanjem 1 µl 25 mM EDTA uz inkubiranje na 65 °C 10 min. Tretman DNKaze-om je rađen u PCR mašini 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija).

**Tabela. 3** Komponente pojedinačne reakcione smeše za tretman DNKaze-om.

Tretman DNKaze-om	µl
RNK uzorak (1 µg)	7,75
10 x reakcioni pufer MgCl <sub>2</sub>	1
DNKaza I (1 U/µl)	1
Inhibitor RNKaze <i>RiboLock RI</i> (40 U/µl)	0,25
Ukupno	10

### 3.10.3. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je urađena korišćenjem Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit-a (Fermentas, Voltam, Masačusets). Jedna reakcija za 1 µg totalne RNK je sadržala komponente prikazane u **Tabeli 4**. Smeša je prvo inkubirana na sobnoj temperaturi, 5 min. Uslovi reakcije u PCR mašini su bili 42 °C 60 min, a potom 5 min na 70 °C. Reverzna transkripcija je urađena na aparatu 2720 Thermal Cycler.

**Tabela 4.** Komponente pojedinačne reakcione smeše za RT-PCR.

Komponente reakcione smeše za RT-PCR	µl
RNK iz prethodnog koraka (1 µg)	11
Random heksameri-prajmeri (15-20 pmol)	1
5 x reakcioni pufer	4
RNKaze inhibitor (20 U/µl)	1
dNTP miks (10 mM)	2
Reverzna transkriptaza (200 U/µl)	1
Ukupno	20

### 3.10.4. PCR amplifikacija

Dobijena cDNK (50 ng/µl) je umnožavana PCR-om pomoću *eEF1A* specifičnih prajmera za određene transkripte *eEF1A* gena prikazanih u **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Sekvence prajmera za amplifikaciju *eEF1A* transkripta. *f*-forward; *r*-reverse.

Naziv transkrip.	Pristupni broj	Sorta/ klon krompira	Dužina transk. (bp)	Sekvenca prajmera (5' → 3')
<i>eEF1A-1</i>	PGSC0003DMT 400059830 (EnsemblPlants)	DM1-3 516 R44	1676	<i>f</i> GTATAATGCAGTTTCTTAGTCTCTC <i>r</i> CAATGGTGATACCACGCTCA
<i>eEF1A-2</i>	PGSC0003DMT 400059832 (EnsemblPlants)	DM1-3 516 R44	1602	<i>f</i> TTGACAAGAAGGACCCA <i>r</i> ATCAAGCAACTTGGACAGGA



Nastavak **Tabele 5.**

<i>eEF1A-3</i>	PGSC0003DMT 400053553 (EnsemblPlants) PGSC0003DMT 400053554 (EnsemblPlants)	DM 1-3 516 R44	1656  1649	<i>f</i> AAGTGTGCTATCAAGACTCTGT <i>r</i> ATATCCTGAGGCACCTGGAA
<i>eEF1A-4</i>	PGSC0003DMT 400053547 (EnsemblPlants)	DM1-3 516 R44	1737	<i>f</i> GTTGACAAGAAGGACCCA <i>r</i> GCCCATCAAGTAATTTGGTCA
<i>eEF1A-5</i>	PGSC0003DMT 400020968 (EnsemblPlants) PGSC0003DMT 400020969 (EnsemblPlants)	DM1-3 516 R44	1704  1696	<i>f</i> CCCTACTGGTGCCAAAGTC <i>r</i> CTTCTGGAGCCGTGTCTAT
<i>eEF1A-6</i>	PGSC0003DMT 400050663 (EnsemblPlants) PGSC0003DMT 400050664 (EnsemblPlants)	DM 1-3 516 R44	1726  1707	<i>f</i> AACCTAAGAGGCCCTCGG <i>r</i> GATGACCTGAGCGGTGAAG
<i>eEF1A-7</i>	AJ536671.1 (GenBank)	Désirée	1753	<i>f</i> ATCACTTTTGCTGTAATTCCT <i>r</i> AGATCAAGTGACCAGTTGTG
<i>eEF1A-8</i>	DQ222490.1 (GenBank)	Kuras klon 098G02	1723	<i>f</i> GTTGACAAGAAGGACCCA <i>r</i> CCACCATGGAAAACAAACCA
<i>eEF1A-9</i>	DQ228328.1 (GenBank)	Kuras klon 135G05	1708	<i>f</i> GTTGACAAGAAGGACCCA <i>r</i> TTTGGTTCTCAATTACTCCAC
<i>eEF1A-10</i>	DQ268854.1 (GenBank)	Kuras klon 171A01	1678	<i>f</i> GTTGACAAGAAGGACCCA <i>r</i> GACAAAATATAGCAGAAGTAAA
<i>eEF1A-11</i>	DQ284495.1 (GenBank)	Kuras klon 135G03	1621	<i>f</i> CCCTACTGGTGCCAAAGTC <i>r</i> CTTCTGGAGCCGTGTCTAT
<i>eEF1A-12</i>	DQ228347.1 (GenBank)	Kuras klon 149A09	1691	<i>f</i> GTTGACAAGAAGGACCCA <i>r</i> GGAGTCTGAGATGAGCACAC

Sve PCR reakcije ukupne zapremine 20  $\mu$ l su postavljene prema protokolu za Allin Red Taq Mastermix, 2x (highQu, Krajshtal, Nemačka). Sastav reakcione smeše je prikazan u **Tabeli 6**.

**Tabela 6.** Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije.

<b>Komponente</b>	<b><math>\mu</math>l</b>
cDNK iz prethodnog koraka (50 ng)	0,5
Prajmer F+R (7,5 $\mu$ M)	1
Allin Red Taq Mastermix, 2x	10
PCR voda	8,5
Ukupno	20

Za PCR amplifikaciju je korišćen aparat 2720 Thermal Cycler. Veličina amplikona je proverena nakon elektroforeze. Elektroforeza je vršena na aparatu za horizontalnu forezu (CompactL/XL Biometra, Getingen, Nemačka). Kako Mastermix već u sebi sadrži boju, uzorci su odmah lodirani u bunariće na agaroznom gelu po završetku PCR-a, a uslovi za elektroforezu i vizuelizacija su bili identični kao i radi provere kvaliteta izolovane RNK. Za utvrđivanje veličine fragmenata korišćen je DNK markeri O'GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Voltam, Masačusets). Gelovi su nakon foreze fotografisani na transluminatoru. Dužina svakog fragmenta određena je softverskim programom ImageJ (v 5.2.5 National Institutes of Health, Betesda, Merilend).

Uslovi amplifikacije su bili sledeći:

- inicijalna denaturacija (10 min, 95 °C),
- denaturacija 40 ciklusa (30 s, 95 °C),
- vezivanje prajmera 40 ciklusa (30 s, 56 °C),
- elongacija 40 ciklusa (30 s, 72 °C),
- finalna elongacija (10 min, 72 °C),
- na kraju hlađenje do +4 °C.

### 3.11. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR)

#### 3.11.1. Pripremanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju prečišćavanjem PCR produkata sa gela

Standardi za qPCR su pripremljeni prečišćavanjem razdvojenih PCR produkata nakon agarozne gel elektroforeze. Ekstrakcija sa gela i prečišćavanje PCR produkata je urađeno korišćenjem GeneJET Gel Extraction kit (Fermentas, Voltam, Masačusets) prema uputstvu proizvođača. Trake na gelu su vizualizovane pod UV svetlom, isečene sterilnim skalpelom i prebačene u sterilne mikrotube od 1,5 ml nakon čega je dodata određena zapremina vezivnog pufera (eng. *Binding buffer*) koja odgovara izmerenoj masi isečene trake. Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na 60 °C do rastvaranja gela. Nakon što se gel rastvorio, dodat je 100% izopropanol u odnosu 1:2 (v/v) i uzorci su vorteksovani 5 s, a zatim naneti na kolone za prečišćavanje (eng. *Purification column*) i centrifugirani 60 s na 10000xg. Filtrat je odbačen, a na vrh kolone je dodato po 700 µl pufera za ispiranje (eng. *Wash buffer*) i centrifugirano je potom 60 s na 10000xg. Filtrat je odbačen, a kolone su još jednom centrifugirane u trajanju od 60 s na 10000xg. PCR fragmenti su eluirani sa kolone dodatkom 50 µl elucionog pufera (eng. *Elution buffer*) i centrifugiranjem 60 s na 10000xg. Spektrofotometrijski je određena koncentracija prečišćenih PCR produkata.

#### 3.11.2. Kvantitativni PCR

Nivo ekspresije analiziranih gena je određen metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR), korišćenjem 5x QPCR Mix EvaGreen (No ROX) (Bio & Sell, Fojht, Nemačka). Bio&SELL-ov 5x QPCR Mix EvaGreen predstavlja smešu Taq-DNK polimeraza, dNTP-ova i EvaGreen boje, bez dodatka referentne boje ROX, u odgovarajućem puferu. Dobijena cDNK nakon reverzne transkripcije je korišćena u qPCR reakciji, a sastav reakcione smeše je prikazan u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Sastav reakcione smeše pojedinačne qPCR reakcije.

Komponenta	$\mu\text{l}$
cDNK (100 ng)	1
Prajmer F+R (7,5 $\mu\text{M}$ )	0,4
5x QPCR Mix EvaGreen	2
PCR voda	6,6
Ukupno	10

Prajmeri korišćeni u qPCR reakcijama su prikazani u **Tabeli 5.**, a radi provere ujednačene količine ukupne cDNK u svim uzorcima, paralelno sa amplifikacijom *eEF1A* genskih transkripta, amplifikovana je i 18S rRNK referentnog gena (GenBank pristupni broj X67238.1). Prajmeri koji su korišćeni za amplifikaciju 18S rRNK su „forward“ 5'-TGACGGAGAATTAGGGTTCG-3' i „reverse“ 5'-CAATGGATCCTCGTTAAGGG-3'.

Sve qPCR reakcije su se odvijale po sledećem postupku:

- inicijalna denaturacija (10 min, 95 °C),
- denaturacija 40 ciklusa (30 s, 95 °C),
- vezivanje prajmera 40 ciklusa (30 s, 56 °C),
- elongacija 40 ciklusa (30 s, 72 °C),
- analiza krive topljenja.

Sve qPCR reakcije su urađene u tri tehnička ponavljanja na sistemu QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets). Inkubacije su praćene analizom topljenja produkata amplifikacije kako bi se utvrdila specifičnost prajmera. Standardi za apsolutnu kvantifikaciju su pripremljeni serijskim razblaživanjem prečišćenih PCR produkata u rasponu od  $10^9$ - $10^2$  kopija dsDNK/ $\mu\text{l}$ . Dobijeni rezultati su analizirani softverskim programom QuantStudio Design&Analysis (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets).

### **3.12. Statistička analiza rezultata**

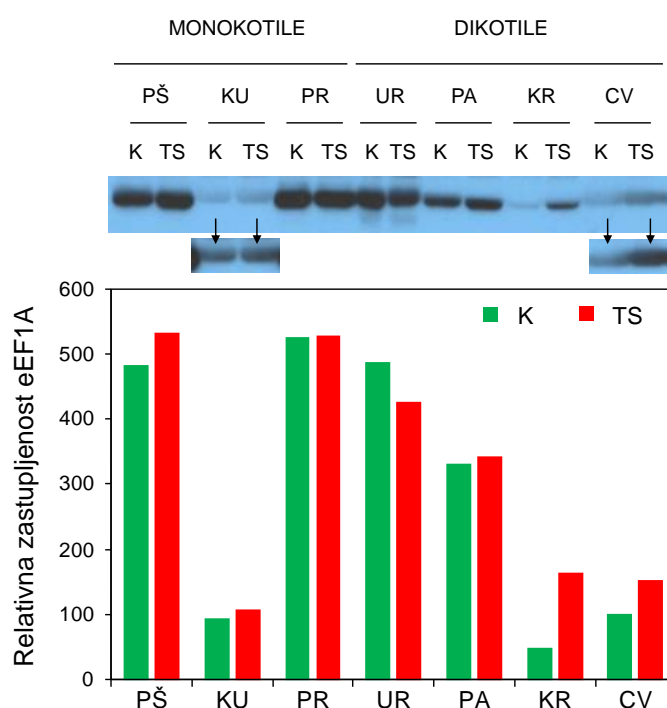
Za statističku obradu podataka korišćen je računarski program IBM SPSS Statistics for Macintosh v. 25 (International Business Machines Corporation, Armonk, Njujork), a podaci su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška (eng. *Standard error*, SE). Dvofaktorijska analiza varijanse (Two-way ANOVA) je korišćena za testiranje faktora temperaturnog tretmana i sorti krompira, kao i interakcija između ova dva faktora na nivou značajnosti  $p < 0,05$ , a potom post hoc Fishers's LSD test radi poređenja grupa, kao i Newman-Keul's test za utvrđivanje homogenih grupa na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Za određivanje statistički značajne razlike između srednjih vrednosti u okviru pojedinih temperaturnih tretmana, gde nije bilo značajne interakcije faktora sorta i temperaturni tretman, korišćena je jednofaktorijska analiza varijanse (One-way ANOVA), a potom post-hoc Newman-Keul's test za utvrđivanje homogenih grupa na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Izračunat je Pearson's koeficijent korelacije između srednjih vrednosti zastupljenosti eEF1A u uslovima visoke temperature tokom dve uzastopne godine i visine primarnih izdanaka, nadzemne biomase, broja i mase krtola i prinosa po plotu kod šest ispitanih sorti krompira; statistička značajnost je utvrđena na nivou  $p < 0,05$ .

Finalna grafička obrada podataka izvršena je korišćenjem računarskog programa Microsoft Office Excell for Macintosh, v. 16.13 (Microsoft Corporation, Redmond, Vašington).

## 4. Rezultati

### 4.1. Ekspresija eEF1A kod različitih vrsta monokotiledonih i dikotiledonih biljaka

Ekspresija eEF1A proteina je prvo analizirana kod različitih vrsta monokotiledonih (pšenica, kukuruz i luk) i dikotiledonih (uročnjak, paradajz, krompir, cvekla) biljaka gajenih *ex vitro*. Nakon 25 dana od pojave prvih listova, biljke su bile izložene kratkotrajnom toplotnom stresu (postepen porast temperature od 23-40 °C prva dva sata, 40 °C tokom 6 h) ili su i dalje gajene na temperaturi od 23 °C. Za analizu su korišćeni prvi potpuno razvijeni listovi (četvrti list od vrha izdanka) uzetih sa pet biljaka, izuzev kod uročnjaka gde su uzimani listovi sa 10 biljaka. Imunoblot analiza zastupljenosti eEF1A u listovima biljaka je pokazala da se zastupljenost ovog proteina u uslovima toplotnog stresa kod pšenice i kukuruza povećala 1,2 puta, a 1,5 puta kod cvekle u odnosu na kontrolu (**Slika 9.**). Najveće povećanje zastupljenosti eEF1A u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu, od 3,4 puta, je detektovano u listovima biljaka krompira.

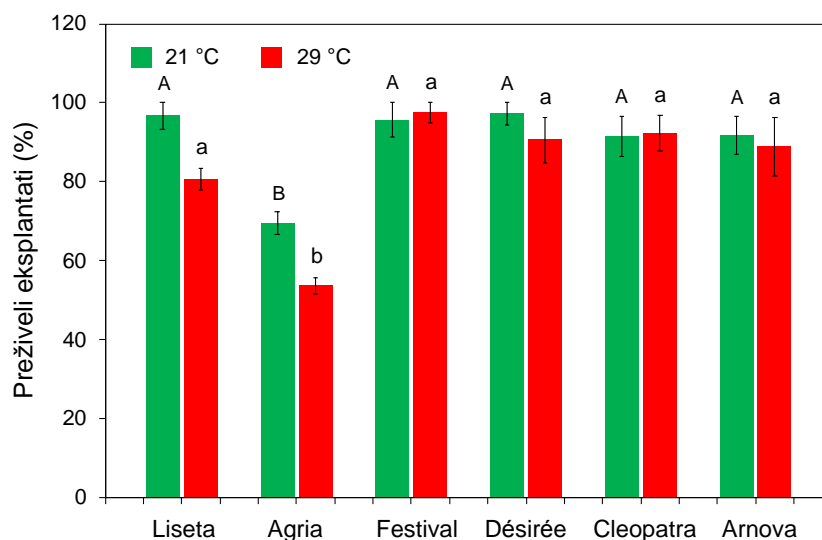


**Slika 9.** Imunoblot analiza ekspresije eEF1A kod različitih vrsta monokotiledonih i dikotiledonih biljaka gajenih *ex vitro*. K - kontrolna temperatura (23 °C); TS - toplotni stres (40 °C, 6 h); PŠ - pšenica; KU - kukuruz, PR - paziluk; UR - uročnjak; PA - paradajz; KR – krompir; CV - cvekla.

#### 4.2. Uticaj temperature na preživljavanje eksplantata i rastenje izdanaka krompira gajenih pod tuber-indukujućim uslovima *in vitro*

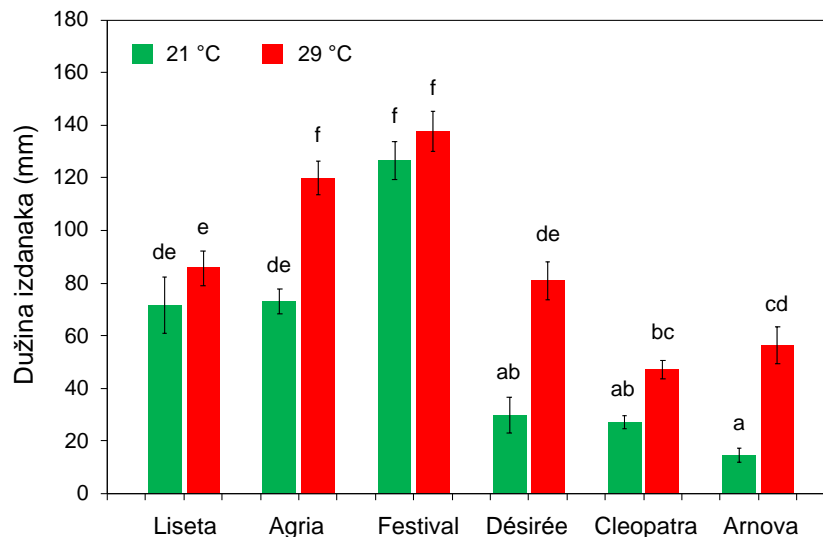
Polazno ispitivanje uticaja temperature na preživljavanje eksplantata i rastenje izdanaka krompira *in vitro* urađeno je kod šest sorti krompira (Liseta, Agria, Festival, Désirée, Cleopatra i Arnova) korišćenjem dva temperaturna tretmana, 21 °C i 29 °C. Eksplantati su gajeni u uslovima koji favorizuju tuberizaciju (stalni mrak i 8% saharoze u osnovnom MS medijumu).

Nakon 30 dana gajenja eksplantata je utvrđeno da temperatura od 29 °C značajno utiče na broj preživelih eksplantata kod ispitanih sorti krompira [ $F(1,12)=7,616$ ,  $p=0,017$ ] (**Slika 10.**). Međutim, značajno veći efekat na preživljavanje eksplantata imao je faktor sorta krompira [ $F(5,12)=16.244$ ,  $p<0,001$ ]. Sorta Agria je imala najmanji procenat preživelih eksplantata u odnosu na ostale sorte krompira na oba temperaturna tretmana. Interakcija faktora sorta i temperaturni tretman nije bila statistički značajna [ $F(5,12)=1,912$ ,  $p=0,166$ ].



**Slika 10.** Uticaj temperature na preživljavanje eksplantata kod različitih sorti krompira. Procenat preživelih eksplantata je prikazano kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Vrednosti označene različitim velikim slovima se statistički razlikuju u okviru tretmana temperaturom od 21 °C, a malim slovima u okviru tretmana temperaturom od 29 °C, na nivou značajnosti  $p<0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom.

Temperatura od 29 °C je uticala i na rastenje izdanaka kod pojedinih sorti krompira [ $F(1,12)=159,345$ ,  $p<0,001$ ] (**Slika 11.**). Tako je značajan uticaj visoke temperature na izduživanje izdanaka zabeležen kod sorti Agria, Désirée i Arnova, dok kod ostalih ispitanih sorti, takav uticaj nije bio značajan. Ustanovljena je značajna interakcija faktora sorta i temperaturni tretman [ $F(5,12)=9,296$ ,  $p=0,001$ ]. Najveće izduživanje izdanaka pod uticajem visoke temperature je zabeleženo kod sorte Arnova kod koje je došlo do izduživanja izdanaka za 3,8 puta u odnosu na temperaturu od 21 °C, potom je sledila sorta Désirée kod koje su izdanci bili duži duži za 2,7 puta, a najmanje izduživanje izdanaka pod uticajem visoke temperature od 1,6 puta u odnosu na temperaturu od 21 °C, je zabeleženo kod sorte Agria. Sličan značaj na izduživanje izdanaka imala je i sorta krompira [ $F(5,12)=42,649$ ,  $p<0,001$ ]. U proseku najduže izdanke je formirala sorta Festival u poređenju sa ostalim sortama, potom su sledile sorte Agria i Liseta sa nešto umereno kraćim izdancima, dok su najkraće izdanke obrazovale sorte Désirée, Cleopatra i Arnova.



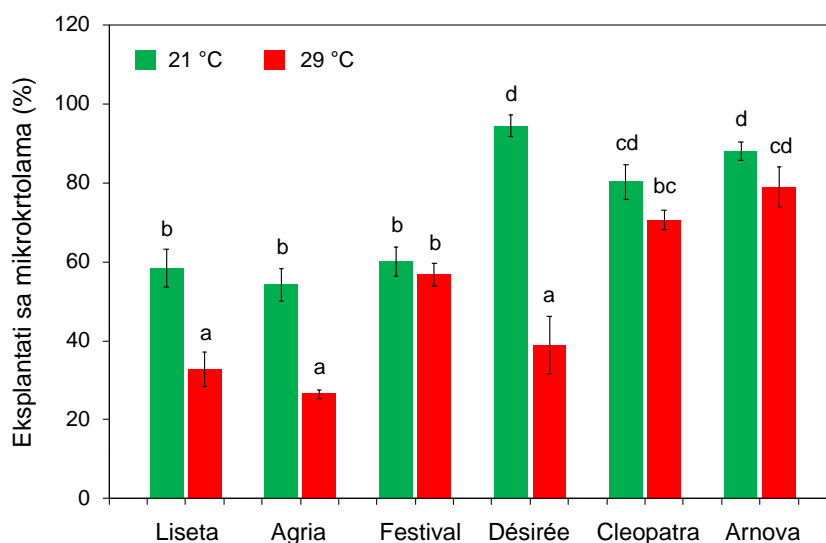
**Slika 11.** Uticaj temperature na rastenje izdanaka kod različitih sorti krompira. Dužina izdanaka je prikazana kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Vrednosti označene različitim slovima se statistički razlikuju na nivou značajnosti  $p<0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom.



Ovi rezultati pokazuju da eksplantati različitih sorti krompira preživljavaju tretman temperaturom od 29 °C, a kod pojedinih sorti krompira dolazi i do značajnog izduživanje izdanaka u uslovima visoke temperature u poređenju sa temperaturom od 21 °C, te se može zaključiti da primenjena visoka temperatura kod ispitanih sorti krompira nije letalna.

#### **4.3. Uticaj temperature na inicijaciju mikroktola krompira gajenih pod tuber-indukujućim uslovima *in vitro***

Kako bi se ispitaio uticaj temperature na formiranje mikroktola u kulturi *in vitro*, ispitani su različiti parametri koji reflektuju različite faze u procesu tuberizacije. Prvi takav parametar je bio procenat eksplantata sa mikroktolama koji odražava inicijaciju tuberizacije. Nakon 30 dana gajenja eksplantata *in vitro*, u uslovima koji favorizuju tuberizaciju (stalni mrak i 8% saharoza u osnovnom MS medijumu), na dva temperaturna tretmana (21 °C i 29 °C), utvrđeno je da je visoka temperatura imala značajnog uticaja na inicijaciju mikroktola kod ispitanih sorti krompira u odnosu na temperaturu od 21 °C [F(1,14)=72,272, p<0,01], ali i to da je postojala značajna razlika među ispitanim sortama u procentu eksplantata sa mikroktolama [F(5,14)=33,819, p<0,01], kao i značajna interakcija faktora sorta i temperaturni tretman [F(5,14)=9,614, p<0,01] (**Slika 12.**). Najveći uticaj visoke temperature na inicijaciju mikroktola je zabeležen kod sorti Liseta, Agria i Désirée, dok kod sorti Festival, Cleopatra i Arnova, procenat eksplantata sa mikroktolama se značajno nije razlikovao između kontrolne i visoke temperature. Najveće smanjenje procenta eksplantata sa mikroktolama od 59% u uslovima visoke temperature u poređenju sa kontrolnom temperaturom je zabeleženo kod sorte Désirée, dok kod sorte Agria takvo smanjenje iznosilo 51%, a kod sorte Liseta 44%. Sorte Agria i Liseta su u proseku imale najmanji procent eksplantata sa mikroktolama u poređenju sa ostalim sortama, a najveći su imale sorte Cleopatra i Arnova.

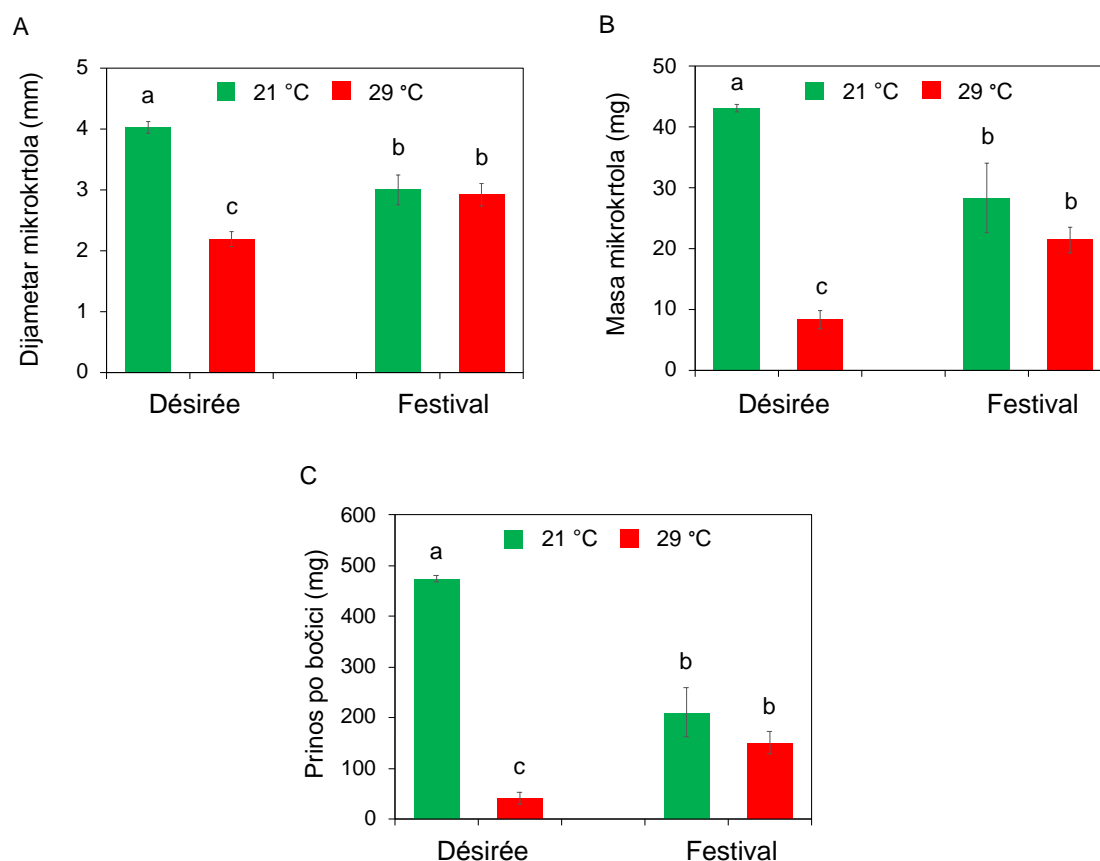


**Slika 12.** Uticaj temperature na inicijaciju mikroktola kod različitih sorti krompira. Procenat eksplantata sa mikroktolama je prikazan kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Vrednosti označene različitim slovima se statistički razlikuju na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom.

Ovi rezultati pokazuju da se proces tuberizacije značajno razlikuje među sortama krompira na oba temperaturna tretmana, kao i to da je kod nekih sorti proces tuberizacije osetljiv na delovanje relativno visoke temperature od 29 °C, dok kod drugih sorti, takav uticaj nije zabeležen. Visoka temperatura najviše remeti inicijaciju mikroktola kod sorte Désirée, a potom i kod sorti Agria i Liseta, dok kod ostalih sorti, nema uticaja na broj iniciranih mikroktola u poređenju sa temperaturom od 21 °C.

#### 4.4. Uticaj visoke temperature na rastenje mikroktola kod odabranih sorti krompira gajenih pod tuber-indukujućim uslovima *in vitro*

U cilju daljeg izučavanja procesa tuberizacije kod krompira, izmereni su sledeći parametri: dijametar, masa i prinos u masi mikroktola, koji se odnose na rastenje mikroktola (**Slika 13.**). Odabrane su dve sorte krompira sa različitim odgovorom na delovanje visoke temperature od 29 °C u fazi inicijacije mikroktola. To su bile sorte Désirée i Festival. Temperatura od 21 °C je dalje razmatrana kao kontrolna.



**Slika 13.** Uticaj visoke temperature na rastenje mikrokrtola kod krompira. Prikazana je masa (A), dijametar (B) i prinos mikrokrtola (C) kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. Vrednosti označene različitim slovima se statistički razlikuju na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom.

Nakon 30 dana gajenja, je ustanovljeno da je tretman od 29 °C značajno više uticao na dijametar [ $F(1,6)=31,389$ ,  $p=0,001$ ] i prinos po bočici [ $F(1,6)=44,899$ ,  $p=0,001$ ], a nešto manje na masu mikrokrtola [ $F(1,6)=29,378$ ,  $p=0,002$ ]. Takođe je utvrđeno, na nivou od  $p < 0,05$ , da postoji statistički značajna interakcija faktora sorta i temperaturni tretman, kao i faktora sorta kod svih izmerenih parametara.

Kod sorte Désirée, dijametar formiranih mikrokrtola je bio znatno veći u kontroli u poređenju sa tretmanom visokom temperaturom (**Slika 13. A**). Sa druge strane, nije zabeležena značajna razlika u dijametru mikrokrtola između kontrole i tretmana visokom temperaturom kod sorte Festival. Takođe, prosečan dijametar mikrokrtola kod sorte Désirée je bio znatno veći u poređenju sa sortom Festival u

---

kontroli, ali sa druge strane znatno manji u poređenju sa sortom Festival u uslovima visoke temperature.

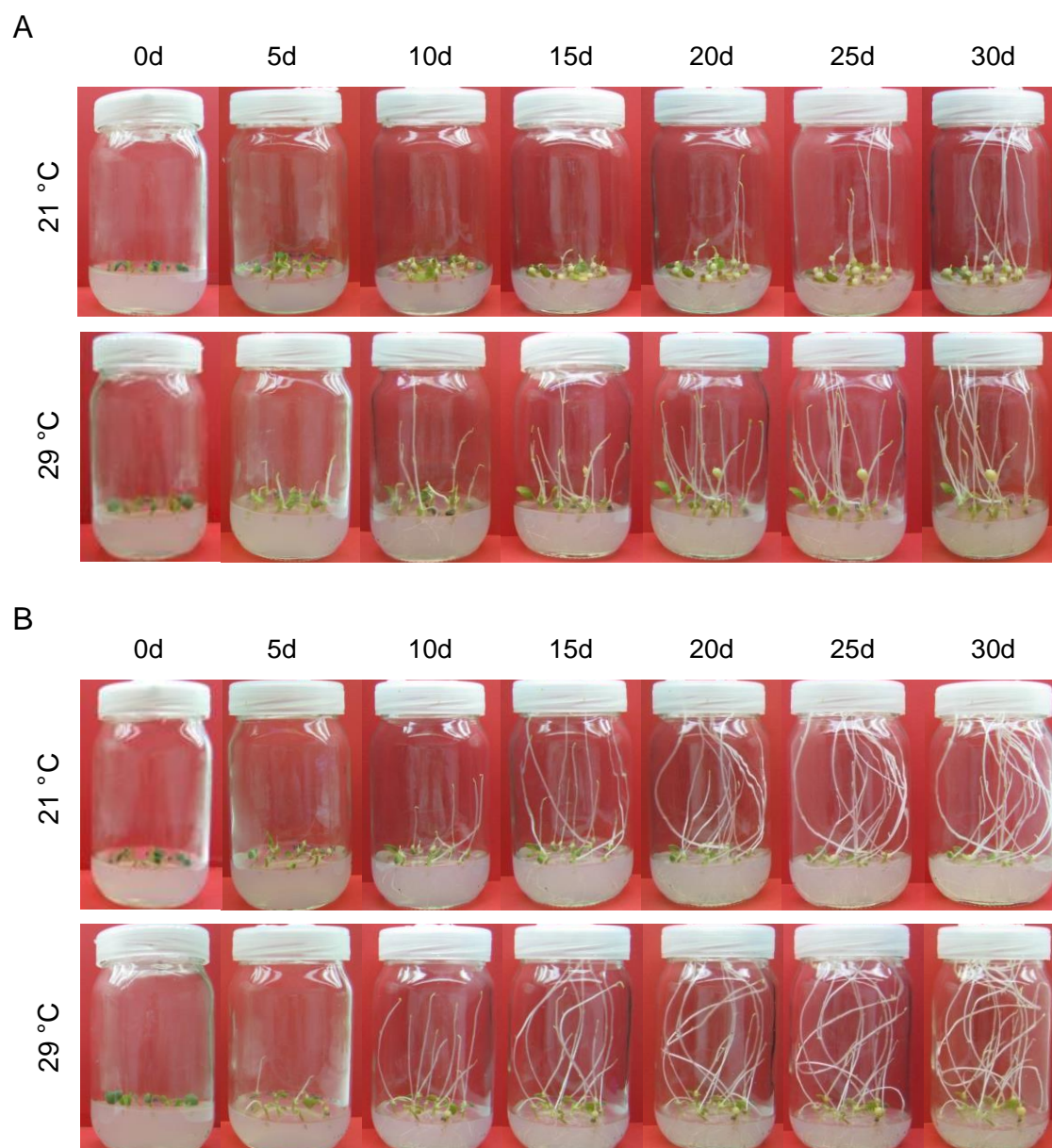
Sličan odgovor sorti je uočen i kada se radilo o masi mikrokrtola. Masa mikrokrtola je bila značajno veća u kontroli u poređenju sa tretmanom visokom temperaturom kod sorte Désirée, dok takva razlika nije ustanovljena kod sorte Festival (**Slika 13. B**). Kada se porede ove dve sorte, masa mikrokrtola je bila znatno veća kod sorte Désirée u odnosu na sortu Festival u kontrolnim uslovima. Međutim, masa mikrokrtola kod sorte Désirée je bila znatno manja u poređenju sa masom mikrokrtola kod sorte Festival tokom delovanja visoke temperature.

Prinos mikrokrtola po bočici je bio značajno veći u kontroli nego u tretmanu visokom temperaturom kod sorte Désirée (**Slika 13. C**). Sa druge strane, kod sorte Festival se prinos po bočici nije značajno razlikovao između kontrolnog i tretmana visokom temperaturom. Značajno veći prinos mikrokrtola po bočici je zabeležen kod sorte Désirée u odnosu na sortu Festival u kontrolnim uslovima. Sa druge strane, u uslovima visoke temperature, sorta Désirée ima prosečan prinos mikrokrtola znatno manji od sorte Festival.

Ovi rezultati pokazuju da su tokom procesa tuberizacije kod sorte Désirée dijametar, masa i prinos mikrokrtola podložni uticaju visoke temperature, što nije slučaj kod sorte Festival.

#### **4.5. Uticaj visoke temperature na dinamiku procesa tuberizacije *in vitro* kod odabranih sorti krompira**

Uticaj visoke temperature (29 °C) na dinamiku procesa tuberizacije je takođe ispitan kod sorti Désirée i Festival koje su gajene *in vitro* u uslovima koji favorizuju tuberizaciju (stalni mrak i 8% saharoza u osnovnom MS medijumu). Osim na visokoj temperaturi, jednodalni odsecci stabla krompira su gajeni i na kontrolnoj temperaturi (21 °C). Radi utvrđivanja dinamike formiranja mikrokrtola na jednodalnim odseccima stabla krompira, određivan je broj mikrokrtola po teglici u intervalima od pet dana tokom 30 dana gajenja *in vitro* na oba temperaturna tretmana (**Slike 14. i 15.**).

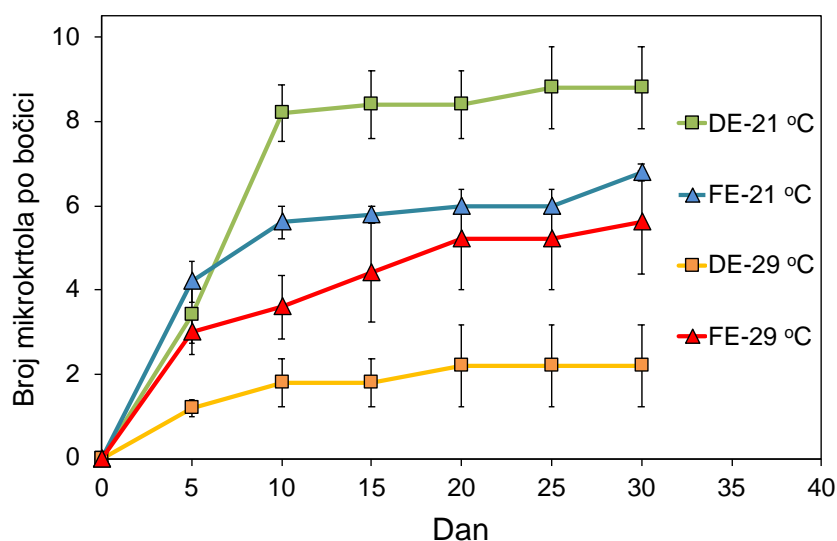


**Slika 14.** Tuberezacija kod dve sorte krompira, Désirée (A) i Festival (B).

Kod sorte Désirée na temperaturi od 21 °C, favorizovano je formiranje mikrokrtola u odnosu na rastenje i razviće izdanaka do 15 dana gajenja (Slika 14. A). Kod druge sorte krompira, Festival, na istoj temperaturi, došlo je do formiranja nekoliko mikrokrtola, a rastenje i razviće izdanaka su započeli već desetog dana (Slika 14. B). Izdanci su se često razvijali na mikrokrtolama, što je označavalo prekid dormancije (Slika 14. A i B). Visoka temperatura od 29 °C favorizovala je rastenje i razviće

izdanaka u odnosu na mikrokrtole kod sorte Désirée (Slika 14. A). Na temperaturi od 29 °C razvijeni izdanci su uočeni kod obe sorte krompira, već nakon petog dana gajenja.

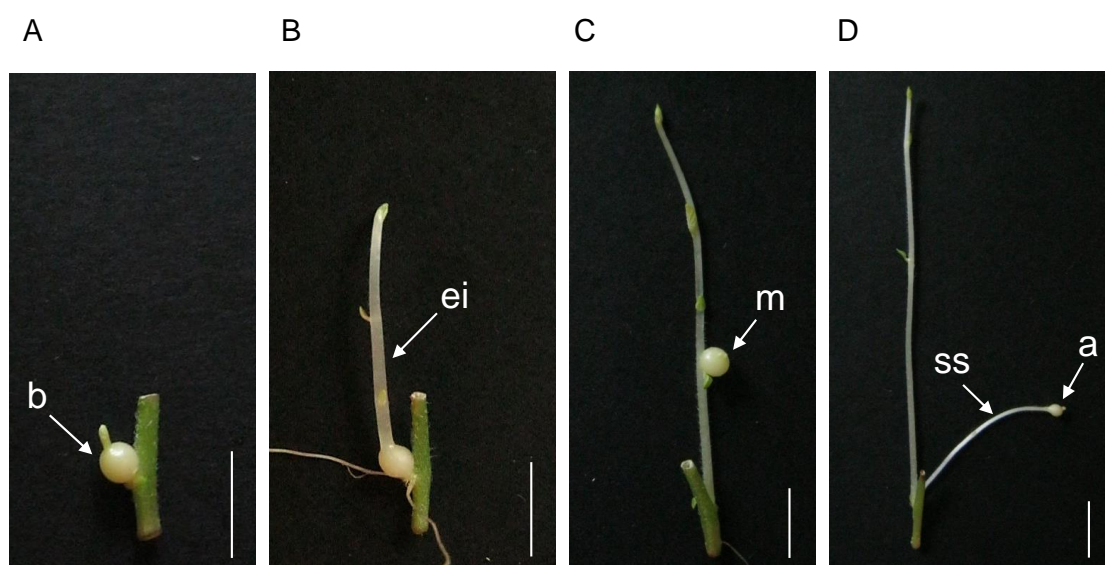
Eksplanti obe sorte krompira razvili su mikrokrtole tokom prvih 5 dana gajenja, na obe temperature, mada se odnos broja formiranih mikrokrtola između dva temperaturna tretmana razlikovao kod sorti (Slika 15.). Obe sorte krompira, Désirée i Festival, dostigle su finalni broj mikrokrtola desetog dana gajenja i to na oba temperaturna tretmana; broj mikrokrtola se dalje značajno nije menjao. Kod sorte Désirée, broj mikrokrtola je bio znatno veći na kontrolnoj temperaturi (21 °C) nego na visokoj temperaturi (29 °C). Sa druge strane, kod sorte Festival, broj mikrokrtola se nije značajno menjao između dve temperature na svim vremenskim tačkama. Broj formiranih mikrokrtola kod sorte Festival je bio približno duplo veći u poređenju sa sortom Désirée tokom svih vremenskih tačaka na 29 °C, dok je pri temperaturi od 21 °C sorta Désirée formirala mnogo više mikrokrtola po teglici nego sorta Festival u većini vremenskih tačaka.



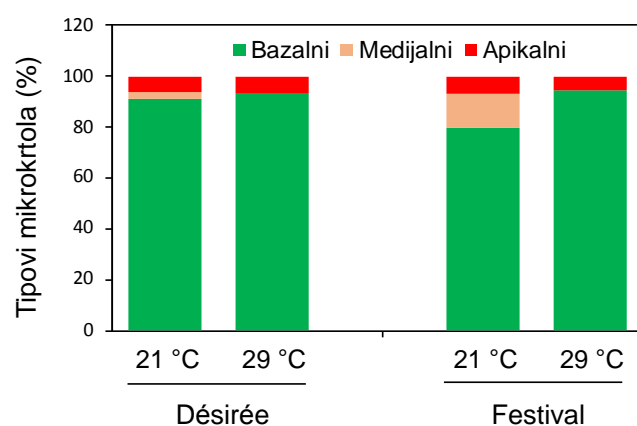
**Slika 15.** Uticaj visoke temperature na dinamiku tuberizacije kod krompira u uslovima *in vitro*. Na slici su predstavljene srednje vrednosti  $\pm$  SE. DE - Désirée i FE - Festival.

#### 4.5.1. Distribucija različitih tipova mikrokrtola

Analizirana je distribucija različitih tipova mikrokrtola formiranih *in vitro* kod sorti Désirée i Festival na kontrolnoj temperaturi (21 °C) i visokoj temperaturi (29 °C) u uslovima koji favorizuju tuberizaciju. Kod obe sorte krompira, Désirée i Festival, glavni tip mikrokrtola koji se formirao je bio sesilni (Slike 14., 16. i 17.). Ovaj tip mikrokrtola se formira uvećanjem subapikalnog regiona pazušnih pupoljaka bez prethodnog obrazovanja stolona. Sesilne mikrokrtole koje su se direktno obrazovale iz pazušnih pupoljaka jednonodalnih odsečaka stabla su označene kao bazalne mikrokrtole (Slika 16. A). Sa druge strane, sesilne mikrokrtole, razvijene iz pazušnih pupoljaka izdanaka, po njihovom formiranju, su označene kao medijalne (Slika 16. C). Mikrokrtole na vršnim delovima izdanaka, su označene kao apikalne i one su činile samo  $\leq 6\%$  od ukupno formiranih mikrokrtola na oba temperaturna tretmana (Slike 16. D i 17.).



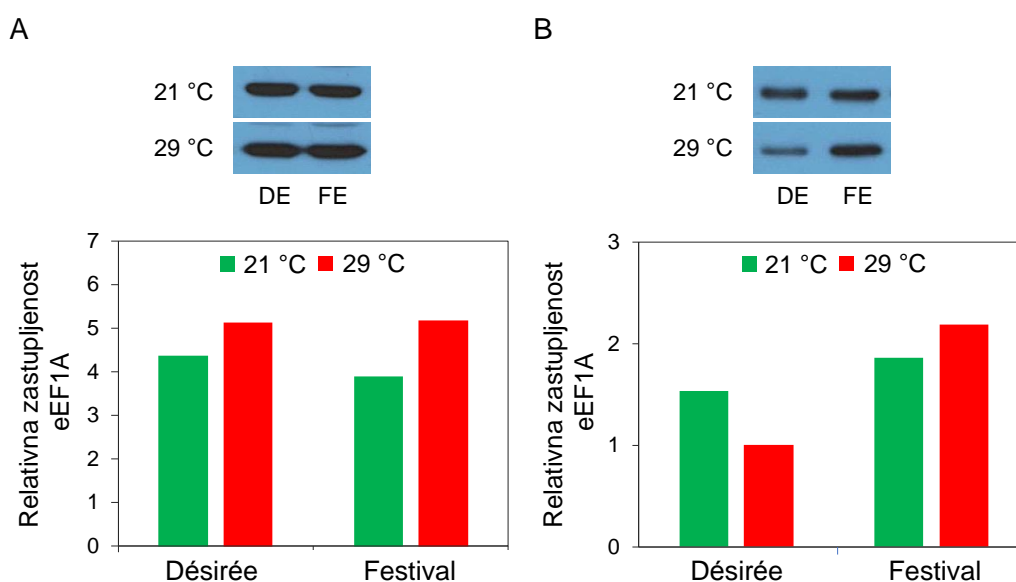
**Slika 16.** Mikrokrtole na jednonodalnim odsečcima izdanaka sorte Désirée gajenih *in vitro*. Obrazovana bazalna mikrokrtola (A), etiolirani izdanak na bazalnoj mikrokrtoli (B), medijalna mikrokrtola (C) i mikrokrtole na apeksu stolonu-sličnim izdancima (D). b - bazalna mikrokrtola; ei - etiolirani izdanak; m - medijalna mikrokrtola; ss - stolon-sličan izdanak; a - apikalna mikrokrtola. Bar linija = 1 cm.



**Slika 17.** Zastupljenost pojedinih tipova mikrotubula kod sorti krompira Désirée i Festival formiranih na temperaturama od 21 °C i 29 °C u tuber-indukujućim uslovima *in vitro*.

#### 4.6. Uticaj visoke temperature na zastupljenost eEF1A i HSP kod odabranih sorti krompira

Ekspresija eEF1A je ispitivana imunoblot metodom na nivou proteina u mikrotubolama i izdancima sorti krompira Désirée i Festival gajenih pod tuber-indukujućim uslovima *in vitro* na dva temperaturna tretmana (21 °C, kontrola i 29 °C, visoka temperatura) (**Slika 18.**).

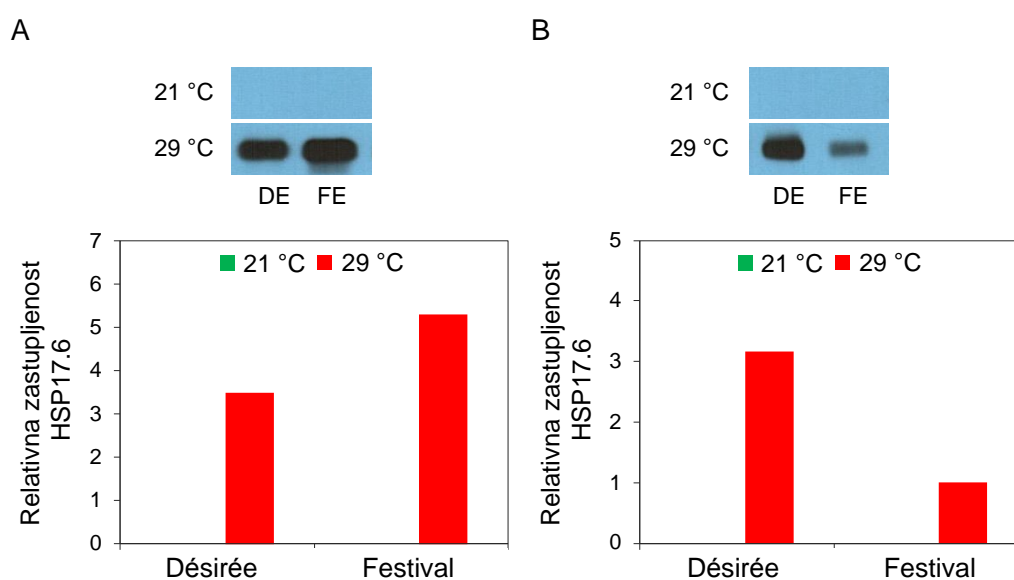


**Slika 18.** Uticaj temperature na relativnu zastupljenost eEF1A u izdancima (A) i mikrotubolama (B) kod krompira. DE - Désirée; FE - Festival.



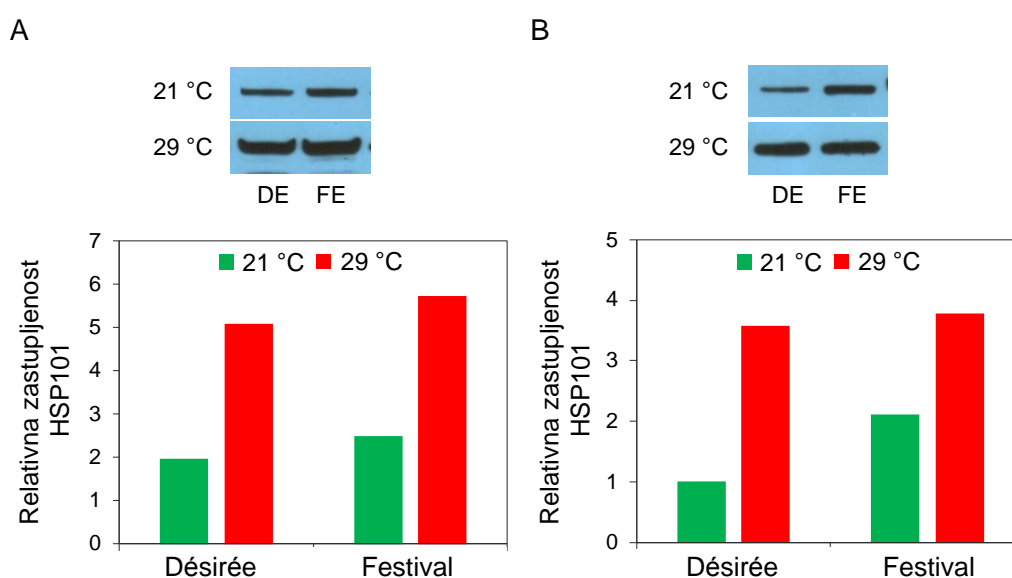
Rezultati imunoblot analize su pokazali da je visoka temperatura dovela do povećanja akumulacije ovog proteina u izdancima kod ispitanih sorti krompira, odnosno 1,2 puta veća količina je detektovana kod sorte Désirée i 1,3 puta veća količina kod sorte Festival na 29 °C u poređenju sa kontrolom. (Slika 18. A). Ova analiza je dalje pokazala da je došlo i do povećanja zastupljenosti eEF1A u mikrokrtolama kod sorte krompira Festival u uslovima visoke temperature u poređenju sa kontrolom, dok je sa druge strane, kod sorte Désirée, visoka temperatura dovela do pada zastupljenosti eEF1A (Slika 18. B). Takođe, u mikrokrtolama sorte Festival je detektovano oko 2,2 puta više proteina eEF1A u poređenju sa zastupljenošću ovog proteina u mikrokrtolama kod sorte Désirée u uslovima visoke temperature.

Dalje je analizirana i ekspresija HSP17.6 i HSP101, poznatih zaštitnih proteina čija akumulacija u uslovima toplotnog stresa značajno doprinosi termotoleranciji biljaka. Imunoblot analiza ekspresije proteina HSP17.6, je pokazala da je visoka temperatura dovela do povećanja akumulacije ovih proteina u izdancima i mikrokrtolama kod ispitanih sorti krompira, dok na kontrolnoj temperaturi nije detektovano prisustvo ovih proteina (Slika 19. A i B).



**Slika 19.** Uticaj temperature na relativnu zastupljenost HSP17.6 u izdancima (A) i mikrokrtolama (B) kod krompira. DE - Désirée; FE - Festival.

U uslovima visoke temperature, detektovana je 1,5 puta veća zastupljenost HSP17,6 u izdancima kod sorte Festival u poređenju sa sortom Désirée, dok je u mikrokrtolama sorte Désirée akumulirala tri puta više HSP17.6 u poređenju sa sortom Festival. Sa druge strane, protein HSP101 je detektovan, kako u izdancima, tako i u mikrokrtolama kod obe sorte krompira na oba temperaturna tretmana (**Slika 20.** A i B). U uslovima visoke temperature, detektovano je 2,6 puta kod sorte Désirée i 2,3 puta kod sorte Festival veća količina ovog proteina u izdancima u odnosu na kontrolu. U mikrokrtolama tokom tretmana visokom temperaturom došlo je do akumulacije 3,6 puta veće količine HSP101 kod sorte Désirée i 1,8 puta veće količine ovog proteina kod sorte Festival u poređenju sa kontrolom.



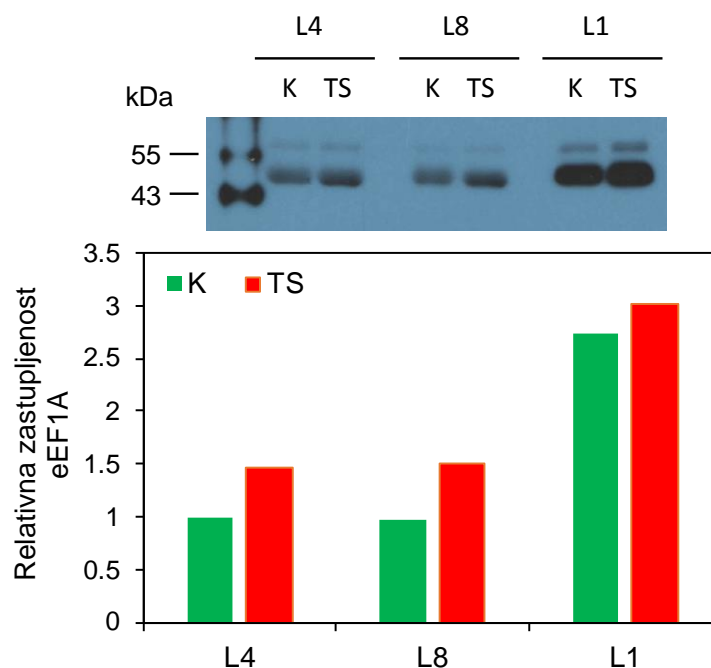
**Slika 20.** Uticaj temperature na relativnu zastupljenost HSP101 u izdancima (A) i mikrokrtolama (B) kod krompira. DE - Désirée; FE - Festival.

#### 4.7. Uticaj visoke temperature na rastenje, tuberizaciju i ekspresiju eEF1A u biljkama krompira gajenim *ex vitro*

##### 4.7.1. 1D- i 2D-imunoblot analiza eEF1A u listovima sorte Désirée pri kratkotrajnom toplotnom stresu

Kako je sorta Désirée najprorasprostranjenija kultivisana sorta krompira, a čiji su izdanci u uslovima toplotnog stresa pokazali akumulaciju eEF1A, urađena je detaljnija analiza eEF1A u listovima biljaka koje su gajene u *ex vitro* uslovima. Biljke su rasle 30 dana u klimatizovanoj sobi na temperaturi od 23 °C, a onda su izložene kratkotrajnom toplotnom stresu (postepen porast temperature od 23-40 °C prva dva sata, 40 °C tokom 6 h) ili su dalje gajene na temperaturi od 23 °C. Za analizu su korišćeni listovi različitih starosti: prvi list (najmlađi), četvrti list (prvi potpuno razvijeni list) i osmi list (najstariji list) od vrha izdanka, prikupljeni od pet biljaka.

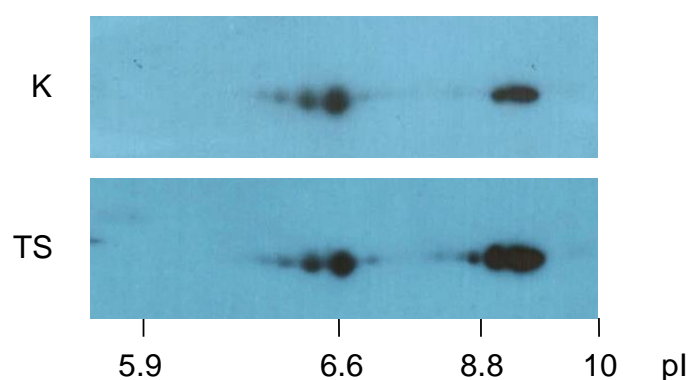
1D-imunoblot analiza je pokazala da je protein eEF1A kod sorte Désirée prisutan u listovima kao jedna proteinska traka, približne molekulske mase od 49,2 kDa (Slika 21.).



**Slika 21.** Imunoblot analiza zastupljenosti eEF1A u listovima krompira. Brojevi 1, 4 i 8 se odnose na poziciju (starost) listova od vrha ka bazi nadzemnog dela izdanka. K - kontrolna temperatura (23 °C); TS - toplotni stres (40 °C, 6 h); L - listovi.

Mladi listovi koji su se još razvijali i u kojima se intenzivno odigrava sinteza proteina, imali su i do 2,8 puta veću zastupljenost ovog proteina u kontrolnim uslovima, a do 2,0 puta veću zastupljenost u uslovima visoke temperature u odnosu na potpuno razvijene ili starije listove. Međutim u ovim listovima je došlo do najmanje indukcije sinteze u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu i u poređenju sa ostalim analiziranim listovima, te je tako detektovano povećanje od 1,1 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu u ovim najmlađim listovima. Nivo sinteze eEF1A se smanjuje u listovima koji su potpuno razvijeni i stariji, ali se ekspresija ovog proteina pojačava u uslovima toplotnog stresa, što je i detektovano povećanjem zastupljenosti eEF1A od 1,5 puta, kako u prvim potpuno razvijenim, tako i u najstarijim listovima u uslovima toplotnog stresa u poređenju sa kontrolom.

Rezultati 2D-imunoblot analize su pokazali da se proteinska traka eEF1A od 49,2 kDa sastoji od 7-8 polipeptida (**Slika 22.**) kod potpuno razvijenih listova, i to od 2-3 polipeptida čija izoelektrična tačka (pI) iznosi 8,8-9,5 (bazna grupa) i 5 polipeptida čija je pI vrednost 6-7 (kisela grupa). Povećanje zastupljenosti eEF1A tokom tretmana visokom temperaturom, može biti posledica akumulacije polipeptida/izoformi iz bazne grupe. Jedna od proteinskih tačaka iz bazne grupe (pI 8,8) je detektovana samo u listovima biljaka koje su bile izložene visokoj temperaturi, dok su druge dve tačke iz iste grupe pokazale značajno višu zastupljenost u uslovima toplotnog stresa.



**Slika 22.** 2D-imunoblot analiza izoformi eEF1A u potpuno razvijenim listovima krompira. K - kontrolna temperatura (23 °C); TS - toplotni stres (40 °C, 6 h).

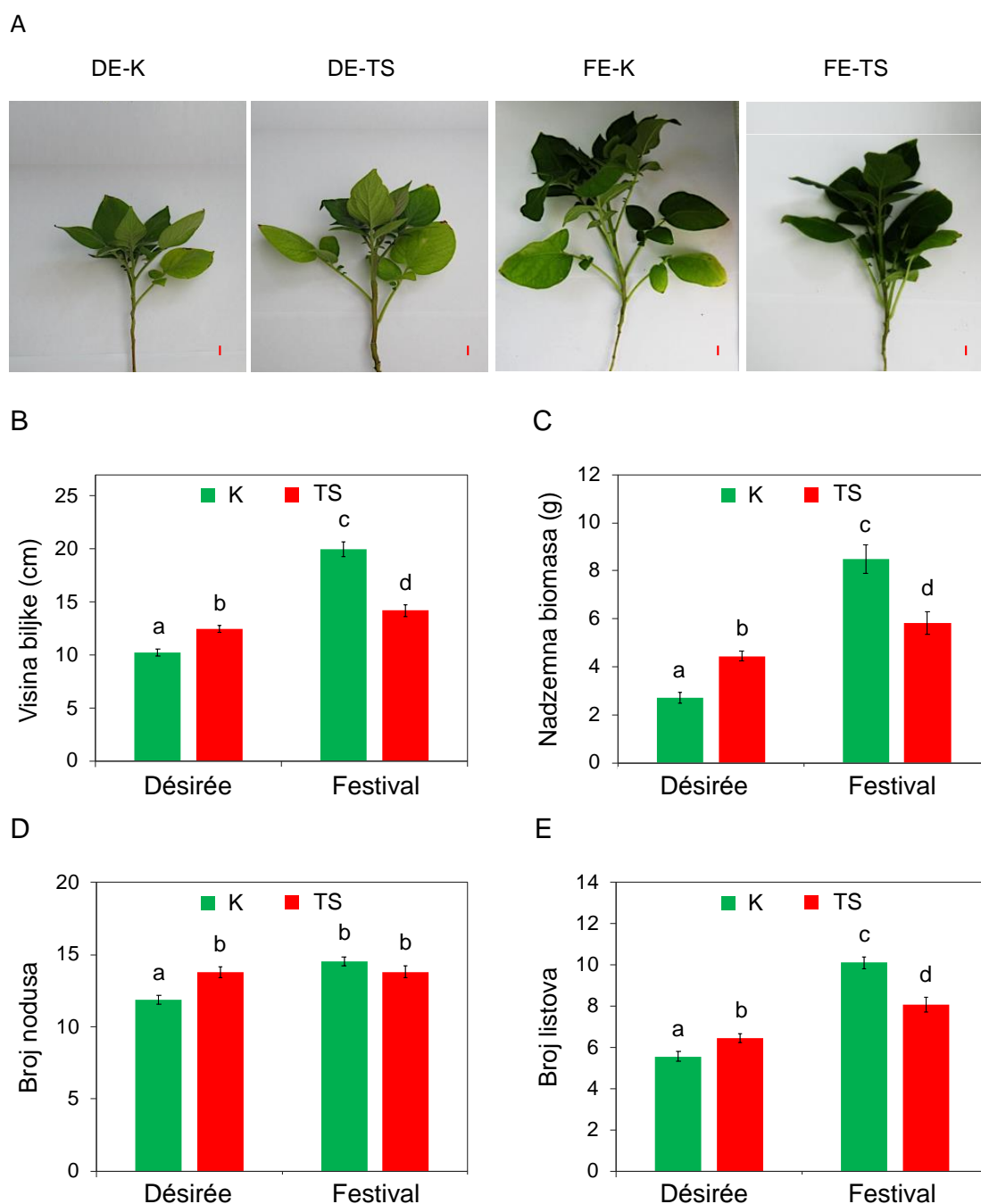
---

## 4.7.2 Rastenje, tuberizacija i ekspresija eEF1A kod biljaka sorti Désirée i Festival u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa

### 4.7.2.1 Rastenje biljaka sorti Désirée i Festival u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa

Uticaj visoke temperature na rastenje i razviće nadzemnog dela biljaka krompira sorti Désirée i Festival ispitivan je u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa *ex vitro*. Biljke su prvobitno rasle na temperaturnom režimu od 20/18 °C, dan/noć, a potom su bile izložene temperaturnom režimu od 30/24 °C, dan/noć (toplotni stres) u trajanju od 7 dana. Kod biljaka krompira starih 40 dana, sa oba temperaturna režima, određena je visina izdanaka i nadzemna biomasa biljaka, kao i broj nodusa i listova na nadzemnim delovima. Ustanovljeno je, na nivou od  $p < 0,05$ , da postoji značajan uticaj faktora sorta i temperaturni režim, kao i značajna interakcija faktora sorta i temperaturni režim kod svih izmerenih parametara.

Kod sorte Désirée, došlo je do značajnog povećanja visine i sveže nadzemne biomase biljaka, kao i broja nodusa i listova nakon izlaganja toplotnom stresu u odnosu na biljke koje su rasle pod kontrolnim uslovima (**Slika 23.**). Sa druge strane, kod sorte Festival visoka temperatura dovela je do smanjenja visine biljaka, manje produkcije sveže biomase i manjeg broja listova u odnosu na kontrolne uslove, ali ne i broja nodusa. Međutim, biljke sorte Festival bile su više, imale veću nadzemnu biomasu i formirala su veći broj listova, na oba temperaturna režima, u odnosu na sortu Désirée. Ovi rezultati ukazuju da visoka temperatura kod dve ispitivane sorte krompira različito utiče na proces rastenja i razvića.

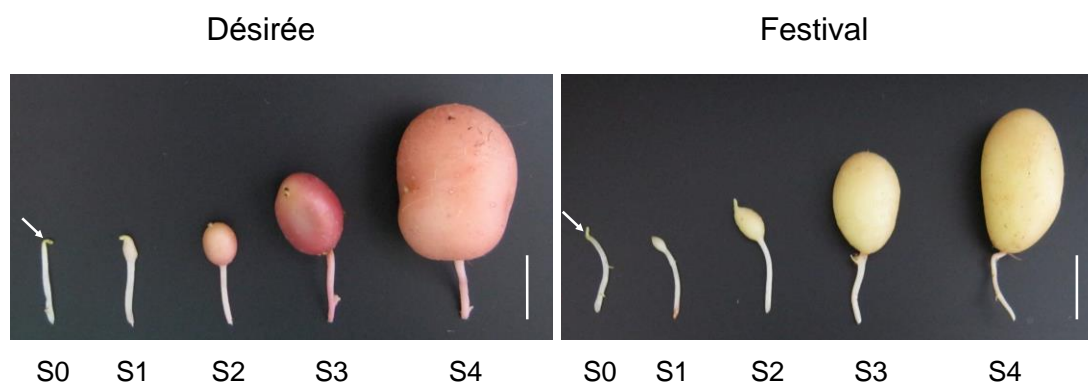


**Slika 23.** Uticaj visoke temperature na rastenje i razviće nadzemnog dela biljaka krompira. Izgled nadzemnog dela biljaka krompira starih 40 dana nakon 7 dana temperaturnog režima od 30/24 °C, dan/noć (TS - toplotni stres) ili 20/18 °C, dan/noć (K - kontrola) (A). Visina biljaka (B), sveža nadzemna biomasa (C), broj nodusa (D) i listova (E). Srednje vrednosti označene različitim slovima se statistički razlikuju na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom. DE - Désirée; FE - Festival - FE. Crvena linija na slici odgovara dužini od 1 cm.

#### 4.7.2.2. Tuberizacija biljaka sorti Désirée i Festival u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa

Radi utvrđivanja uticaja visoke temperature na tuberizaciju kod sorti krompira Désirée i Festival, kod biljaka koje su 7 dana izložene temperaturnom režimu od 30/24 °C, dan/noć (toplotni stres) ili dalje gajene na 20/18 °C, dan/noć (kontrola), određen je broj stolona, broj stolona sa iniciranim minikrtolama, prinos sveže mase i broj minikrtola po biljci, kao i ukupan broj i broj formiranih minikrtola po kategorijama veličina (<5 mm, 5-10 mm, 10-15 mm, 15-20 mm i >20 mm) i sveža masa minikrtola za svaku kategoriju veličine.

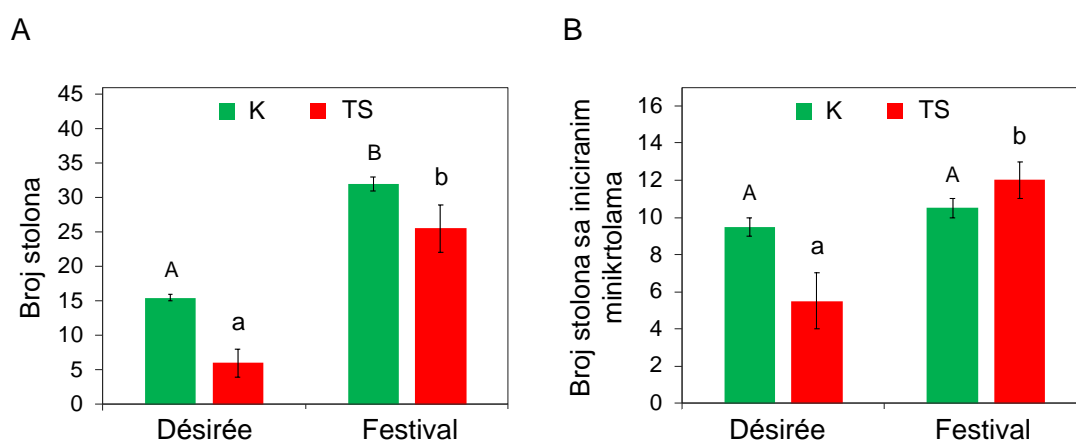
Na podzemnom delu biljaka krompira sorte Désirée i Festival, oslobođenom od supstrata, uočeni su stoloni koji su pokazivali tipičnu morfologiju uključujući i „kuku“ koja razdvaja apikalni region od subapikalnog (**Slika 24.**). Kod ovakvih stolona nije bilo znakova zadebljavanja vrhova i oni su još uvek rasli longitudinalno (S0). Pored ovakvih stolona, uočeni su i stoloni u različitim stadijumima zadebljanih vrhova (S1 i S2), kao i oni kod kojih se isticalo progresivno inkorporisanje apikalnog regiona stolona u rastuću minikrtolu (S3 i S4).



**Slika 24.** Različite faze u formiranju minikrtola kod krompira gajenih *ex vitro*. Od S0-S4 su označene faze koje oslikavaju proces tuberizacije. Karakteristična „kuka“ stolona je označena strelicom. Objašnjenje slike je dato u tekstu. Bar linija = 1 cm.

Kod biljaka sorte Festival je ustanovljeno pri kontrolnim uslovima 2,1 put veći broj formiranih stolona i 4,3 puta veći broj u uslovima toplotnog stresa u odnosu na

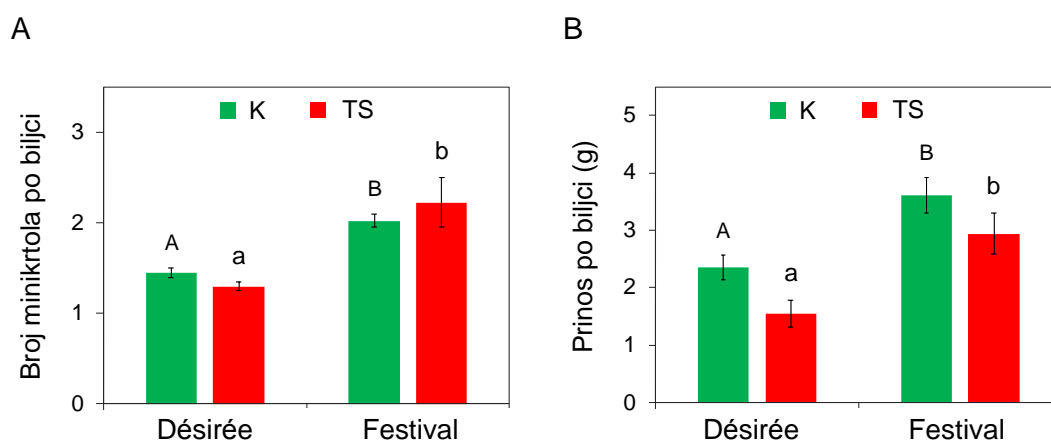
sortu Désirée (**Slika 25. A**). Razlika u broju stolona sa iniciranim minikrtolama između dve ispitivane sorte krompira u kontrolnim uslovima nije bila značajna, dok je u uslovima toplotnog stresa, sorta Festival imala 2,2 puta veći broj stolona sa iniciranim minikrtolama u odnosu na sortu Désirée (**Slika 25. B**). Interakcija faktora sorta i temperaturni režim nije bio statistički značajan kod ovih izmerenih parametara ( $p > 0,05$ ).



**Slika 25.** Uticaj visoke temperature na broj stolona (A) i stolana sa iniciranim minikrtolama (B) kod krompira. Sve vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. Srednje vrednosti označene različitim velikim slovima se statistički razlikuju u okviru kontrolnog tretmana, a različitim malim slovima u okviru toplotnog stresa, na nivou značajnosti  $p < 0,05$  ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom. K - kontrolni uslovi; TS - toplotni stres.

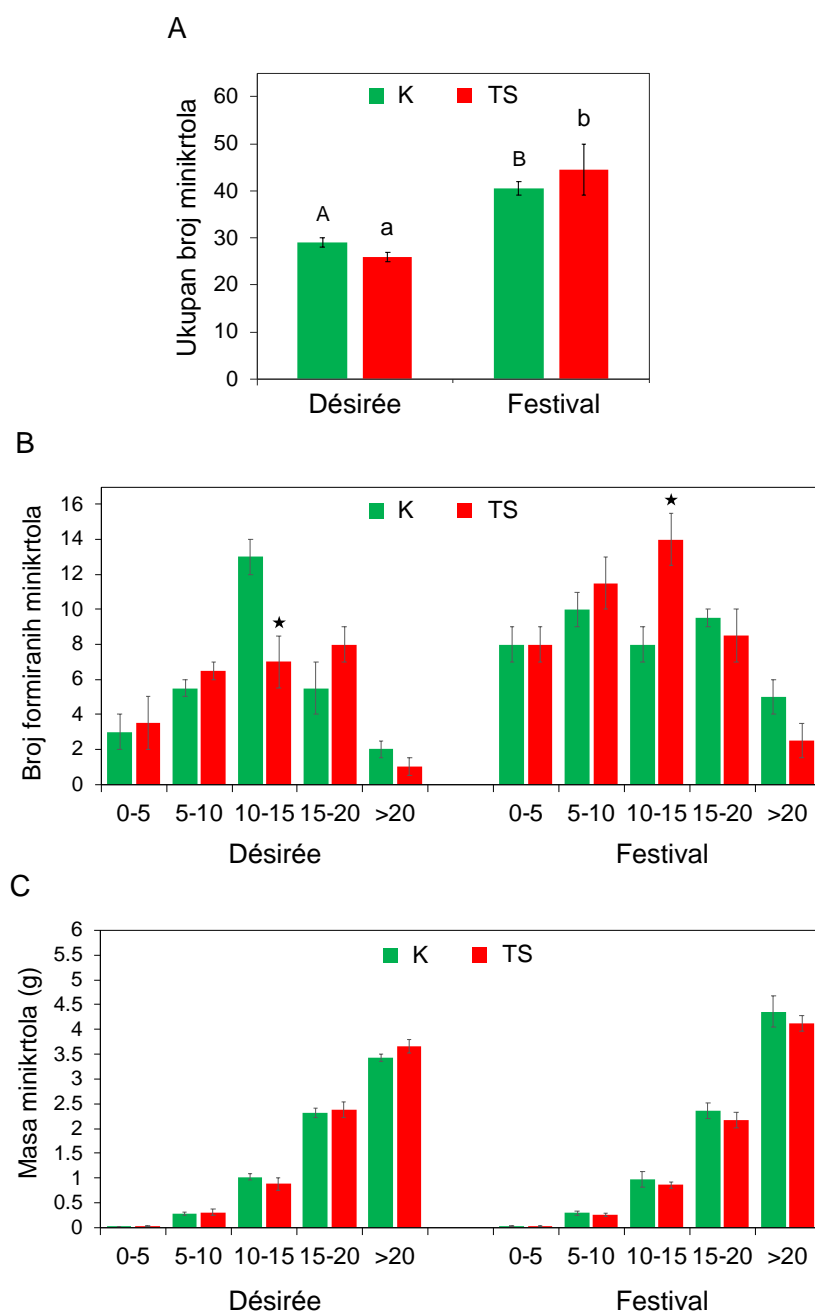
Pri kontrolnim uslovima, ali i u uslovima toplotnog stresa, sorte Désirée i Festival su se znatno razlikovale u broju formiranih i prinosu sveže mase minikrtola po biljci (**Slika 26.**). Interakcija faktora sorta i temperaturni režim nije bio statistički značajan kod ovih izmerenih parametara ( $p > 0,05$ ). U kontrolnim uslovima sorta krompira Festival formirala je 1,4 puta i u uslovima toplotnog stresa 1,7 puta veći broj minikrtola u odnosu na sortu Désirée (**Slika 26. A**). Takođe sorta Festival imala je prinos u svežoj masi minikrtola koji je bio 1,5 puta u kontrolnim uslovima i 1,9 puta u uslovima toplotnog stresa veći u odnosu na sortu Désirée (**Slika 26. B**).





**Slika 26.** Uticaj visoke temperature na broj minikrtola (A) i prinos u masi po biljci (B) kod krompira. Sve vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. Srednje vrednosti označene različitim velikim slovima se statistički razlikuju u okviru kontrolnog tretmana, a različitim malim slovima u okviru toplotnog stresa, na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom. K - kontrolni uslovi; TS - toplotni stres.

Pri kontrolnim uslovima, ali i u uslovima toplotnog stresa, sorte Désirée i Festival su se znatno razlikovale u broju ukupno formiranih minikrtola (**Slika 27. A**). Interakcija faktora sorta i temperaturni režim nije bio statistički značajan kod ovog izmerenog parametra ( $p > 0,05$ ). U kontrolnim uslovima sorta krompira Festival formirala je 1,4 puta i u uslovima toplotnog stresa 1,7 puta veći broj minikrtola u odnosu na sortu Désirée. Izlaganje biljaka krompira toplotnom stresu uticalo je na distribuciju različitih veličina minikrtola kod obe sorte krompira (**Slika 27. B**). Kod sorte Désirée, ali i kod sorte Festival, najznačajniji uticaj uočen je na ukupan broj formiranih minikrtola kategorije (veličine) od 10-15 mm. Kod sorte Desire došlo je do smanjenja broja minikrtola veličine od 10-15 mm od 1,9 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolnu, dok je kod sorte Festival taj efekat bio suprotan. Naime, u uslovima toplotnog stresa kod sorte Festival formirao se 1,8 puta veći broj minikrtola prečnika 10-15 mm u odnosu na kontrolni tretman. Uticaj visoke temperature na broj ostalih kategorija minikrtola nije bio statistički značajan. Kod obe ispitivane sorte krompira, nije bilo značajne razlike u masi pojedinačnih kategorija minikrtola između dva temperaturna režima (**Slika 27. C**).

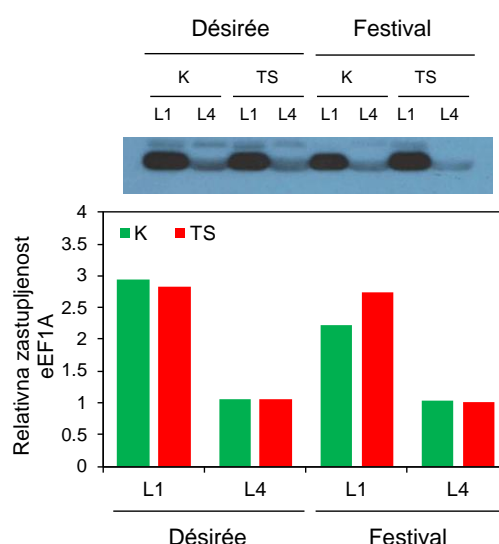


**Slika 27.** Uticaj visoke temperature na distribuciju i masu minikrtola kod krompira. Ukupan broj minikrtola od 20 biljaka (A). Distribucija pet kategorija veličina minikrtola (<5, 5-10, 10-15, 15-20 i >20 mm) kod krompira (B). Masa pojedinačnih kategorija minikrtola kod krompira (C). Sve vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti tri ponovljena eksperimenta  $\pm$  SE. Srednje vrednosti označene različitim velikim slovima se statistički razlikuju u okviru kontrolnog tretmana, a različitim malim slovima u okviru toplotnog stresa, na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom. Vrednosti označene \* se značajno razlikuju u odnosu na kontrolu prema LSD testu za svaku sortu odvojeno ( $p < 0,05$ ). K - kontrolni uslovi; TS - toplotni stres.

### 4.7.2.3. Uticaj dugotrajnog toplotnog stresa na ekspresiju eEF1A i HSP-a u listovima

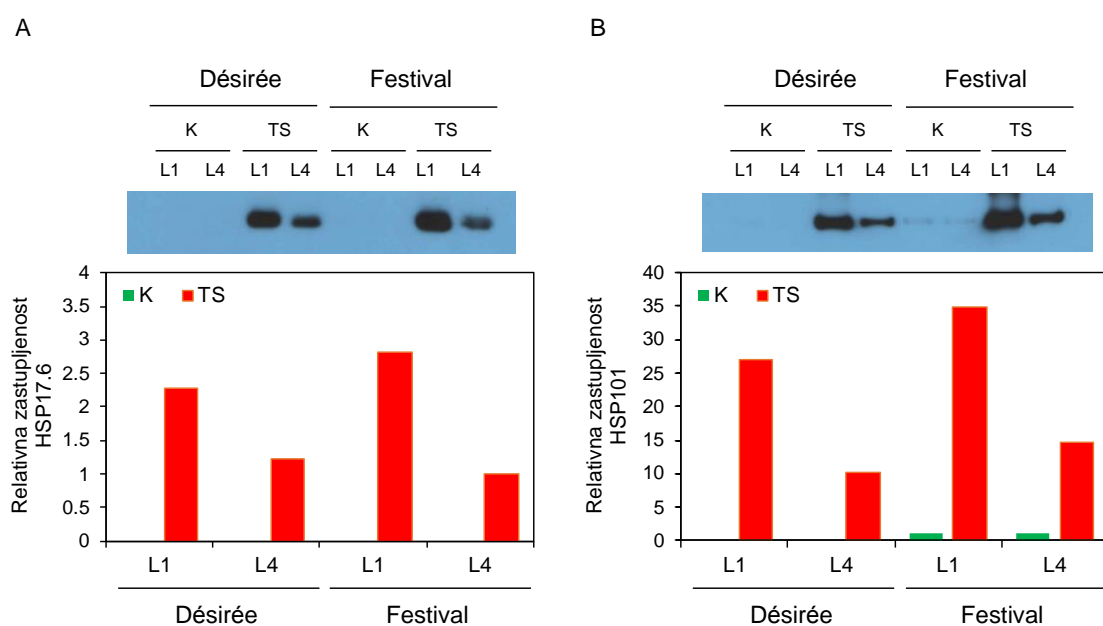
Uticaj visoke temperature na ekspresiju eEF1A i HSP-a ispitan je u najmlađim i prvim potpuno razvijenim listovima od vrha izdanka kod sorti Désirée i Festival gajenih 7 dana na temperaturnom režimu 20/18 °C, dan/noć (kontrola) ili 30/24 °C, dan/noć (toplotni stres).

Imunoblot analiza ekspresije eEF1A je pokazala da je kod sorte Désirée, nivo zastupljenosti eEF1A u uslovima visoke temperature ostao nepromenjen, kako u najmlađim, tako i u prvim potpuno razvijenim listovima (**Slika 28.**). Sa druge strane, kod sorte Festival je u uslovima visoke temperature došlo do blagog povećanja zastupljenost eEF1A od 1,2 puta u najmlađim listovima u odnosu na kontrolu, dok je nivo zastupljenosti ovog proteina u prvim potpuno razvijenim listovima ostao nepromenjen. U kontrolnim uslovima, sorta Festival je imala manju zastupljenost eEF1A proteina od 1,3 puta u odnosu na sortu Désirée u najmlađim listovima, dok je u uslovima toplotnog stresa, zastupljenost ovog proteina bio na sličnom nivou među ispitivanim sortama. Zastupljenost eEF1A u prvim potpuno razvijenim listovima, na oba temperaturna režima, nije se značajno menjala kod ispitivanih sorti, a ni među sortama.



**Slika 28.** Imunoblot analiza zastupljenosti eEF1A u listovima krompira. Brojevi 1 i 4 se odnose na poziciju (starost) listova od vrha ka bazi nadzemnog dela izdanka. K - kontrolna temperatura; TS - toplotni stres; L - listovi.

Analiza ekspresije HSP17.6 i HSP101 je pokazala da je došlo do značajnog povećanja zastupljenosti ovih proteina u listovima kod obe ispitivane sorte krompira, Désirée i Festival, u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu (**Slika 29.**). Zastupljenost HSP17.6 u kontrolnim uslovima nije detektovana ni kod sorte Désirée, niti kod sorte Festival. Obe sorte krompira su akumulirale više ovog proteina u najmlađim listovima koji se još razvijaju i to 2,7 puta više u odnosu na zastupljenost HSP17.6 u prvim potpuno razvijenim listovima. Takođe su ispitivane sorte krompira u najmlađim listovima akumulirale i više HSP101 proteina u uslovima visoke temperature u odnosu na starije, potpuno razvijene listove. Kod sorte Désirée je detektovana zastupljenost HSP101 proteina koja je bila veća 2,6 puta, dok je kod sorte Festival zastupljenost HSP101 u najmlađim listovima bila veća 2,4 puta u odnosu na zastupljenost u prvim potpuno razvijenim listovima u uslovima visoke temperature.

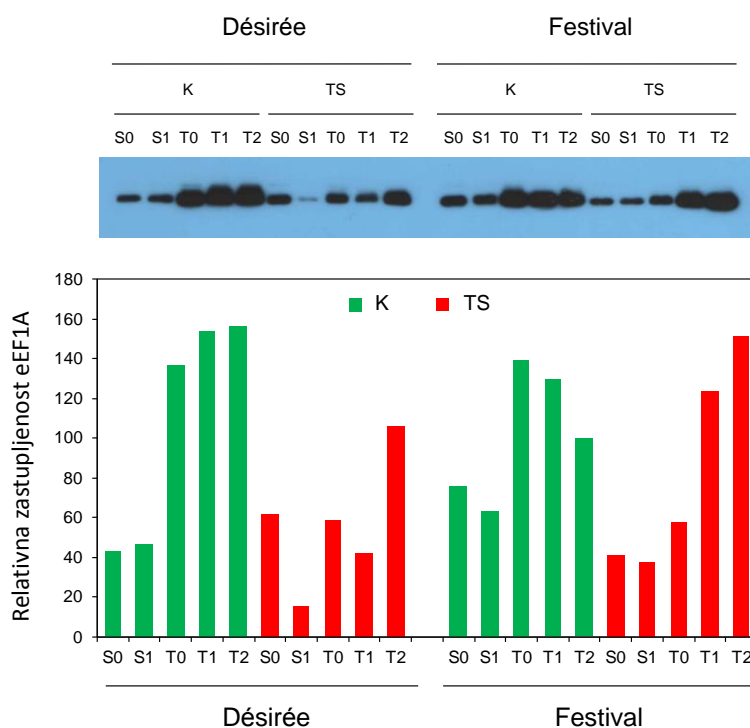


**Slika 29.** Imunoblot analiza zastupljenosti HSP17.6 (A) i HSP101 (B) u listovima krompira. Brojevi 1 i 4 se odnose na poziciju (starost) listova od vrha ka bazi nadzemnog dela izdanka. K - kontrolna temperatura; TS - toplotni stres; L - listovi.

#### 4.7.2.4. Ekspresija eEF1A i HSP-a tokom različitih faza tuberizacije u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa

Kako proces tuberizacije obuhvata celu jednu sekvencu događaja, od indukcije stolona, preko inicijacije minikrtola, pa sve do formiranja zrelih minikrtola, tako je i uticaj visoke temperature na ekspresiju eEF1A i HSP-a tokom tuberizacije kod sorti Désirée i Festival gajenih *ex vitro*, ispitan u stolonima, stolonima sa iniciranim minikrtolama i u minikrtolama različitih veličina koje odražavaju njihovo rastenje i starost. Biljke stare 33 dana izlagane su tretmanu 30/24 °C, dan/noć (toplotni stres) ili 20/18 °C, dan/noć (kontrola) u trajanju od 7 dana.

Imunoblot analiza ekspresije eEF1A je pokazala da je kod sorte Désirée, jedino u stolonima došlo do indukcije ekspresije eEF1A tokom delovanja visoke temperature, te je nivo akumulacije ovog proteina u stolonima bio 1,4 puta veći u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu (**Slika 30.**).



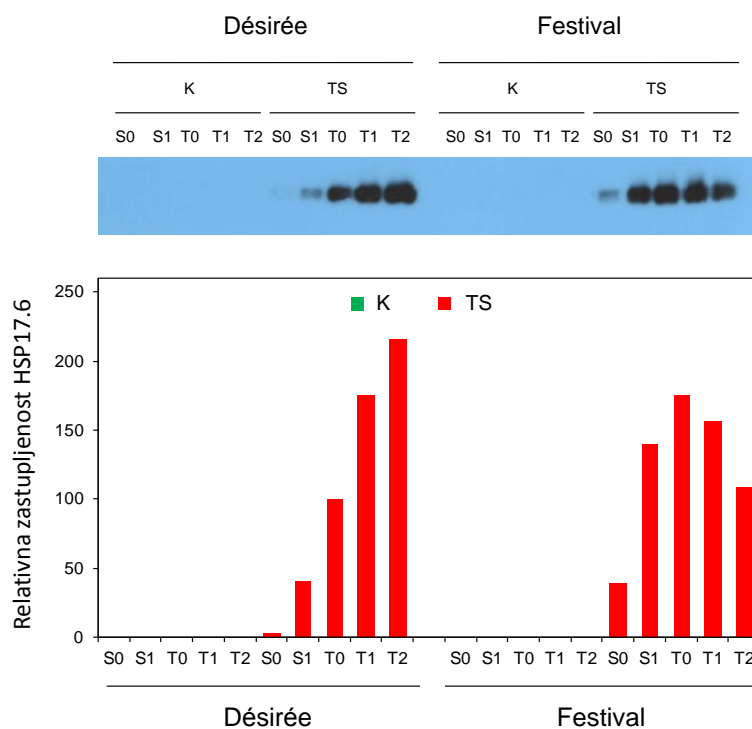
**Slika 30.** Imunoblot analiza ekspresije eEF1A u podzemnim vegetativnim organima kod biljaka krompira. Prikazana je relativna zastupljenost eEF1A u stolonima (S0), stolonima sa iniciranim minikrtolama (S1) i u tri kategorije veličina minikrtola [ $<5$  (T0), 5-10 (T1), 10-15 (T2) mm] kod krompira. K - kontrolni uslovi; TS - toplotni stres.

U ostalim ispitanim podzemnim vegetativnim organima kod sorte Désirée (stolonima sa iniciranim minikrtolama i rastućim minikrtolama) došlo je do značajnog smanjenja akumulacije eEF1A tokom toplotnog stresa u odnosu na kontrolu. Najveće smanjenje akumulacije ovog proteina od 3,7 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu kod sorte Désirée je detektovano u minikrtolama veličine od 5-10 mm, a nešto manje smanjenje od 2,3 puta je detektovano u minikrtolama veličine <5 mm, dok je najmanje smanjenje akumulacije eEF1A proteina od 1,5 puta detektovano u minikrtolama veličine od 10-15 mm.

Kod sorte Festival, pod uticajem visoke temperature, došlo je do smanjenja akumulacije eEF1A jedino u stolonima, stolonima sa iniciranim minikrtolama i u minikrtolama veličine <5 mm, dok je u većim minikrtolama od 5-10 mm nivo ekspresije bio nepromenjen, a u minikrtolama od 10-15 mm, došlo je do značajnog povećanja akumulacije ovog proteina od 1,5 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu (**Slika 30.**). Nivo akumulacije eEF1A u stolonima je bio 1,8, a u stolonima sa iniciranim minikrtolama 1,7 puta manji u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, a najveće smanjenje akumulacije ovog proteina od 2,4 puta je detektovano u minikrtolama <5 mm.

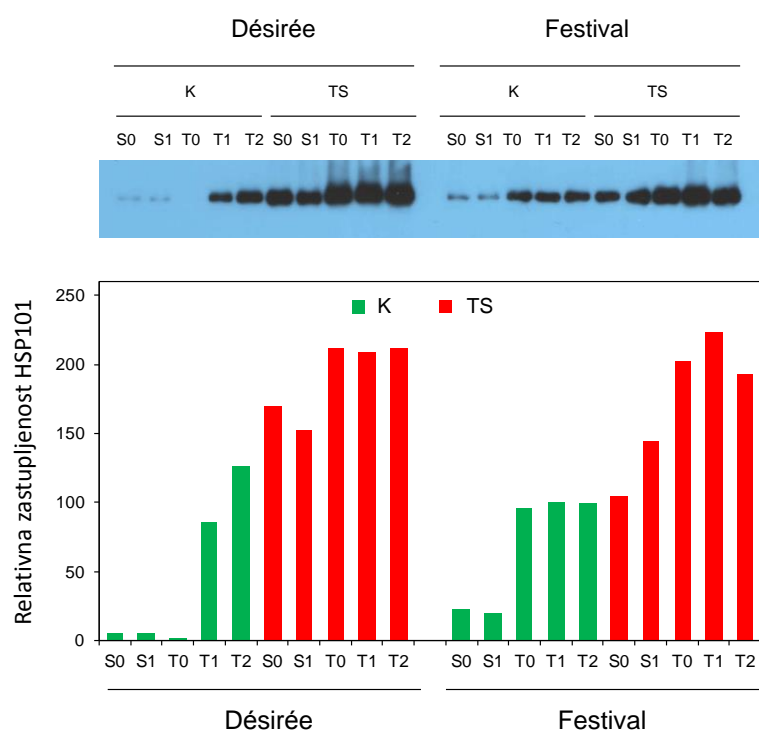
Imunoblot analiza ekspresije HSP17.6 u podzemnim vegetativnim organima kod sorti Désirée i Festival je pokazala da je došlo do akumulacije ovog proteina u ispitanim vegetativnim organima (stolonima, stolonima sa iniciranim minikrtolama, kao i u rastućim minikrtolama) u odnosu na kontrolne uslove (**Slika 31.**). Pored toga, u kontrolnim uslovima kod obe sorte krompira, nije detektovano prisustvo ovih proteina. Sorta Festival je značajno više akumulirala HSP17.6 u stolonima od 15,5 puta, stolonima sa iniciranim minikrtolama od 3,5 puta i 1,8 puta u minikrtolama veličine <5 mm u odnosu na sortu Désirée u uslovima toplotnog stresa, dok je sorta Désirée akumulirala više ovog proteina od 1,1 puta u minikrtolama veličine od 5-10 i 2 puta u minikrtolama veličine od 10-15 mm u odnosu na sortu Festival. Takođe, kod sorte Désirée, je uočeno da se sa uvećanjem minikrtola povećavao i nivo zastupljenost HSP17.6 tokom delovanja visoke temperature, dok je kod sorte Festival, došlo do smanjenja zastupljenosti ovog proteina u minikrtolama nakon dostizanja veličine <5

mm kod kojih je ujedno detektovana i najveća akumulacija HSP17.6 u odnosu na ostale analizirane vegetativne organe kod ove sorte krompira.



**Slika 31.** Imunoblot analiza ekspresije HSP17.6 u podzemnim vegetativnim organima kod biljaka krompira. Prikazana je relativna zastupljenost HSP17.6 u stolonima (S0), stolonima sa iniciranim minikrtolama (S1) i u tri kategorije veličina minikrtola [<5 (T0), 5-10 (T1), 10-15 (T2) mm] kod krompira. K – kontrolni uslovi; TS - toplotni stres.

Analiza ekspresije HSP101 je pokazala da se nivo HSP101 kod obe sorte Desire i Festival značajno povećao tokom delovanja toplotnog stresa u ispitanim podzemnim vegetativnim organima (stolonima, stolonima sa iniciranim minikrtolama, kao i u rastućim minikrtolama) (**Slika 32.**). Takođe je ovaj protein detektovan i u kontrolnim uslovima kod obe sorte krompira, što ukazuje na njegovu konstitutivnu ekspresiju. I kod sorte Désirée i Festival, HSP101 se mnogo više akumulirao u minikrtolama u odnosu na stolone i stolone sa iniciranim minikrtolama u uslovima toplotnog stresa. Kod sorte Désirée nivo akumuliranog HSP101 se nije značajno razlikovao među analiziranim minikrtolama u uslovima visoke temperature, dok se kod sorte Festival, ovaj protein najviše akumulirao u minikrtolama veličine 5-10 mm.



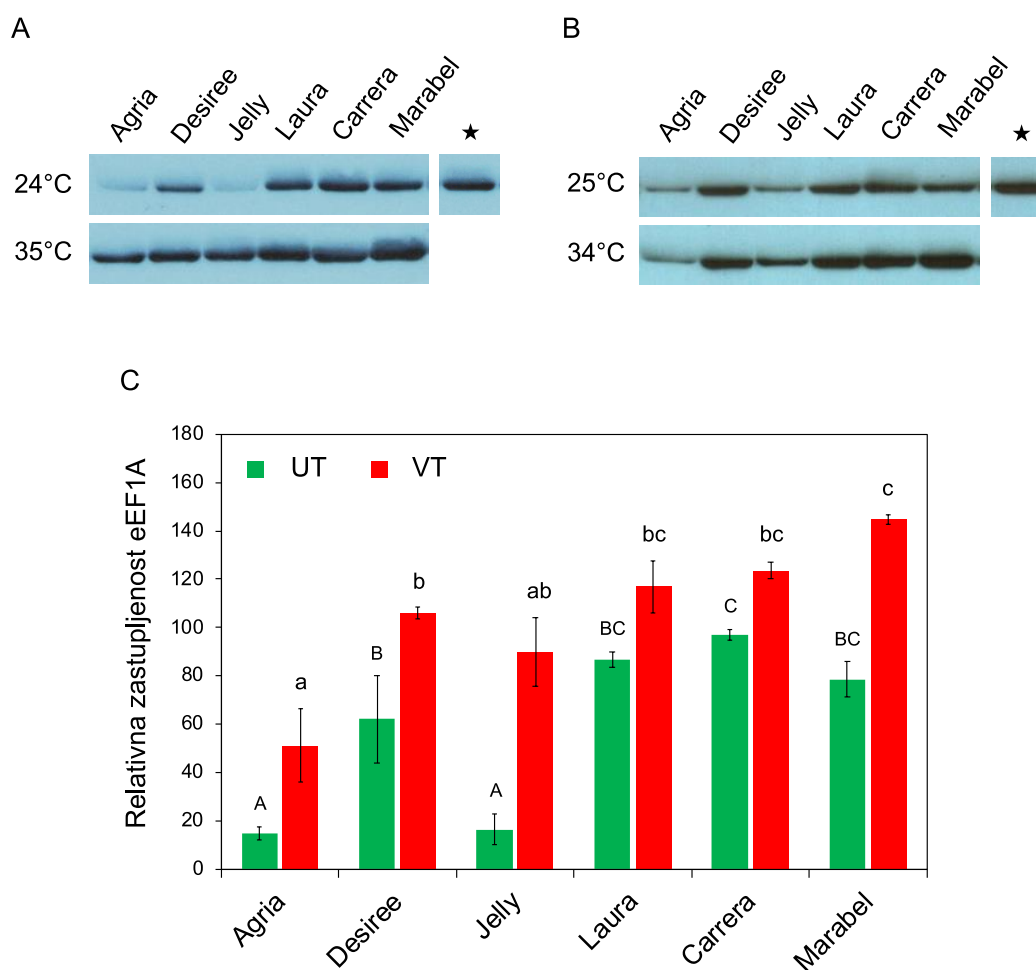
**Slika 32.** Imunoblot analiza ekspresije HSP101 u podzemnim vegetativnim organima kod biljaka krompira. Prikazana je relativna zastupljenost HSP101 u stolonima (S0), stolonima sa iniciranim minikrtolama (S1) i u tri kategorije veličina minikrtola [ $<5$  (T0), 5-10 (T1), 10-15 (T2) mm] kod sorti Désirée i Festival gajenih *ex vitro* u kontrolnim uslovima (K) ili uslovima toplotnog stresa (TS).

#### 4.8. Uticaj visoke temperature na ekspresiju eEF1A kod biljaka krompira gajenih u eksperimentalnom polju

Ekspresija eEF1A u listovima šest sorti krompira gajenih u eksperimentalnom polju ispitana je tokom dve uzastopne godine (2011. i 2012.). Prvi potpuno razvijeni listovi (četvrti od vrha izdanka) uzorkovani su u uslovima umerene temperature od 24-26 °C i visoke temperature vazduha od 33-35 °C (Slika 33.). Rezultati imunoblot analize su pokazali da kod svih ispitanih sorti krompira dolazi do povećanja ekspresije eEF1A tokom delovanja visoke temperature, kao i da postoji razlika u nivou akumulacije ovog proteina među analiziranim genotipovima krompira. Najniži nivo akumulacije eEF1A je detektovan kod sorte Agria kako pri umerenim temperaturama, tako i tokom delovanja visoke temperature u poređenju sa ostalim sortama. Sa druge strane, sorte Laura, Carrera i Marabel karakteriše relativno visok nivo zastupljenosti



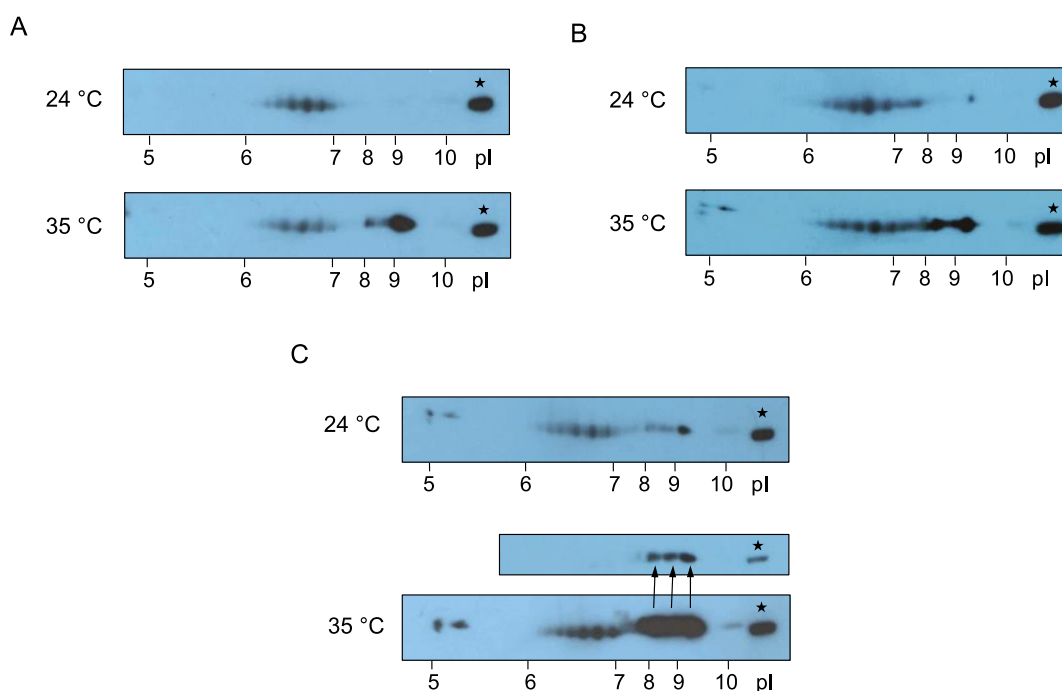
ovog proteina u uslovima visoke temperature u odnosu na sortu Agria. Tako je kod sorte Laura detektovana 2,1 puta veća zastupljenost eEF1A u uslovima visoke temperature u odnosu na sortu Agria, dok je kod sorti Carrera i Marabel detektovana 2,2 i 2,6 puta veća zastupljenost u odnosu na istu sortu Agria, tim redosledom.



**Slika 33.** Relativna zastupljenost eEF1A u listovima šest sorti krompira gajenih u navodnjavanom eksperimentalnom polju, pri umerenim (23 °C, UT) ili visokim temperaturama vazduha (34-35 °C, VT) u junu 2011. (A) i junu 2012. (B) godine. Na histogramu (C) su prikazane srednje vrednosti zastupljenosti eEF1A u listovima različitih sorti krompira u dve godine. Sve vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. Srednje vrednosti označene različitim velikim slovima se statistički razlikuju u okviru kontrolnog tretmana, a različitim malim slovima u okviru toplotnog stresa, na nivou značajnosti  $p < 0,05$  što je ustanovljeno post hoc Newman-Keul's testom. \* - interna kontrola.

#### 4.8.1. 2D-imunoblot analiza ekspresije eEF1A kod biljaka krompira gajenih u eksperimentalnom polju

Ukupni solubilni proteini listova tri sorte krompira za koje je prethodno ustanovljeno da se značajno razlikuju u akumulaciji eEF1A u uslovima visoke temperature, su korišćeni za 2D-imunoblot analizu. Izabrane su sorta Agria koja je najmanje akumulirala eEF1A, sorta Désirée koja je srednje akumulirala i sorta Marabel koja je najviše akumulirala ovaj protein u listovima u uslovima visoke temperature između šest izučavanih sorti (**Slika 33.**). 2D-imunoblot analiza proteina kod ovih sorti krompira je pokazala prisustvo približno od 5-8 tačaka eEF1A u pI opsegu od 6-9,5 (**Slika 34.**).

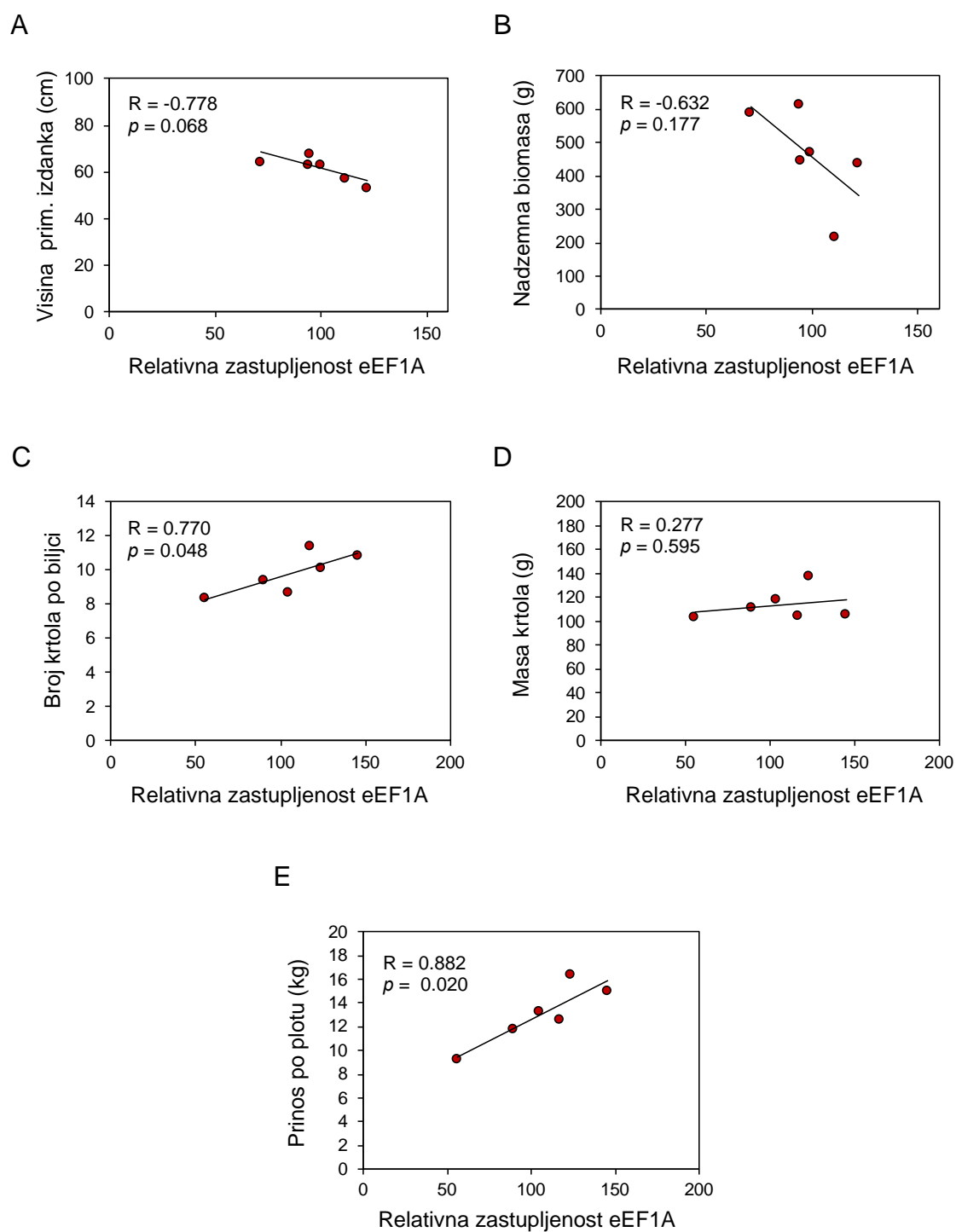


**Slika 34.** 2D-imunoblot analiza izoformi eEF1A u listovima krompira gajenih u eksperimentalnom polju. Analizirane su sorte Agria (A), Désirée (B) i Marabel (C). Listovi su sakupljeni pri temperaturi od 24 °C i 35 °C. \* - interna kontrola koja predstavlja uzorak proteina iz sorte Désirée razdvojenih samo u drugoj dimenziji radi provere molekulske mase uzoraka koji su razvojeni i u prvoj dimenziji.

Kod sorti Désirée i Agria, dve tačke polipeptida/izoforni koje pripadaju baznoj grupi tačaka (pI 8,2-9,5) su indukovane u uslovima visoke temperature. Jedna od ove dve izoforni čija pI vrednost iznosi 9,3, pokazivala je značajnu akumulaciju kod obe sorte, Agria i Désirée, dok je druga izoforna pI vrednosti 8,2 imala veću zastupljenost kod sorte Désirée (**Slika 34. A i B**). Tri izoforme iz bazne grupe koje su se pokazale kao izuzetno inducibilne u uslovima visoke temperature, su detektovane kod sorte Marabel (**Slika 34. C**). Blago povećanje volumena tačaka eEF1A iz kisele grupe (pI 6-7) je jedino detektovano kod sorte Désirée koja je imala srednju zastupljenost eEF1A i kod sorte Marabel koja se karakterisala visokim nivoom zastupljenosti ovog proteina u uslovima visoke temperature.

#### **4.8.2. Korelacija relativne zastupljenosti eEF1A i visine primarnih izdanaka, sveže nadzemne biomase ili parametara prinosa kod krompira gajenog u eksperimentalnom polju**

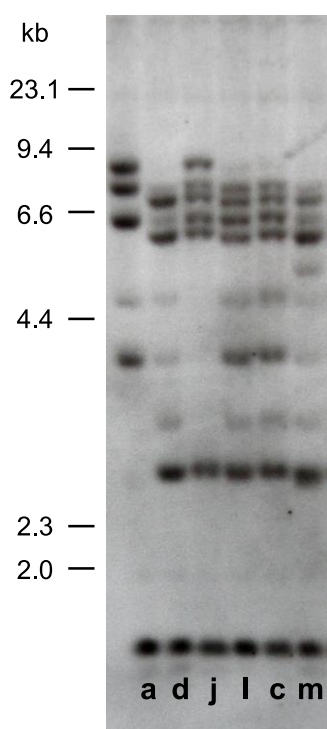
Dvogodišnji prosek relativne zastupljenosti eEF1A u listovima kod šest sorti krompira je korelisan sa visinom primarnih izdanaka, svežom nadzemnom biomasom i parametrima prinosa: brojem krtola po biljci, masom krtola i prinosom po plotu na osnovu podataka iz 2011. i 2012. godine (**Slika 35.**). Statistički značajna pozitivna linearna korelacija je ustanovljena između akumulacije eEF1A i prosečnog broja krtola po biljci (**Slika 35. C**), kao i prinosa po plotu (**Slika 35. E**) dok je za ostale korelacije ustanovljeno da nisu statistički značajne ( $p > 0,05$ ). Uopšteno, one sorte koje su akumulirale više eEF1A tokom delovanja visoke temperature formirale su veći broj krtola po biljci i imale su veći prinos po plotu.



**Slika 35.** Korelacija relativne zastupljenosti eEF1A tokom toplotnog stresa i visine primarnih izdanaka (A), nadzemne biomase (B), broja krtola po biljci (C), mase krtola (D) ili prinosa po plotu (E). Korelacija ovih parametara i nivoa ekspresije eEF1A određena je Pearson-ovim koeficijentom korelacije (R); p vrednost predstavlja značajnost testa.

#### 4.9. Analiza genomske DNK kod krompira

Korišćenjem Southern blot analize, utvrđen je broj kopija gena za eEF1A kod šest sorti krompira (**Slika 36.**). Za hibridizaciju je korišćena digoksinom obojena oligonukleotidna proba StEF1- $\alpha$  koja je sintetisana na templetu genomske DNK krompira sorte Désirée. Ova proba predstavlja ampikon od 412 bp sa 48,3% GC.

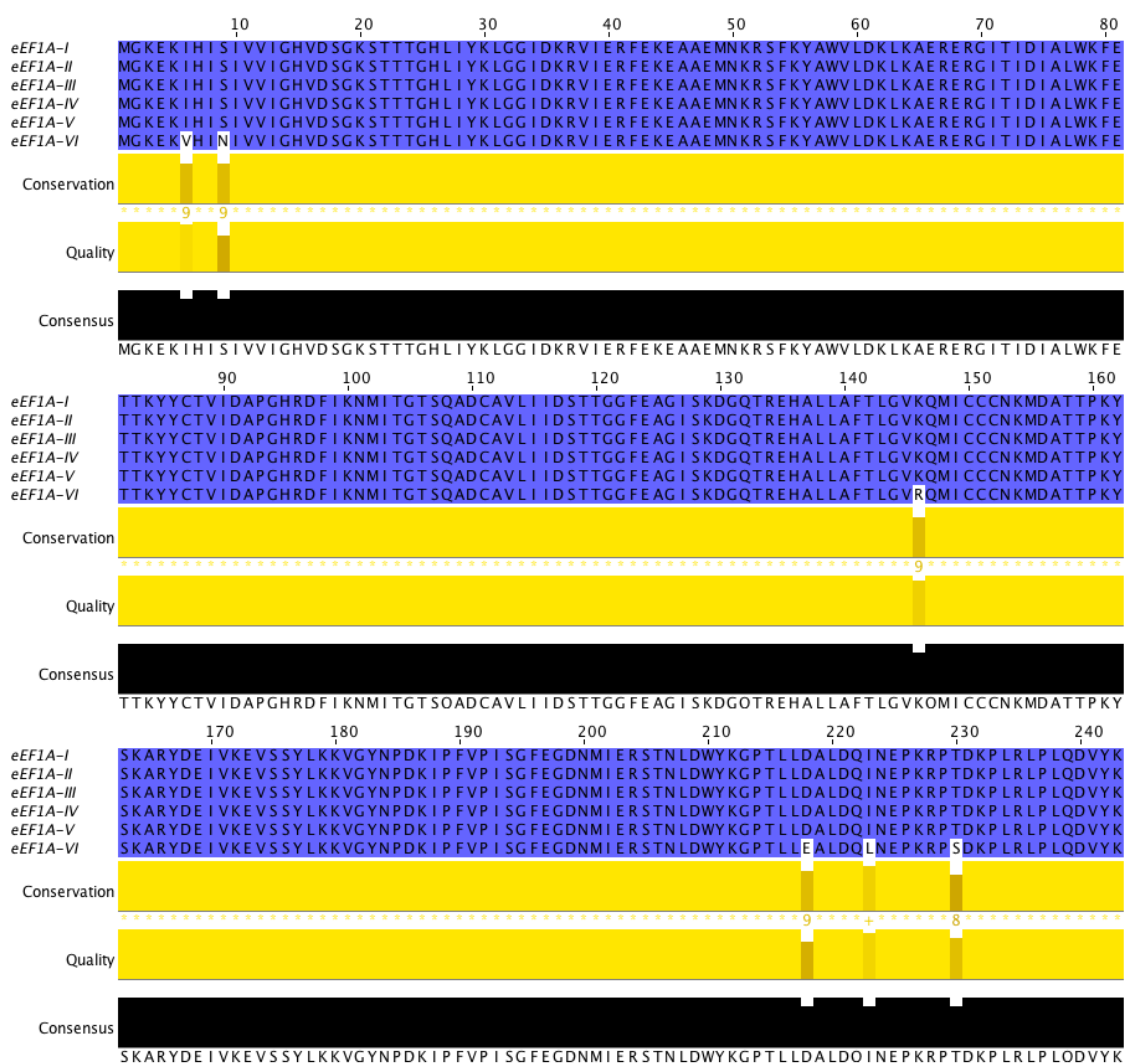


**Slika 36.** Hibridizacija genomske DNK šest sorti krompira digerirane enzimom *HindIII* sa probom StEF1- $\alpha$ . a - Agria; d - Désirée; j - Jelly; l - Laura; c - Carrera i m - Marabela.

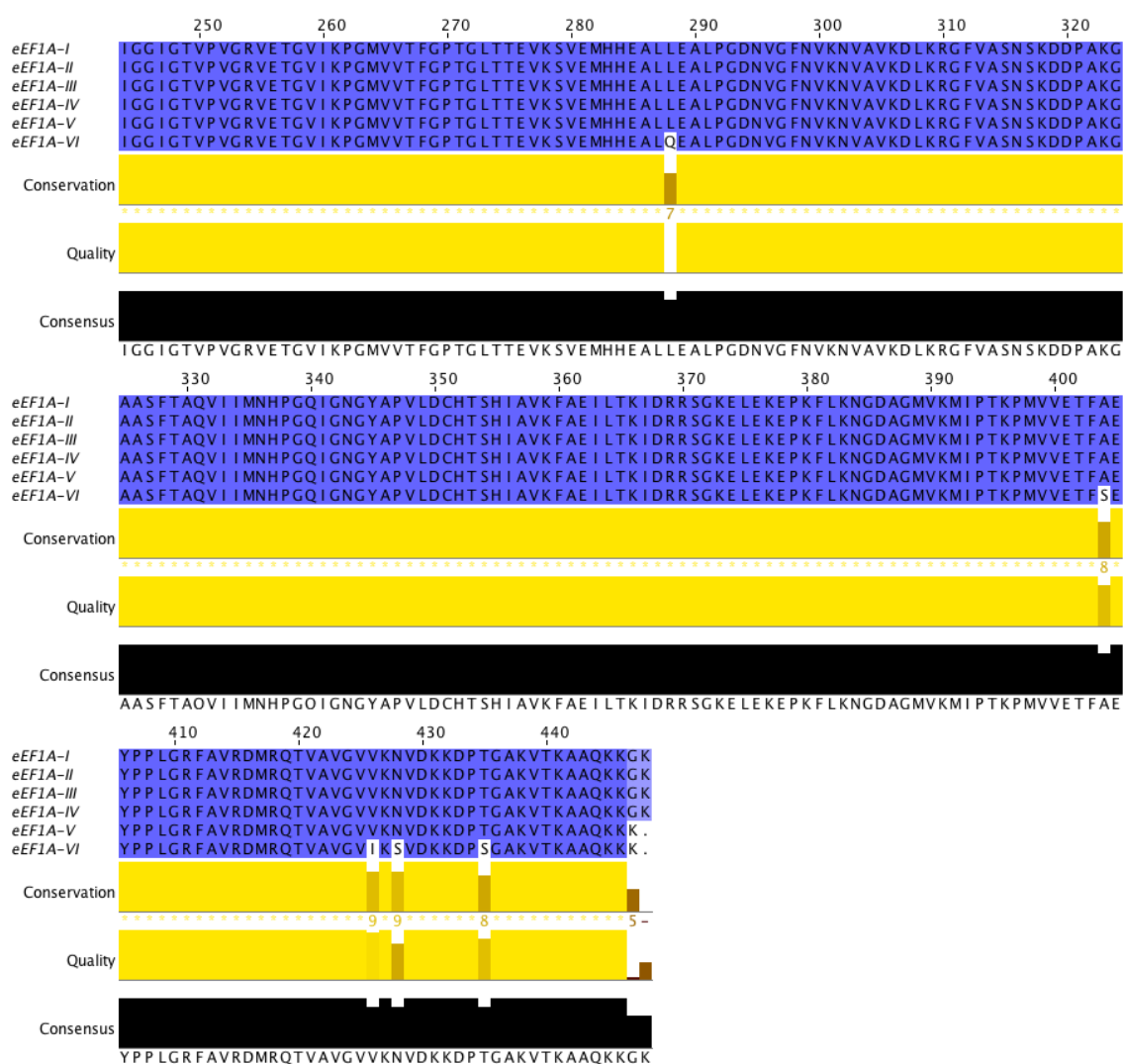
U zavisnosti od sorte krompira, od 6-10 fragmenata DNK hibridizovalo je sa probom. Kod sorte Agria detektovano je 6, a kod sorte Jelly 7 fragmenata koji su hibridizovali sa probom. Tri sorte krompira (Carrera, Désirée i Laura) sadržale su 9 hibridizacionih traka, a najveći broj ovih traka, 10, je detektovan kod sorte Marabel. Ovi rezultati ukazuju na postojanje multigenske familije čiji članovi kodiraju eEF1A kod krompira, a u zavisnosti od sorte/genotipa krompira, ova familija je sačinjena od različitog broja gena.

#### 4.9.1. Struktura, veličina i pozicija gena na hromozomu koji kodiraju eEF1A kod krompira

Broj gen-kodirajućih sekvenci za eEF1A kod krompira je utvrđen i pretragom genomske baze EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org>) za *S. tuberosum* grupe Phureja duplog monoploidnog klon DM1-3516R44. Identifikovano je devet nukleotidnih sekvenci *eEF1A*, od kojih su tri parcijalne i šest kompletne sekvence. Dve od tri parcijalnih sekvenci su lokalizovane na hromozomima (Hr.) 3 i 4, a jedna je sa nepoznatom lokacijom na hromozomu. Šest kompletnih sekvenci je označeno od *eEF1A-I* do *eEF1A-VI* i kodiraju proteine od 447 do 448 aminokiselina (Slika 37.).

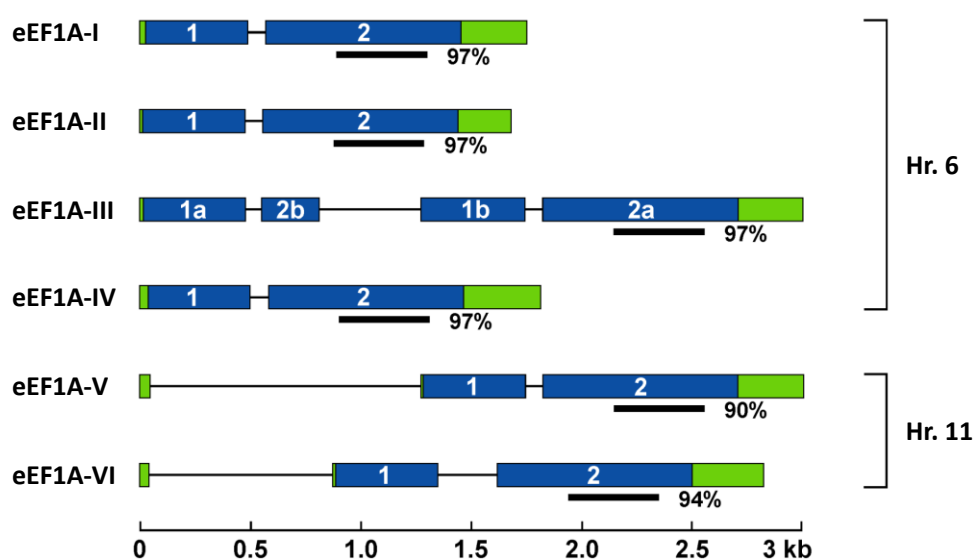


## Nastavak Slike 37.



**Slika 37.** Poređenje aminokiselinskih sekvenci dobijenih na osnovu kompletne genske nukleotidne sekvence *eEF1A*. Poravnanje je urađeno korišćenjem Jalwiev (Waterhouse i sar., 2009). Gradijentom obojeni regioni predstavljaju nivo identičnosti sekvenci.

Poređenje šest *eEF1A* gena je pokazalo da je egzon-intron struktura očuvana kod ove familije gena (**Slika 38.**).



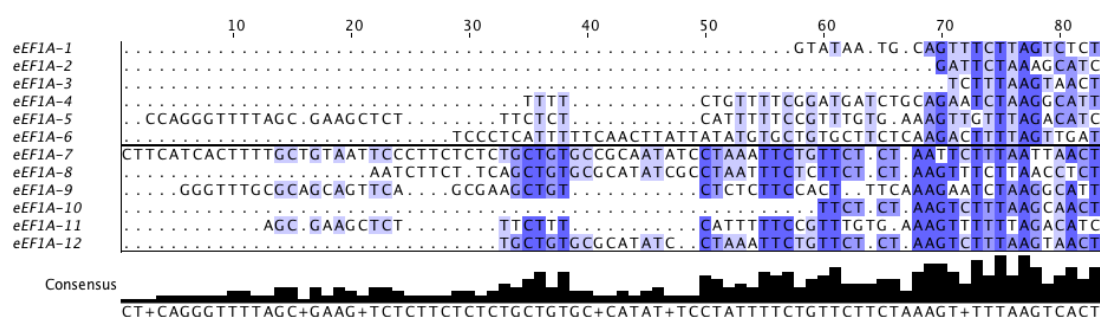
**Slika 38.** Intron-egzon struktura, mesto na hromozomu i veličina *eEF1A* gena kod *S. tuberosum* grupe phureja duplog monoploidnog klona DM1-3516R44. Zelena boja na slici označava netranslatirajući region, plava označava deo koji se translatira, linije predstavljaju introne, a debele linije označavaju poravnanje sa sekvencom probe sorte Désirée StEF1- $\alpha$  i procenat homologije.

Tri gena (*eEF1A-I*, *eEF1A-II* i *eEF1A-IV*) se nalaze na hromozomu 6 i poseduju zajedničku egzon-intron strukturu (dva egzona-jedan intron), kao i sličnu veličinu i homolognu sekvencu određenih egzona. Gen *eEF1A-III* se sastoji od četiri egzona, od kojih dva (1a i 1b) poseduju visoko homolognu sekvencu koja kodira C-terminalni region proteina eEF1A. Egzon 2a kodira kompletni N-terminalni region eEF1A, dok egzon 2b kodira deo N-terminalnog regiona. Ovo ukazuje na mogućnost alternativnog splajsinga. Bez obzira na sve, geni smešteni na hromozomu 6 (*eEF1A-I*, *eEF1A-II*, *eEF1A-III* i *eEF1A-IV*) kodiraju identične proteine molekulske mase od 49,26 kDa, sačinjene od 448 aminokiselina. Sličnosti u strukturi se primećuju i između dva gena (*eEF1A-V* i *eEF1A-VI*) koja se nalaze na hromozomu 11. Ovi geni se sastoje od dva egzona, a gen *eEF1A-V* kodira polipeptid koji se razlikuje od produkata gena sa hromozoma 6 po nedostatku N-terminalne aminokiseline, dok gen *eEF1A-VI* kodira polipeptid koji se razlikuje u 12 aminokiselina (3 zamenjene sa sličnim aminokiselinama, 8 sa različitim i 1 aminokiselina nedostaje).

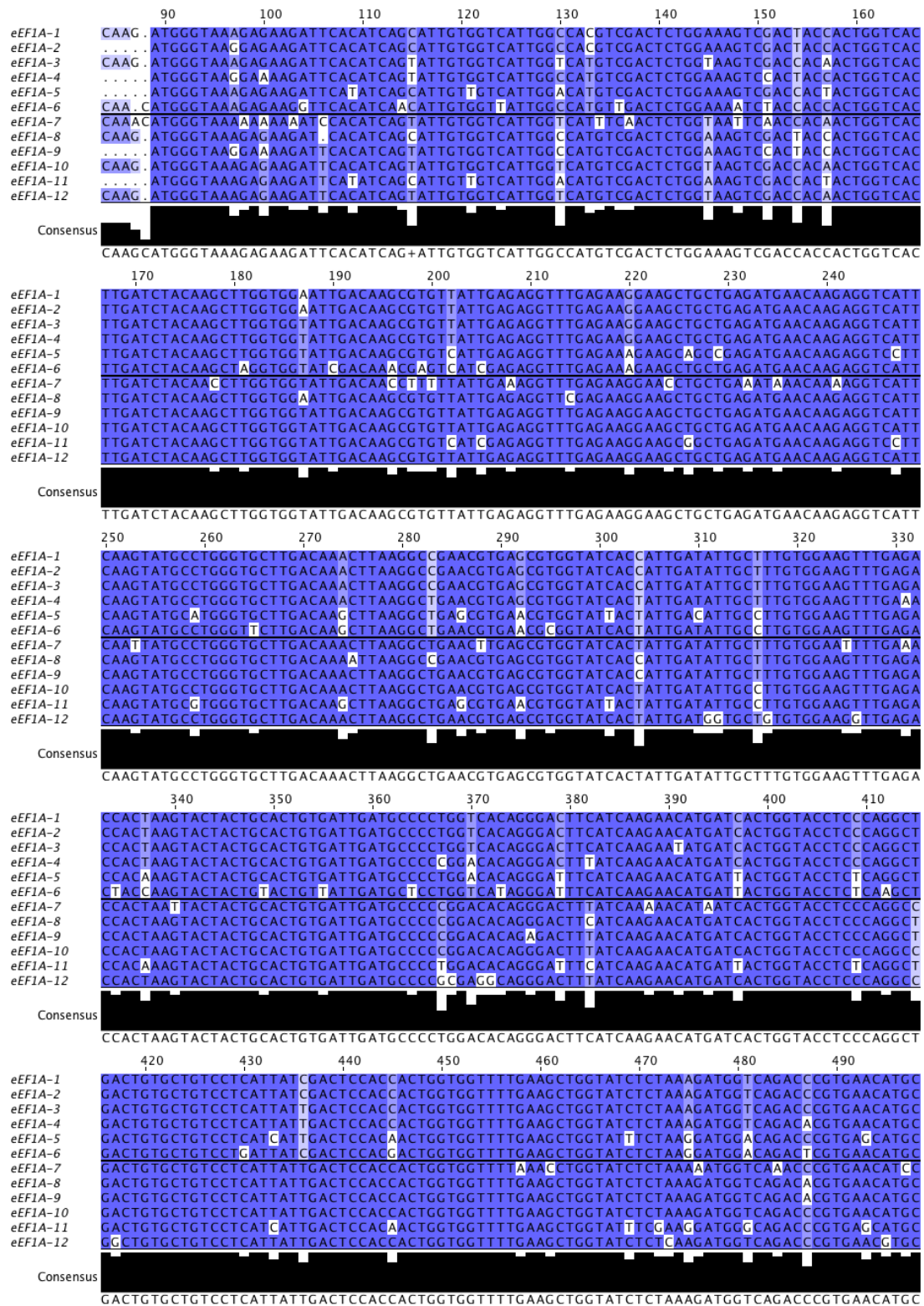


#### 4.10. Ispitivanje nivoa ekspresije *eEF1A* gena kod krompira u uslovima dugotrajnog toplotnog stresa

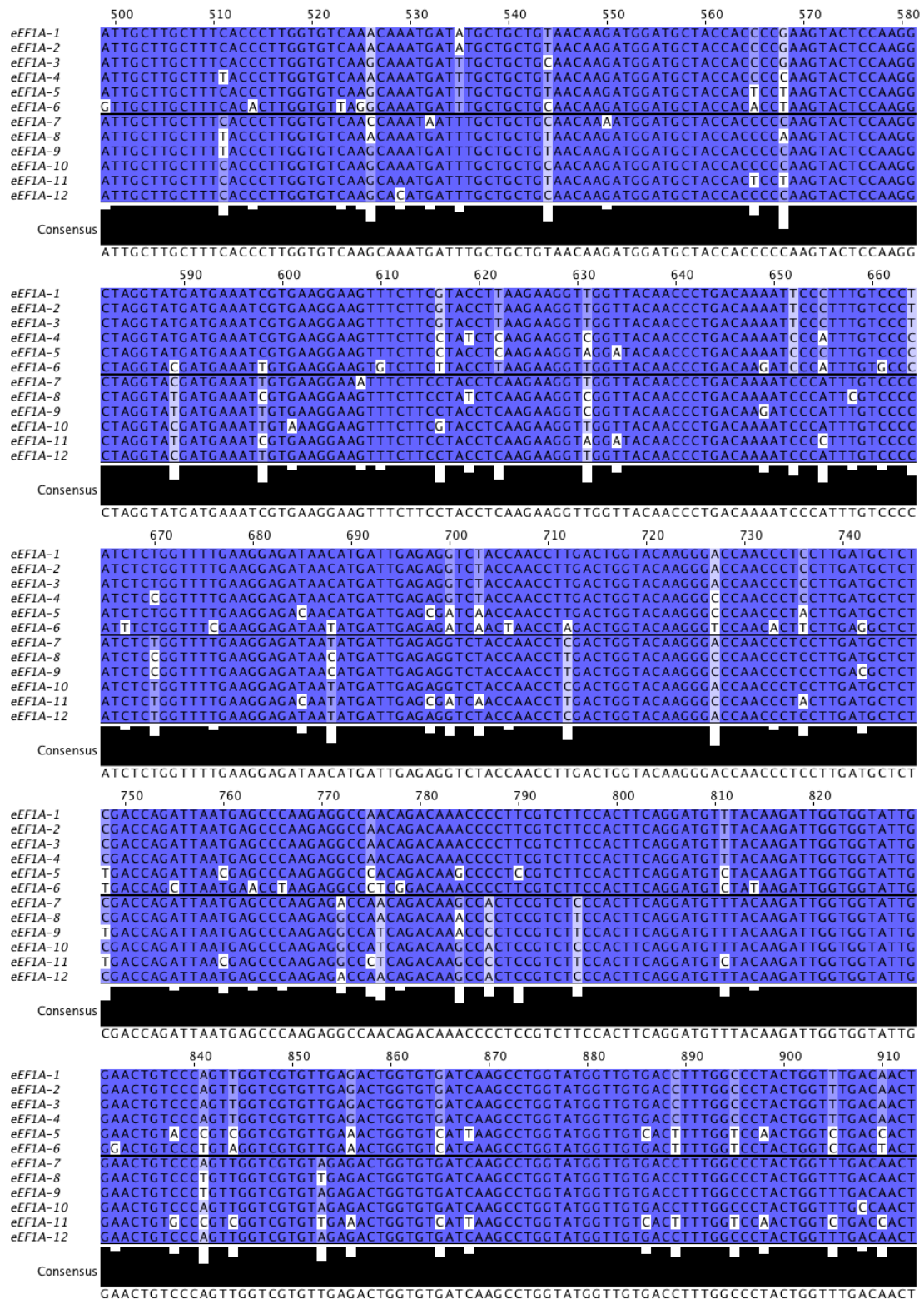
Na osnovu rezultata imunoblot analize proteina eEF1A u podzemnim vegetativnim organima kod sorti krompira gajenih *ex vitro*, Désirée i Festival u kontrolnim uslovima (20/18 °C, dan/noć) i uslovima toplotnog stresa (30/24, dan/noć °C) (**Slika 30.**), izabrane su minikrtole veličine od 10-15 mm za qPCR analizu. Upravo je kod ovih minikrtola detektovana najveća razlika među sortama u akumulaciji eEF1A u uslovima toplotnog stresa što je bio i razlog da se one odaberu za analizu ekspresije gena koji kodiraju eEF1A kod krompira. Metoda qPCR-a je korišćena za analizu transkripata potencijalnih target gena čija ekspresija utiče na zastupljenost eEF1A u uslovima toplotnog stresa. Kako sekvence transkripata gena koji kodiraju eEF1A kod sorti Désirée i Festival uglavnom nisu poznate, pretragom dve baze, GenBank i EnsemblPlants, pored jednog transkripta *eEF1A* gena sorte Désirée, izabrano je i 11 transkripata *eEF1A* gena drugih sorti/klonova koji su označeni od *eEF1A-1* do *eEF1A-12*. Prvih šest transkripata (od *eEF1A-1* do *eEF1A-6*) predstavljaju transkripte gena za eEF1A klona krompira DM 1-3 516R44 grupe Phureja. Pozicija i struktura ovih gena je razmatrana u sekciji **4.9.1**. Transkript *eEF1A-7* je pronađen kod sorte Désirée, a ostali transkripti su pronađeni kod sorte Kuras (**Tabela 5.**). Poređenje nukleotidnih cDNK sekvenci ovih dvanaest transkripata je prikazano na **Slici 39.**



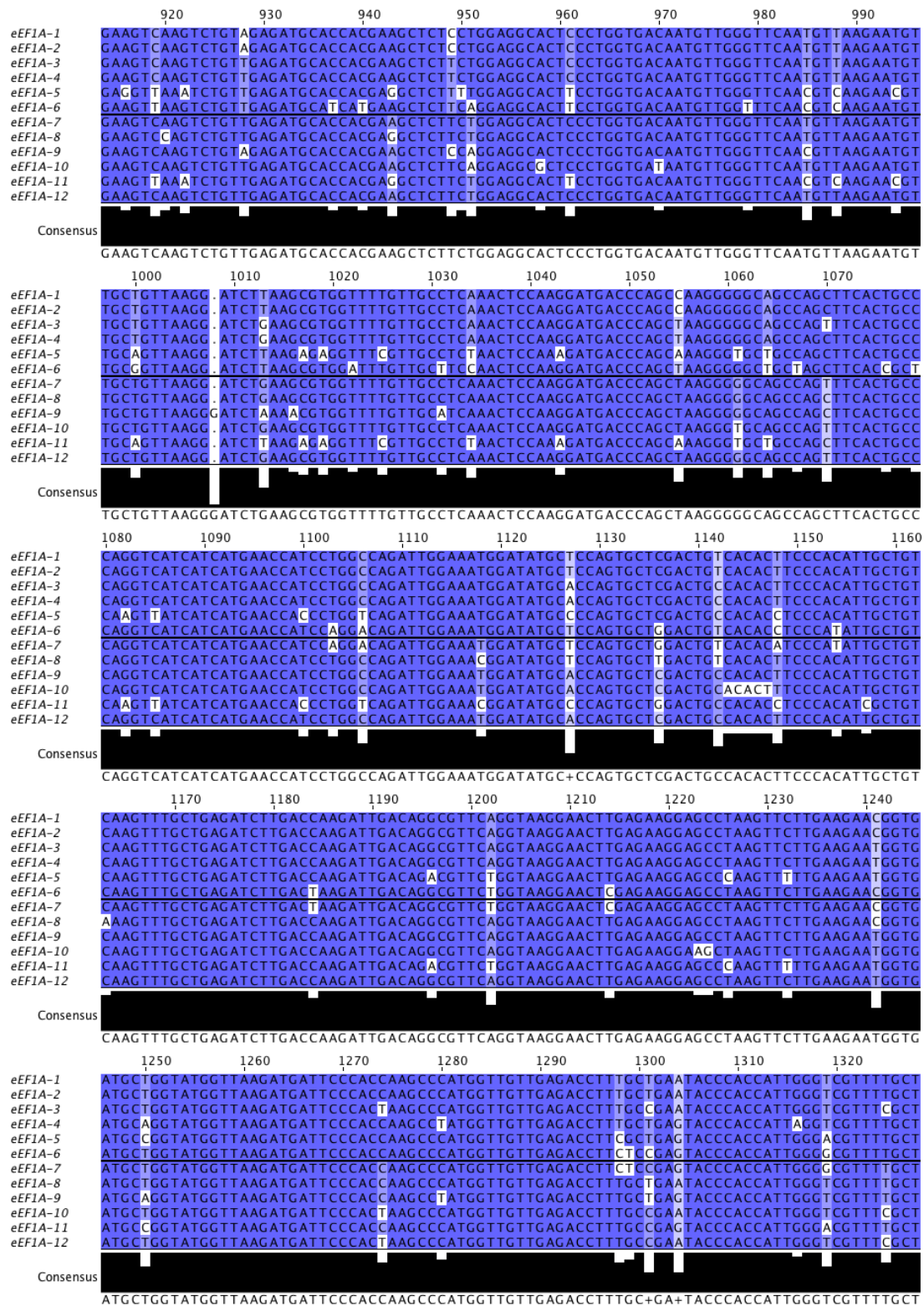
Nastavak Slike 39.



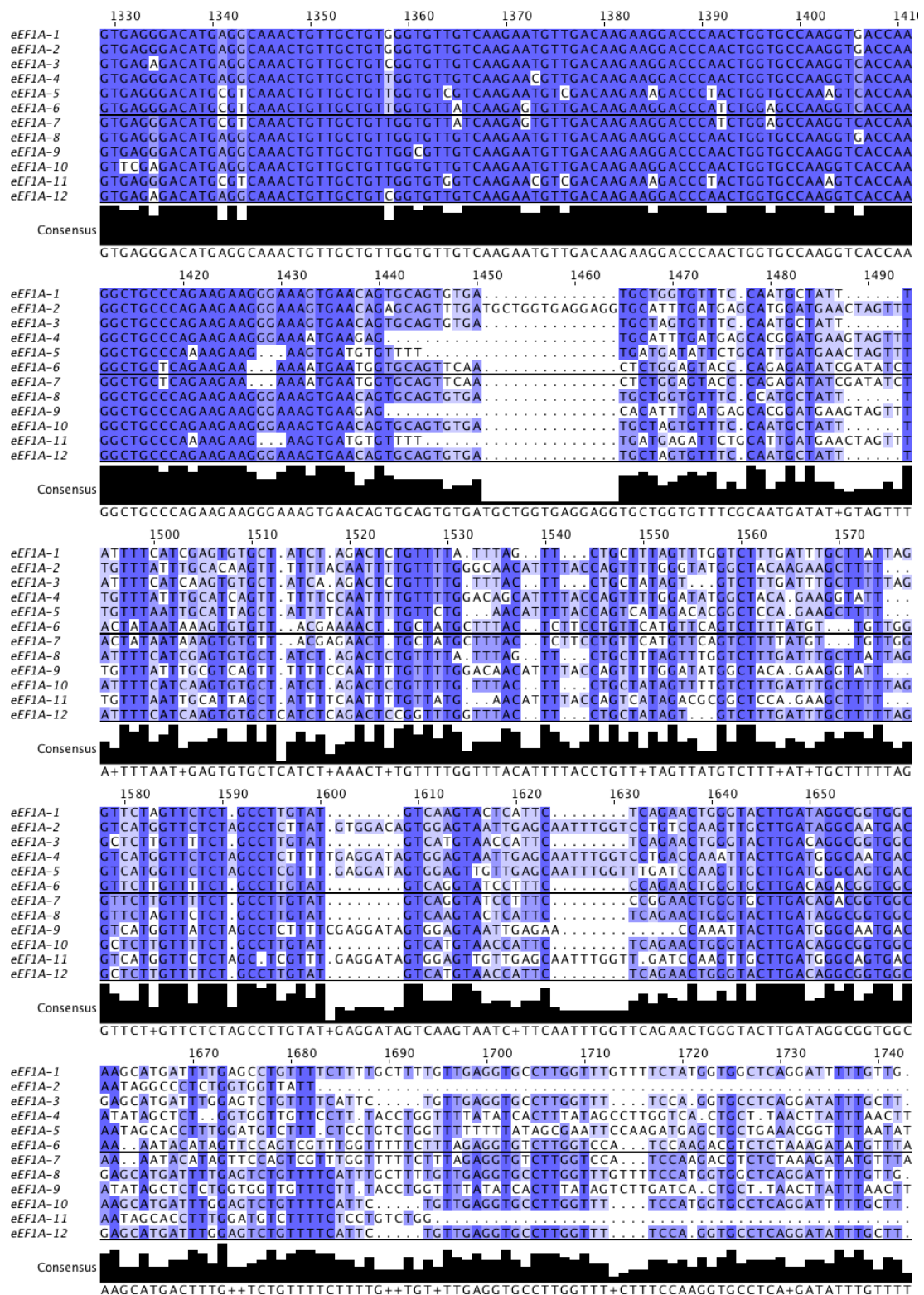
Nastavak Slike 39.

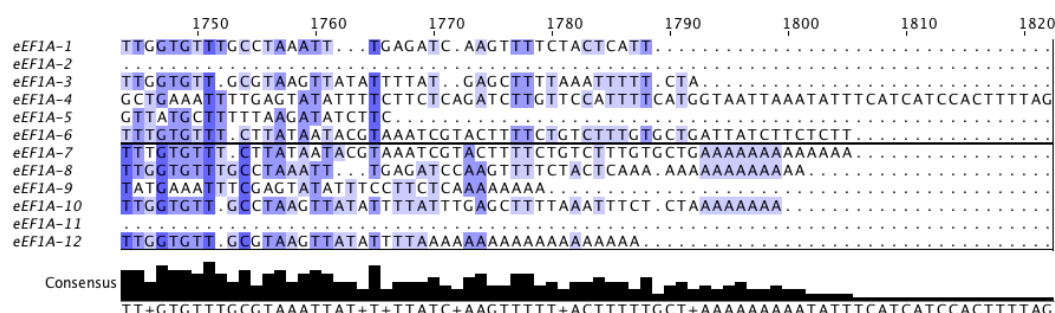


Nastavak Slike 39.



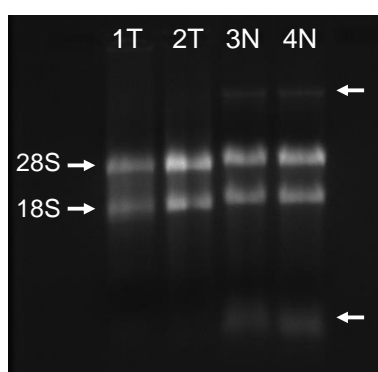
Nastavak Slike 39.



Nastavak **Slike 39.**

**Slika 39.** Poređenje nukleotidnih sekvenci cDNK dvanaest transkripata (od *eEF1A-1* do *eEF1A-12*). Poravnanje je urađeno korišćenjem Jalwiev (Waterhouse i sar., 2009). Gradijentom obojeni regioni predstavljaju nivo identičnosti sekvenci, od najtamnije boje (100% identične), do najsvetlije boje (najmanje identične sekvence, 50%), u okviru grupe *eEF1A-1-6* i grupe *eEF1A-7-12*.

Među analiziranim transkriptima postoji vrlo male razlike u sekvencama koje kodiraju proteine, što ukazuje na evolucionu očuvanost *eEF1A* gena. Izborom specifičnih prajmera je analizirana zastupljenost u broju ovih transkripata. Kao prvi korak urađena je izolacija ukupne RNK iz listova i minikrtola krompira sorte Désirée gajene *ex vitro* u kontrolnim uslovima starosti 40 dana, korišćenjem dve metode koje podrazumevaju korišćenje trizola ili natrijum-sulfit, radi utvrđivanja efikasnosti ovih metoda za izolaciju RNK iz biljnog materijala. Provera kvaliteta izolovane RNK je vršena elektroforetski na agaroznom gelu (**Slika 40.**).



**Slika 40.** Poređenje metoda za izolaciju RNK kod krompira. RNK izolovana iz listova (1) i minikrtola (2, 3 i 4) kod sorte Désirée. Izolovana RNK iz iste količine biljnog tkiva (2 i 3) ili duplo veće količine (4). Strelice ukazuju na pojavu traka na agaroznom gelu nakon elektroforeze. T - trizol; N - natrijum-sulfit.

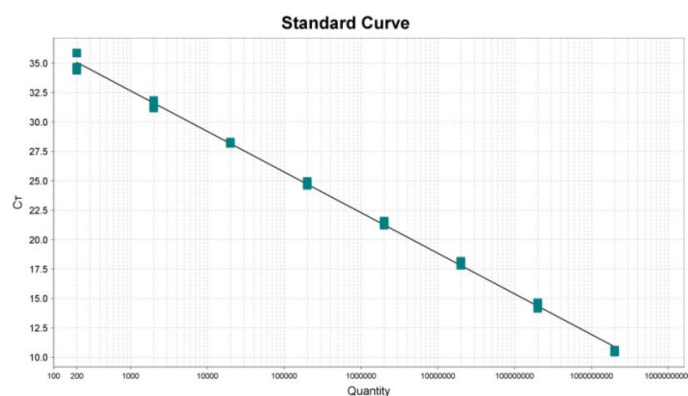
Na **Slici 40.** vide se dve trake jačeg intenziteta koje odgovaraju rRNK od 28S i 18S, kao i dodatne trake slabijeg intenziteta koje se javljaju iznad i ispod ovih traka nakon izolacije RNK korišćenjem natrijum-sulfita. Na osnovu datog rezultata, utvrđeno je da je metoda izolacije RNK trizolom iz minikrtola, bolja u odnosu na metodu izolacije RNK natrijum-sulfitom, te je ona korišćena u daljem radu.

Nakon što je utvrđeno da su izolovane RNK iz minikrtola krompira sorti Désirée i Festival bile zadovoljavajućeg kvaliteta, što je provereno na agaroznom gelu, izolovana RNK je dalje reverzno transkribovana, a potom i amplifikovana specifičnim prajmerima. Prvo je proverena specifičnost prajmera odabranih genskih transkripata, a rezultat je pokazao da su svi dizajnirani prajmeri bili specifični dajući PCR produkte približne dužine očekivanoj dužini (**Tabela 8.**).

**Tabela 8.** Provera dužine amplifikovanih fragmenata eEF1A gena nakon reverzne transkripcije i PCR amplifikacije kod krompira.

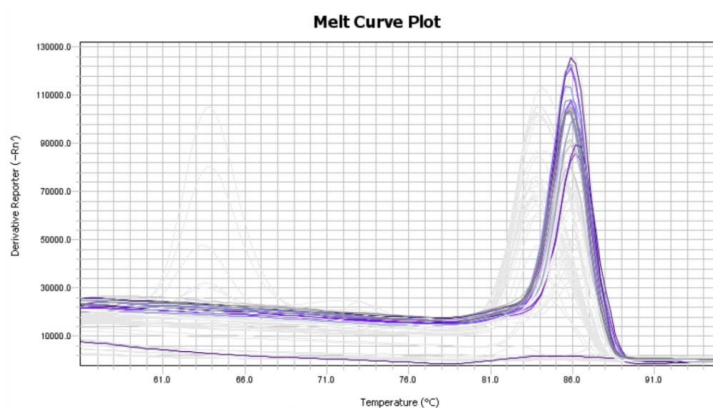
Naziv prajmera	Očekivana dužina (bp)	Dobijena dužina (bp)
18S	190	198
<i>eEF1A-1</i>	248	250
<i>eEF1A-2</i>	272	281
<i>eEF1A-3</i>	195	201
<i>eEF1A-4</i>	252	251
<i>eEF1A-5</i>	154	152
<i>eEF1A-6</i>	326	319
<i>eEF1A-7</i>	167	173
<i>eEF1A-8</i>	307	300
<i>eEF1A-9</i>	227	225
<i>eEF1A-10</i>	158	152
<i>eEF1A-11</i>	154	147
<i>eEF1A-12</i>	131	134

Standardi za apsolutnu kvantifikaciju transkripata su pripremljeni prečišćavanjem PCR produkata sa gela, koji su kasnije spektrofotometrijski kvantifikovani. Za svaki genski transkript je napravljena serija razblaženja od  $10^9$ - $10^2$  kopija/ $\mu$ l, koja je kasnije korišćena kao standard za qPCR. Na **Slici 41.** prikazan je izgled standardne krive poznate koncentracije amplifikovanog PCR produkta *eEFIA-7* transkripta.



**Slika 41.** Primer standardne krive poznatih koncentracija amplifikovanog PCR produkta *eEFIA-7* transkripta za apsolutnu kvantifikaciju qPCR-om.

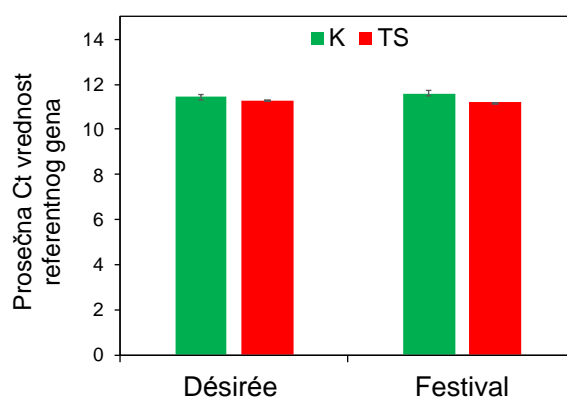
Kriva topljenja svih analiziranih amplikona su ukazivali na to da su prajmeri za sve analizirane transkripte *eEFIA* gena bili efikasni i dostizali su po jedan maksimum na istim temperaturama. Primer krive topljenja amplifikovanog PCR produkta *eEFIA-1* transkripta je prikazan na **Slici 42.**



**Slika 42.** Analiza temperature topljenja amplifikovanog PCR produkta *eEFIA-1* transkripta.

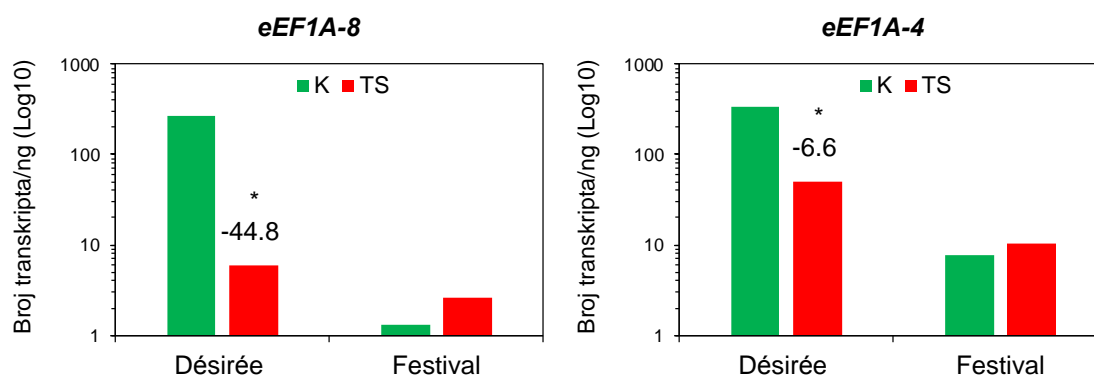


Ujednačena količina ukupne cDNK svih uzoraka je potvrđena paralelnom amplifikacijom referentnog gena za 18S rRNK. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostizao prag detekcije (Ct) referentnog gena za 18S rRNK bio je ujednačen između analiziranih uzoraka koji su bili kontrolni i oni koji su bili pod uticajem toplotnog stresa, na šta ukazuje i odsustvo statističke značajnosti (**Slika 43.**).

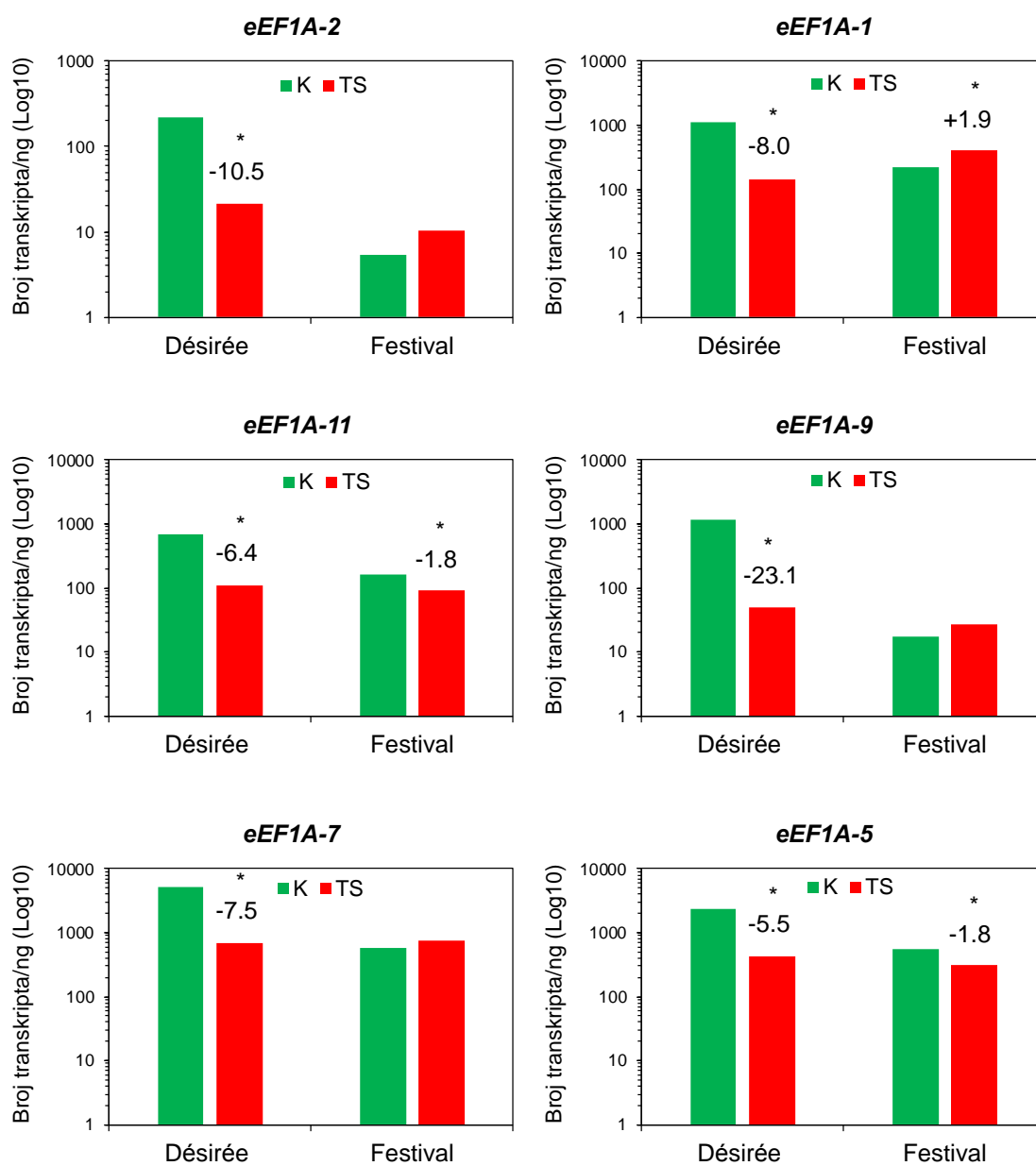


**Slika 43.** Prosečan broj ciklusa posle kojih se postiže prag detekcije referentnog 18S gena za qPCR analizu transkripata *eEF1A* gena tokom kontrolnih uslova i u uslovima toplotnog stresa u minikrtolama krompira. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti tri tehnička ponavljanja  $\pm$  SE.

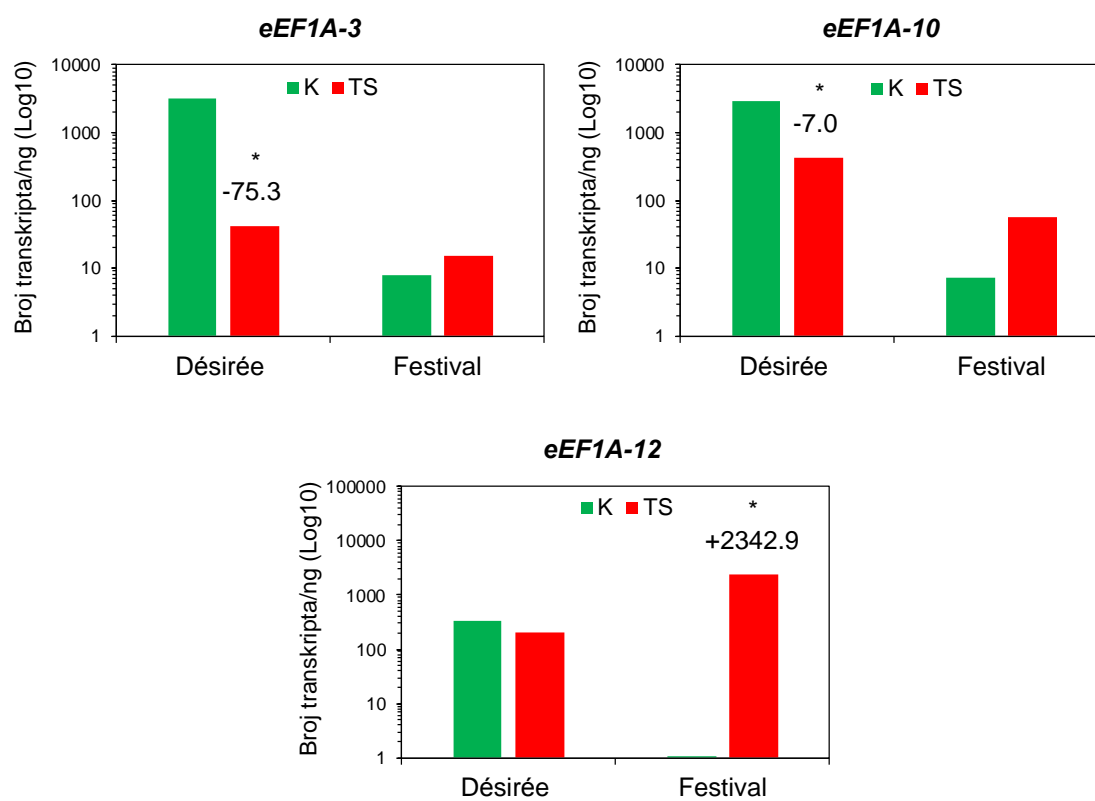
Metodom qPCR-a je utvrđen apsolutni broj cDNK transkripata *eEF1A* gena u minikrtolama kod sorti Désirée i Festival u kontrolnim uslovima i uslovima toplotnog stresa (**Slika 44.**).



## Nastavak Slike 44.



Nastavak **Slike 44.**



**Slika 44.** Apsolutni broj cDNK transkripata *eEF1A* gena (po 1 ng RNK) u minikrtolama krompira. Vrednosti iznad barova sa predznakom predstavljaju koliko puta se smanjila (-) ili povećala zastupljenost (+) *eEF1A* transkripata u minikrtolama u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti tri tehnička ponavljanja. Vrednosti označene \* predstavljaju statistički značajne razlike između dva tretmana u okviru jedne sorte krompira, prema LSD testu ( $p < 0.05$ ).

Na **Slici 44.** je prikazana zastupljenost jedanaest transkripata, a kako analiza zastupljenosti transkripta *eEF1A-6* nije bila uspešna, zastupljenost ovog transkripta je izostavljena sa **Slike 44.** Dvofaktorijalnom analizom varijanse za svaki od ispitanih genskih transkripata je ustanovljeno da je temperaturni režim imao značajnog uticaja na njihovu zastupljenost ( $p < 0,05$ ), kao i da je bilo značajne razlike među analiziranim sortama ( $p < 0,05$ ), a takođe je bilo i značajne interakcije faktora sorta i temperaturni režim ( $p < 0,05$ ).

Kod sorte Désirée u uslovima toplotnog stresa dolazi do smanjenja zastupljenosti većine transkripata, a najveće takvo smanjenje je detektovano za

transkript *eEF1A-3* od 75,3 puta u odnosu na kontrolu. Takođe veliko smanjenje, od 44,8 puta u zastupljenosti u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu, je detektovano i za transkript *eEF1A-8*. Kod ostalih analiziranih transkripata, dolazi u proseku do smanjenja zastupljenosti od 7,5 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu, a jedino nije bilo značajne promene u zastupljenosti transkripta *eEF1A-12* između dva temperaturna režima.

Sa druge strane, kod sorte Festival u uslovima toplotnog stresa zabeleženo je značajno povećanja zastupljenosti pojedinih *eEF1A* transkripata u odnosu na kontrolu. Najveće i najznačajnije takvo povećanje od 2342,9 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu je zabeleženo za transkript *eEF1A-12*. Zbog toliko velikog povećanja u zastupljenosti *eEF1A-12*, može se pretpostaviti da gen čiji je transkript *eEF1A-12* najviše doprinosi značajnom povećanju ekspresije eEF1A proteina u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu kod ove sorte krompira. Do manjeg povećanja zastupljenosti od 1,9 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu je detektovano za transkript *eEF1A-1*, dok je za transkripte *eEF1A-5* i *eEF1A-11* detektovano da dolazi do njihovog smanjenja od 1,8 puta u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu, a za ostale analizirane transkripte broj se nije značajno menjao između dva primenjena temperaturna režima.

## 5. Diskusija

### 5.1. Uticaj toplotnog stresa na rastenje, razviće i tuberizaciju biljaka krompira

Većina komercijalnih sorti krompira je selektovana za gajenje u regionima sa umerenom temperaturom, te je zbog toga krompir veoma osetljiv na delovanje visoke temperature. U poređenju sa drugim fiziološkim procesima, kao što su rastenje izdanaka (temperaturni optimum 32 °C) ili razviće listova (temperaturni optimum 28 °C), proces tuberizacije kod krompira karakteriše značajno niži temperaturni optimum (Struik, 2007a). Najosetljivije faze u procesu tuberizacije predstavljaju indukcija ili inicijacija (optimum od 15-22 °C) i nalivanje krtola (optimum od 14-22 °C), dok inicijacija i izduživanje stolona ima temperaturni optimum u opsegu od 22-25 °C (Struik, 2007a). U ovoj tezi eksplantati različitih sorti krompira su gajeni *in vitro* i podvrgnuti kontrolnoj temperaturi od 21 °C ili visokoj temperaturi od 29 °C u uslovima koji favorizuju formiranje krtola kod krompira (kontinualni mrak i 8% saharoza u osnovnom MS medijumu). Nakon 30 dana gajenja, izmeren je broj preživelih eksplantata, dužina izdanaka i broj eksplantata sa formiranim mikrokrtolama. Uočeno je da je na temperaturi od 29 °C, sorta Agria imala najmanji broj preživelih eksplantata u odnosu na ostale sorte krompira, dok se druge ispitane sorte nisu razlikovale u broju preživelih eksplantata na istom tretmanu (**Slika 10.**). Međutim, mnogo veći uticaj na preživljavanje eksplantata imala je sama sorta/genotip krompira, pa je tako kod sorte Agria zabeležen najmanji broj preživelih eksplantata i na temperaturi od 21 °C u odnosu na ostale sorte krompira. Zanimljivo je da je rastenje izdanaka kod pojedinih sorti krompira, poput Agria, Désirée i Arnova, stimulirano relativno visokom temperaturom od 29 °C, dok je kod ostalih sorti krompira zabeležena slična prosečna dužina izdanaka na oba temperaturna tretmana (21 °C i 29 °C) (**Slika 11.**). Ovi nalazi govore u prilog činjenici da se optimalne temperature za rastenje izdanaka i inicijaciju i rastenje krtola značajno razlikuju kod krompira.

Kod ispitanih sorti krompira, izdanci su se uglavnom formirali na sedećim mikrokrtolama nakon što su se one obrazovale. Ovakvo formiranje izdanaka na mikrokrtolama je slično procesu klijanja krtola, a izgled jednog tako formiranog izdanka se može videti na **Slici 16.** B. Levy i Veilleux (2007) su pokazali da visoke temperature

dovode do ranijeg klijanja krtola krompira, a Wiltshire i Cobb (1996) da je dužina perioda dormancije obrnuto proporcionalna temperaturi. Tako su optimalne temperature za prekid dormancije krtola 28 °C, a za rast izdanaka u opsegu od 20-25 °C kod krompira (Struik, 2007a).

Određivanjem broja formiranih mikrokrtola na dva temperaturna tretmana kod različitih sorti krompira je uočeno da je primenjena visoka temperatura značajno uticala na stupanj inicijacije krtola u odnosu na tretman temperaturom od 21 °C (**Slika 12.**). Najveći takav uticaj visoke temperature je zabeležen kod sorte Désirée, a potom i kod sorti Liseta i Agria, dok kod ostalih sorti nije bilo značajne razlike u broju formiranih mikrokrtola između dva temperaturna tretmana (21 °C i 29 °C). Ove razlike u uticaju visoke temperature na preživljavanje eksplantata, rastenje izdanaka i inicijaciju mikrokrtola kod ispitanih sorti krompira se može objasniti time da analizirane sorte/genotipovi krompira imaju različiti temperaturni opseg koji karakteriše ove morfogetske procese. Budući da su obe temperature kojima su jednodalni eksplantati bili izloženi u eksperimentu, bile ili blizu ili u opsegu za navedene procese, moguće je izneti pretpostavku da korišćeni temperaturni tretmani remete broj formiranih mikrokrtola i/ili trajanje dormancije mikrokrtola i promovišu rastenje apikalnog pupoljka na mikrokrtolama ubrzo nakon njihovog formiranja.

Radi ispitivanja uticaja visoke temperature na dinamiku procesa tuberizacije u uslovima *in vitro* na dva temperaturna tretmana (21 °C i 29 °C) i u uslovima koji favorizuju tuberizaciju (kontinualni mrak i 8% saharoza u osnovnom MS medijumu), izabrane su dve sorte krompira koje se razlikuju u odgovoru na visoku temperaturu prema broju formiranih mikrokrtola u odnosu na kontrolu. To su bile sorte Désirée kod koje je visoka temperatura najviše remetila proces tuberizacije i sorta Festival kod koje to nije bio slučaj. Dinamika tuberizacije je određivana brojanjem broja formiranih mikrokrtola u intervalima od 5 dana (**Slike 14.** i **15.**). Već nakon 5 dana kultivacije, kod obe sorte krompira, Désirée i Festival, je uočeno formiranje mikrokrtola na oba temperaturna tretmana, a nakon 10 dana, obe sorte krompira dostigle su broj mikrokrtola koji se nije menjao sve do kraja eksperimenta. Nakon 30 dana koliko je trajao eksperiment, razlike u odnosu broja formiranih mikrokrtola među sortama, na

temperaturama od 21 °C i 29 °C, ukazuju da se sorta Festival mnogo bolje prilagođava uslovima visoke temperature za razliku od sorte Désirée. Kod obe ispitane sorte krompira, većina formiranih mikrokrtoala su po tipu sesilne (**Slika 17.**). Ovaj rezultat je u suprotnosti sa nalazima Vreugdenhil i sar. (1998), kao i Xu i sar. (1998a) na sorti krompira Bintje kod koje se uniformno i sinhrono formirale sesilne mikrokrtole ili mikrokrtole na kratkim strukturama sličnim stolonima nakon 5 dana kultivacije jednonodalnih odsečaka stabala gajenih na osnovnom MS medijumu sa 8% saharoze u uslovima kontinualnog mraka. Kako je visoka temperatura od 29 °C koja je korišćena u eksperimentu, blizu temperaturnom optimumu za prekid dormancije, to je i pojavljivanje izdanaka na mikrokrtolama uočeno mnogo ranije, i to već petog dana kultivacije pri navedenoj temperaturi u poređenju sa pojavljivanjem izdanaka na temperaturi od 21 °C kod obe sorte krompira (kod sorte Désirée je 15-og dana, a kod sorte Festival 10-og dana) (**Slika 16.**).

Razmatrajući uticaj visoke temperature na proces tuberizacije kod sorti krompira Desiree i Festival, može se pretpostaviti da temperatura od 21 °C predstavlja gornju granicu optimalnog temperaturnog opsega, a da je temperatura od 29 °C značajno viša u odnosu na optimalnu temperaturu za većinu faza procesa tuberizacije kod krompira (Struik, 2007a). Rezultati dobijeni za sortu Désirée, kao što su manji broj, dijametar, ali i manja masa i prinos mikrokrtoala pri visokoj temperaturi, podržava pretpostavku da je temperatura od 29 °C blizu gornje temperaturne granice za proces tuberizacije i da je njen uticaj na ovu sortu krompira, ima efekat toplotnog stresa (**Slika 13.**). Međutim, sa druge strane, temperatura od 29 °C nije imala značajnog uticaja bilo na inicijaciju mikrokrtoala, ili njihovo nalivanje, kod sorte Festival, tako da se na osnovu ovih parametara ne može zaključiti da je data visoka temperatura uslovlila toplotni stres. Dalje je uočeno da u uslovima toplotnog stresa nema značajne promene u zastupljenosti pojedinih tipova mikrokrtoala, poput bazalnih i apikalnih, ali se mikrokrtole medijalnog tipa nisu formirale u uslovima toplotnog stresa ni kod sorte Désirée, niti kod sorte Festival. Uzimajući u obzir i ostale rezultate za morfološke osobine kod ove dve sorte krompira, može se zaključiti da temperatura od 29 °C, pored toga što utiče na proces tuberizacije, utiče i na rasteenje izdanaka kod sorte Désirée, ali ne utiče na ove procese

kod sorte Festival, te se može pretpostaviti da sorta Festival ima drugačiji temperaturni opseg za navedene procese u odnosu na sortu Désirée. Stoga su ove dve sorte krompira označene kao sorte različite osetljivosti na visoke temperature, sa suprotnim tuberizacionim odgovorom na visoku temperaturu. U daljem radu, sorte Désirée i Festival su korišćene i u eksperimentima *ex vitro*.

Kod biljaka krompira sorte Désirée i Festival, koje su gajene *ex vitro* i izložene sedmodnevnom temperaturnom režimu od 30/24 °C (dan/noć) ili 20/18 °C je ustanovljeno da postoje razlike u odgovoru ove dve sorte na delovanje visoke temperature što je prethodno utvrđeno u eksperimentima *in vitro*. Naime u uslovima visoke temperature došlo je do značajnog rasta izdanaka, povećanja sveže nadzemne biomase, kao i broja nodusa i listova kod sorte Désirée, dok je kod sorte Festival došlo do smanjenja sveže nadzemne biomase, visine izdanaka i broja listova, dok se broj nodusa nije značajno menjao u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu (**Slika 23.**). Rezultat dobijen za sortu Désirée potvrđuje prethodni rezultat na ovoj sorti gajenoj *in vitro* gde takođe dolazi do značajnog rasta izdanaka pod uticajem visoke temperature, dok sa druge strane kod sorte Festival takav uticaj nije primećen. Međutim, rezultati uticaja visoke temperature na inicijaciju krtola i prinos u masi kod sorti Désirée i Festival u uslovima *in vitro*, se razlikuju od rezultata dobijenih gajenjem ovih biljaka u uslovima *ex vitro*. Naime, sorta Festival je u kontrolnim uslovima, kao i u uslovima visoke temperature *ex vitro*, imala veći broj minikrtola i veći prinos u odnosu na sortu Désirée (**Slika 26.**), dok je u uslovima *in vitro*, sorta Désirée imala znatno veći prinos u odnosu na sortu Festival pri kontrolnoj temperaturi. Ove razlike mogu predstavljati rezultat toga što su u pitanju dva različita načina gajenja biljaka. Dnevna temperatura od 30 °C je znatno viša od optimalne temperature za inicijaciju stolona (22-25 °C), dok je noćna temperatura od 24 °C na gornjoj granici ovog temperaturnog optimuma. Uticaj ovakvog temperaturnog režima je bio mnogo veći na sortu Désirée u odnosu na sortu Festival koja je formirala 4,3 puta veći broj stolona (**Slika 25.**). Pored toga, sorta Festival je imala i 2,2 puta veći broj stolona sa iniciranim minikrtolama u odnosu na sortu Désirée u uslovima ovakvog temperaturnog režima.



Ahloowalia (1994) navodi da je broj dobijenih minikrtola najznačajniji parametar prinosa tuberizacije. Kod sorti krompira Désirée i Festival gajenih *ex vitro* je ustanovljeno da je ukupan broj minikrtola i prosečan broj minikrtola po biljci na kontrolnom temperaturnom režimu i na režimu visoke temperature veći kod sorte Festival u odnosu na sortu Désirée. Naime, u kontrolnim uslovima sorta Festival je imala 1,4 puta i u uslovima visoke temperature 1,7 puta veći, kako ukupan broj minikrtola, tako i prosečan broj minikrtola po biljci, u odnosu na sortu Désirée (**Slika 27. A**). Ovaj rezultat pokazuje da je sorta Festival produktivnija u smislu formiranja krtola u odnosu na sortu Désirée, kako na nižim temperaturama, tako i u uslovima visoke temperature.

Ispitivanjem uticaja visoke temperature na distribuciju različitih veličina minikrtola kod sorti krompira Désirée i Festival gajenih *ex vitro*, je ustanovljeno da je najveći uticaj visoka temperatura imala na broj minikrtola veličine od 10-15 mm (**Slika 27. B**). Naime, kod sorte Désirée došlo je do značajnog smanjenja, dok je kod sorte Festival došlo do povećanja broja minikrtola veličine od 10-15 mm u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu. Ewing i Struik (1992) su pokazali da temperatura značajno utiče na raspodelu asimilata kod biljaka krompira, te da usled povećanja temperature, transport asimilata ide ka nadzemnim delovima biljaka koji se više razvija, a posledica toga je da se smanjuje veličina krtola kod krompira. Tako su Jenkins i Mahmood (2003) pokazali da temperatura iznad 23 °C favorizuje raspodelu suve materije u listove na račun rasta krtola. Visoka temperatura koja je korišćena u ovoj tezi je bila značajno iznad 23 °C (30 °C), te je moguće da je kod sorte Désirée rast izdanka, povećanje broja nodusa i listova, a tako i sveže mase nadzemnog dela biljke, u uslovima visoke temperature rezultat translokacije ugljenih hidrata iz podzemnih delova biljaka u nadzemne, što rezultuje u manjem prinosu po biljci kod ove sorte krompira u odnosu na sortu Festival (**Slika 27. B**). Sa druge strane, kod sorte Festival biljke su bile nižeg rasta u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, te je tako moguće da translokacija asimilata kod sorte Festival nije osetljiva na delovanje visoke temperature i nastavlja da se odvija ka podzemnim delovima biljaka, u krtole, što je uticalo na veći prinos.

Na osnovu dobijenih rezultata kod sorti Désirée i Festival gajenih *ex vitro*, može se potvrditi da su ove dve sorte krompira različite osetljivosti na delovanje visoke temperature, sa različitim tuberizacionim odgovorom na delovanje takve temperature.

## 5.2. Ekspresija eEF1A u uslovima toplotnog stresa

Elongacioni faktor translacije eEF1A se može smatrati proteinom koji je povezan sa odgovorom na abiotički stres kod biljaka. Ovaj protein predstavlja multifunkcionalni protein sa različitim ulogama u ćelijama. Osnovna uloga eEF1A u eukariotskim ćelijama je transport aminoacil-tRNK do mesta A na ribozomima (Berisio i sar., 2010). Pored ove osnovne uloge, ovi proteini se mogu vezati i za denaturisane proteine, sprečavajući tako njihovu agregaciju, što ukazuje na šaperonsku aktivnost eEF1A sličnu sHSP (Hotokezaka i sar., 2002). Takođe, Lukash (2006) je pokazao da obe konformacije eEF1A [zatvorena (aktivna) i otvorena (neaktivna)], slično molekularnim šaperonima, mogu vršiti disagregaciju proteinskih agregata koji nastaju u procesu termalne agregacije. Sa druge strane, nasuprot važnoj ulozi u elongacionoj fazi sinteze proteina i zaštiti proteina od agregacije, eEF1A mogu imati značajnu ulogu i u degradaciji proteina. Ustanovljeno je da eEF1A omogućava proteazomima da lakše prepoznaju proteine označene za razgradnju (Chuang i sar., 2005). Iako postoji niz studija o akumulaciji drugih elongacionih faktora ili faktora inicijacije, poput hloroplastnog EF-Tu, eIF4A i eIF5A u uslovima toplotnog stresa (Fu i sar., 2012b; Kosova i sar., 2014; Momčilović i Fu, 2014; Dutt i sar., 2015), visokom temperaturom indukovana akumulacija eEF1A je jedino zabeležena kod pšenice (Bukovnik i sar., 2009) i pirinča (Li i Chen, 1999; Gammulla i sar., 2011).

U ovoj tezi, prvo je analizirana ekspresija eEF1A kod različitih vrsta monokotiledonih (pšenica, kukuruz, luk) i dikotiledonih biljaka (uročnjak, paradajz, krompir i cvekla) gajenih *ex vitro* u sobi za gajenje biljaka na temperaturi od 23 °C (kontrola) i kasnije izlagane kratkotrajnom toplotnom stresu (postepen porast temperature od 23-40 °C prva dva sata, 40 °C tokom 6 h). Među analiziranim biljnim vrstama, toplotni stres je najviše indukovao ekspresiju eEF1A u listovima krompira i to od 3,4 puta u odnosu na kontrolu. Kod pšenice i kukuruza, zastupljenost eEF1A je bila

povećana 1,2 puta, a povećanje od 1,5 puta je detektovano kod cvekle u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu, dok se kod praziluka i uročnjaka, ekspresija eEF1A nije menjala pod uslovima toplotnog stresa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da neke od ispitivanih vrsta, poput krompira, pšenice, kukuruza i cvekle, povećavaju produkciju eEF1A u odgovoru na delovanje visoke temperature.

Ekspresija eEF1A je dalje ispitivana u mikrokrtolama i izdancima sorti Désirée i Festival, gajenim u uslovima *in vitro* koji favorizuju formiranje krtola na dva temperaturna tretmana (21 °C, kontrola i 29 °C, visoka temperatura). Kod obe sorte krompira detektovano je slično povećanje zastupljenost eEF1A u izdancima tokom tretmana visokom temperaturom i to od 1,2-1,3 puta u odnosu na tretman temperaturom od 21 °C (**Slika 18. A**). Pored toga, između sorti Désirée i Festival nisu postojale značajne razlike u zastupljenosti eEF1A u izdancima, na primenjenim tretmanima. Za razliku od zastupljenosti eEF1A u izdancima, ove dve sorte su se razlikovale u ekspresiji eEF1A u mikrokrtolama na oba temperaturna tretmana (**Slika 18. B**). U mikrokrtolama sorte Festival detektovano je 2,2 puta više eEF1A u odnosu na sortu Désirée u uslovima visoke temperature. Važno je napomenuti da se sorta Festival karakterisala većim brojem mikrokrtola sa većim prečnikom i masom u poređenju sa sortom Désirée u uslovima visoke temperature. Ove dve sorte krompira su dalje ispitivane i u eksperimentima *ex vitro* (**Slike 28. i 30.**). Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da je tretman visokom temperaturom (30/24 °C, dan/noć, 7 dana) imala značajan uticaj na ekspresiju eEF1A u listovima, kao i ekspresiju ovog proteina u stolonima i minikrtolama. Naime, sorta Festival, pored toga što je imala veći prinos u masi minikrtola u uslovima visoke temperature u odnosu na sortu Désirée, karakterisala se i višim nivoom akumulacije eEF1A u najvećim i najstarijim analiziranim minikrtolama (10-15 mm) u odnosu na sortu Désirée. Interesantno je što se na osnovu distribucije veličina minikrtola kod sorte Festival gajene *ex vitro*, može videti da je došlo do značajnog povećanja broja upravo ovih minikrtola veličine od 10-15 mm u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolnu (**Slika 27. B**). Sa druge strane, kod sorte Désirée gajene *ex vitro* došlo je do značajnog smanjenja broja ovih minikrtola (10-15 mm) u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, a analiza

zastupljenosti eEF1A u ovim minikrtolama je pokazala da je došlo i do smanjenja ekspresije ovog proteina u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu. Daljom analizom zastupljenost eEF1A u stolonima kod ove dve ispitane sorte krompira gajene *ex vitro* je pokazano da je kod sorte Désirée došlo do povećanja zastupljenosti ovog proteina u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, dok se kod sorte Festival smanjila, a takođe je nivo zastupljenosti ovog proteina bio kod sorte Désirée veći u odnosu na sortu Festival u uslovima visoke temperature. Međutim, i pored toga, broj formiranih stolona kod sorte Désirée je bio značajno manji u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na sortu Festival u uslovima visoke temperature. Sa druge strane, kod sorte Festival nije zabeležena značajna razlika u broju stolona između dva temperaturna tretmana. Posmatrano sve zajedno, ovi rezultati ukazuju da akumulacija eEF1A može biti značajna kako za formiranje, tako i za uvećanje krtola krompira tokom delovanja visoke temperature, ali ne i za broj stolona. Značajnost ovih rezultata je dalje proverena i eksperimentima u polju kod različitih sorti krompira tokom dve uzastopne godine (2011. i 2012.). Kod ovih sorti krompira, analizirana je ekspresija eEF1A u prvim potpuno razvijenim listovima u uslovima visoke temperature (34-35 °C) i uslovima umerene temperature (23 °C) (**Slika 33.**), Ustanovljeno da se ispitivani genotipovi krompira značajno razlikuju u akumulaciji eEF1A, ali je povećanje akumulacije eEF1A u uslovima toplotnog stresa detektovano kod svih šest sorti krompira gajenih u eksperimentalnom polju. Sorta Jelly pokazivala je najveću akumulaciju eEF1A od 5,5 puta pod uticajem visoke temperature u odnosu na kontrolu, dok je sorta Marabel akumulirala najveću količinu eEF1A tokom delovanja visoke temperature u poređenju sa ostalim sortama krompira. Zastupljenost ovog proteina je dalje korelisana sa visinom primarnih izdanaka, svežom nadzemnom biomasom i parametrima prinosa: brojem krtola po biljci, masom krtola i prinosom po plotu (**Slika 35.**). Značajna pozitivna korelacija je utvrđena jedino između akumulacije eEF1A kod različitih sorti tokom delovanja visoke temperature i broja krtola po biljci ili prinosa po plotu, dok zastupljenost eEF1A tokom visoke temperature nije pokazala značajnu korelaciju sa ostalim izmerenim parametrima. Godine 2011. i 2012. su bile ekstremno tople, leto 2012. je bilo najtoplije još od 1888. kada su merenja počela da se beleže u Srbiji. Prvi incident visokom temperaturom (>33 °C) u obe godine je zabeležen

tokom meseca juna, u periodu indukcije i inicijacije krtola. Ova prva faza tuberizacije može biti značajno odložena ili čak prekinuta pod uticajem visoke temperature (Struik, 2007a). Pored toga, set krtola, kao na primer broj iniciranih krtola koji imaju sposobnost da razviju tržišne krtole, se može smanjiti kada temperaturni uslovi ne dozvoljavaju razviće svih rastućih krtola. Ovi rezultati pokazuju da one sorte koje akumuliraju veću količinu eEF1A tokom visoke temperature produkuju više krtola i imaju eventualno veći prinos u poređenju sa onim sortama koje znatno manje akumuliraju ovog proteina.

### 5.3. Karakterizacija izoformi eEF1A proteina

Detaljnija analiza eEF1A proteina urađena je kod biljaka krompira sorte Désirée gajenih *ex vitro*. Biljke su bile izložene izrazito visokoj temperaturi od 40 °C, u trajanju od 6 sati. Analizirana je ekspresija ovog proteina u najmlađim listovima, prvim potpuno razvijenim i najstarijim listovima (**Slika 21.**). Povećanje zastupljenosti eEF1A je detektovano u svim analiziranim listovima krompira sorte Désirée u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, a najveće takvo povećanje od 1.5 puta je zabeleženo u prvim potpuno razvijenim i najstarijim listovima. U mladim listovima koji se još razvijaju, zastupljenost ovog proteina je bila najveća na kontrolnoj temperaturi u odnosu na ostale ispitane listove, a u uslovima visoke temperature je došlo do najmanje indukcije ekspresije u odnosu na kontrolu. Ovakav rezultat za mlade listove je bio i očekivan, s obzirom da se u njima odigrava značajna sinteza proteina, a eEF1A je neophodan za odigravanje datog procesa. Kako je elongacioni faktor eEF1A jedan od najzastupljenijih proteina u eukariotskim ćelijama, čiji je udeo od 3-10% od ukupnih solubilnih proteina (Merrick, 1992), povećanje njegove zastupljenosti od 1,1 puta koliko je bilo u najmlađim listovima do 1,5 puta u prvim potpuno razvijenim listovima i najstarijim listovima u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu predstavlja značajnu promenu u količini ukupnih proteina u biljnim ćelijama krompira. Slično povećanje zastupljenosti od 1,7 puta u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, detektovano je i u prvim potpuno razvijenim listovima biljaka sorte Desiree gajenih u eksperimentalnom polju.

2D-imunoblot analizom proteina iz prvih potpuno razvijenih listova krompira sorte Désirée gajene *ex vitro* izlagane temperaturi od 40 °C u trajanju od 6 h je pokazano da postoji 7-8 proteinskih tačaka/izoforni eEF1A (**Slika 22.**). Kiselu grupu ovih proteinskih tačaka čija je pI vrednost u opsegu od 6-7, čine 5 izoforni proteina, dok baznu grupu (pI 8,8-9,5) čine 2-3 izoforme. Izoforme proteina iz bazne grupe su mnogo više zastupljene u listovima biljaka koje su bile izložene visokoj temperaturi, što ukazuje na to da su ove proteinske forme inducibilne u uslovima kratkotrajnog toplotnog stresa. 2D-imunoblot analiza eEF1A proteina kod sorte Désirée gajene u polju, je pokazala da takođe dolazi do akumulacija dve bazne izoforme/polipeptida (**Slika 34.**). Kod drugih sorti krompira gajenih u polju, kao na primer kod sorte Agria, detektovano je da u listovima dolazi do akumulacije jedne bazne izoforme, dok kod sorte Marabel, dolazi do izrazitog povećanja zastupljenosti čak tri bazne izoforme. Kod eukariotskih organizama, protein eEF1A je bazni protein, a njegova pI vrednost iznosi od 9,1-9,7 (Norbeck i Blomberg, 1997; Infante i sar., 2008). Izračunata pI vrednost eEF1A kod sorte krompira Désirée korišćenjem izvedene aminokiselinske sekvence (GenBank CAD60652.1) i unapređenog algoritma Kozlowski (2007) iznosi 9,3. Ova izračunata vrednost je u opsegu pI vrednosti eEF1A bazne grupe utvrđene eksperimentalnim radom u ovoj tezi. S obzirom da je aminokiselinska sekvencija eEF1A visoko očuvana, postojanje dodatnih izoforni može biti posledica posttranslacionih modifikacija. Najučestalija posttranslaciona modifikacija eEF1A je fosforilacija serin/treonin kinazama (Sasikumar i sar., 2012) koja dovodi do pomeranja proteina ka kiselim pI vrednostima. Zabeleženo je da samo jedna fosforilacija može tako smanjiti pI vrednost proteina za 1-2 pH jedinice (Yamagata i sar., 2002). Protein eEF1A može biti fosforilisan na više mesta (Chang i Traugh, 1998), što bi rezultovalo u pojavljivanju nekoliko izoforni koje se međusobno razlikuju po broju fosfoserina ili fosfotreonina, a samim tim i po pI vrednostima.

#### **5.4. Uticaj visoke temperature na ekspresiju HSP-a**

Brz odgovor biljaka na delovanje toplotnog stresa podrazumeva sintezu HSP-a, poput HSP101, HSP70 i sHSP (Kotak i sar., 2007). Proteini toplotnog stresa male

molekulske mase, sHSP, deluju kao molekularni šaperoni koji se vezuju za delimično odvijene proteinske supstrate i sprečavaju njihovu nepovratnu termalnu agregaciju, dok su HSP100 molekularni šaperoni uključeni u disagregaciju nerastvornih proteinskih agregata i/ili razgradnju nepovratno oštećenih polipeptida (Doyle i Wickner, 2009; Doyle i sar., 2013). U ovoj tezi su analizirane citosolna klasa I HSP17.6 proteina i citosolni HSP101/ClpB proteini u izdancima i mikrokrtolama kod dve sorte krompira, Désirée i Festival, gajene *in vitro* koje se razlikuju u tuberizacionom odgovoru na visoku temperaturu (29 °C) (Slike 19. i 20.). Klasa I citosolnih sHSP-a u uslovima toplotnog stresa kod biljaka se eksprimira već nakon par sati izlaganja stresu i zajedno sa klasom II čini preko 1% od ukupnih proteina u ćeliji (DeRocher i sar., 1991; van Montfort i sar., 2001; Basha i sar., 2010). U uslovima toplotnog stresa, takođe su značajni i HSP101/ClpB proteini, naročito za disagregaciju citosolnih sHSP i denaturisanih proteina sa kojima su oni interagovali (McLoughlin i sar., 2016). Queitsch i sar. (2000) su pokazali kod transgenih biljaka *A. thaliana* da se tolerancija ovih biljaka prema toplotnom stresu menja sa nivoom zastupljenosti HSP101, što ukazuje na značajnu ulogu ovih proteina u termotoleranciji kod biljaka.

U ovoj tezi, akumulacija HSP17.6-CI nije detektovana niti u analiziranim mikrokrtolama, niti u izdancima, kod obe ispitane sorte krompira pri kontrolnoj temperaturi od 21 °C. Međutim, akumulacija ovih citosolnih proteina je bila indukovana visokom temperaturom (29 °C) u izdancima i mikrokrtolama i detektovana je kod obe sorte krompira pri ovom temperaturnom tretmanu. Sličan nivo uvećanja zastupljenosti je detektovan i za HSP101 u izdancima kod obe sorte krompira nakon 30 dana izlaganja visokoj temperaturi. U poređenju sa sortom Désirée, sorta Festival akumulirala je 1,5 i 1,2 puta veću količinu HSP17.6 i HSP101 u izdancima na tretmanu visokom temperaturom, tim redosledom. Sa druge strane, akumulacija HSP17.6 u mikrokrtolama kod sorte Désirée je bila 3,2 puta veća u poređenju sa sortom Festival pri visokoj temperaturi (29 °C), dok su obe sorte akumulirale sličnu količinu HSP101 u mikrokrtolama pri navedenom tretmanu. Ovi rezultati sugerišu da su i HSP100 i sHSP proteini od ključnog značaja za sticanje termotolerancije kod viših biljaka. Hong i Vierling (2000) analizirajući hot 1 mutante *A. thaliana* su pokazali da mutacija u genu

koji kodira protein HSP101 značajno smanjuje mogućnost klijanaca da steknu termotoleranciju. Studija na genu koji kodira HSP17.7 kod šargarepe (*DcHSP17.7*) je pokazala da prekomerna ekspresija *DcHSP17.7* povećava termotoleranciju šargarepe (Malik i sar., 1999), dok unošenje ovog istog gena u genom krompira povećava stabilnost ćelijskih membrana, kao i formiranje krtola u *in vitro* uslovima tokom dugotrajnog TS-a (Ahn i Zimmerman, 2006). U ovoj tezi, značajno veći nivo akumulacije HSP17.6-CI kod sorte Désirée u mikrokrtolama nije poboljšao proces tuberizacije u uslovima visoke temperature u poređenju sa sortom Festival. Međutim kako su ovi proteini korišćeni kao markeri toplotnog stresa, može se jasno zaključiti da je primenjena temperatura od 29 °C predstavljala toplotni stres kod obe sorte krompira.

Analiza ekspresije proteina HSP17.6 i HSP101 je urađena i na biljkama krompira, sorte Désirée i Festival, koje su bile gajene u uslovima *ex vitro*. Imunoblot analiza ekspresije HSP17.6 u listovima i podzemnim vegetativnim organima (stolonima, stolonima sa iniciranim minikrtolama i u minikrtolama različite starosti) kod sorti Désirée i Festival nakon izlaganja visokoj temperaturi (30/24 °C, dan/noć) je pokazala da je u uslovima visoke temperature došlo do značajne akumulacije ovog proteina (**Slika 29. A i 31.**). Sa druge strane, u kontrolnim uslovima (20/18 °C, dan/noć), nije detektovana zastupljenost ovog proteina u analiziranim listovima ili podzemnim vegetativnim organima ni kod jedne ispitivane sorte krompira. Veća akumulacija HSP17.6 je detektovana kod obe sorte krompira u najmlađim listovima koji se još razvijaju u odnosu na potpuno razvijene listove u uslovima toplotnog stresa. U ovim listovima je sorta Festival imala veću zastupljenost HSP17.6 u odnosu na sortu Désirée, dok je nivo ovog proteina u prvim potpuno razvijenim listovima bio sličan među ispitivanim sortama u uslovima toplotnog stresa. Dalja analiza zastupljenosti HSP17.6 u podzemnim vegetativnim organima je pokazala da je došlo do značajno veće akumulacije ovog proteina kod sorte Désirée u odnosu na sortu Festival i to u starijim minikrtolama veličine od 5-10 i 10-15 mm. Takođe je zapaženo da sa starošću minikrtola kod sorte Désirée dolazi do povećanja ekspresije HSP17.6 u uslovima visoke temperature, dok je takav odgovor kod sorte Festival bio suprotan, odnosno da sa starošću minikrtola, nivo ovog proteina opada u uslovima visoke temperature. Pored



analize zastupljenosti HSP17.6, analizirana je i zastupljenost HSP101 u listovima različitih starosti i u podzemnim vegetativnim organima u uslovima visoke temperature, te je tako ustanovljeno da je došlo do značajnog povećanja njegove ekspresije u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu kod obe ispitivane sorte krompira (**Slika 29. B** i **32.**). Imunoblot analiza zastupljenosti HSP101 u listovima je takođe pokazala da je došlo do veće zastupljenosti ovog proteina u mladim listovima u odnosu na starije u uslovima toplotnog stresa kod obe sorte krompira, što ukazuje da na zastupljenost ovih proteina veći uticaj ima sama faza razvića listova, a manji toplotni stres. Za razliku od povećanja ekspresije proteina HSP17.6 koje prati starost minikrtola, nivo proteina HSP101 ostao je na sličnom nivou u uslovima visoke temperature u svim analiziranim minikrtolama kod sorte Désirée. Sa druge strane, kod sorte Festival gajene *ex vitro*, došlo je do blagog pada u zastupljenosti proteina HSP101, u uslovima visoke temperature, kod najstarijih minikrtola (10-15 mm), a slična količina ovog proteina detektovana je u minikrtolama iste starosti kod sorte Désirée na istom temperaturnom tretmanu. Pored toga, u kontrolnim uslovima, ovaj protein je bio prisutan kod obe sorte krompira, što ukazuje, kao i kod biljaka krompira gajenih *in vitro*, da je protein HSP101 konstitutivno ekspimiran. Kao i u uslovima *in vitro*, tako i u uslovima *ex vitro*, značajno veća akumulacija HSP17.6 u minikrtolama sorte Désirée u uslovima visoke temperature, nije dovela i do većeg prinosa ove sorte. Analiza ekspresije HSP17.6 u stolonima je pokazala da je sorta Désirée manje akumulirala ovog proteina u odnosu na sortu Festival, a više je akumulirala HSP101, u uslovima visoke temperature. Na osnovu rezultata ekspresije HSP-a u listovima, stolonima i minikrtolama sorti Désirée i Festival, može se zaključiti da je primenjeni temperaturni režim 30/24 °C, dan/noć kod biljaka koje su rasle *ex vitro*, predstavljao toplotni stres.

### **5.5. Uticaj visoke temperature na ekspresiju *eEF1A* gena**

Kod biljaka, eEF1A je kodiran od strane multigenske familije koja se sastoji od 4-20 gena (Momčilović i Fu, 2014). Analiza genomske DNK tretraploidnih sorti krompira urađene u ovoj tezi je pokazala postojanja eEF1A genske familije koja se sastoji od 6-10 gena (**Slika 36.**). Tri sorte krompira (Carrera, Désirée i Laura) poseduju

---

9 hibridizacionih traka nakon restrikcione digestije enzimom *HindIII*. Ovi rezultati su u slaganju sa prethodnim nalazima Costa i sar. (2009) na sorti krompira Désirée. Najveći broj ovih traka, od čak 10, je detektovan kod sorte Marabel, što ukazuje na postojanje dodatnih *eEF1A* kopija i čime se može objasniti pojava dodatnih baznih izoformi *eEF1A* u uslovima visoke temperature u poređenju sa sortama Agria i Désirée. Šest sekvenci *eEF1A* gena pronađenih u genomskoj bazi *S. tuberosum* grupe Phureja duplog monoploida pokazuju visok stepen homologije sa StEF-1 $\alpha$ -412 bp probom što ukazuje na značajno variranje broja genskih kopija *eEF1A* između različitih grupa/sorti *S. tuberosum* (Slika 37. i 38.).

Zanimljivo je da je ekspresija gena koji kodiraju inicijalni faktor 5A3 i protein sličan elongacionom faktoru translacije *eEF1A* kod krompira, indukovana tokom dužeg izlaganja ovih biljaka visokom temperaturom od 35 °C, u trajanju od 48 h (Gangadhar i sar., 2014). Ovaj rezultat ukazuje na to da sinteza proteina može biti odgovor na duže izlaganje biljaka krompira visokoj temperaturi. Povećanje ekspresije gena koji kodiraju *eEF1A* je zabeleženo samo kod nekoliko biljnih vrsta nakon izlaganja niskim temperaturama, suši, solima ili osmotskom stresu (Dunn i sar., 1993; Berberich i sar., 1995; Li i Chen, 1999; Chung i sar., 2009; Costa i sar., 2010; Ambrosone i sar., 2013). Kod krompira, ekspresija pojedinih *eEF1A* gena može biti indukovana, pojačana ili smanjena, ali i ostati nepromenjena pod uticajem visoke temperature, što zavisi od sorte (Slika 42.). Određivanjem apsolutnog broja transkripta gena *eEF1A*, ustanovljeno je da dolazi do njihovog značajnog smanjenja i to kod 10 od 11 analiziranih transkripata kod sorte krompira Désirée u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu. Najveće smanjenje zastupljenosti u uslovima toplotnog stresa, u iznosu od 75,3 puta, ustanovljeno je za transkript *eEF1A-3* kod sorte Désirée. Smanjenje zastupljenosti transkripta gena koji kodiraju *eEF1A* rezultuje u manjoj zastupljenosti proteina *eEF1A* u uslovima toplotnog stresa kod ove sorte krompira. I kod sorte Festival, uočeno je da dolazi do smanjenja zastupljenosti pojedinih transkripata, i to *eEF1A-11* i *eEF1A-5* od 1,8 puta, ali i povećanja zastupljenosti jednog transkripta, *eEF1A-1*, od 1,9 puta u uslovima visoke temperature. Međutim, kod ove sorte krompira zabeležena je izuzetna inducibilnost gena koji kodira transkript *eEF1A-12*, te je zastupljenost ovog transkripta

bila 2342,9 puta veća u uslovima visoke temperature. Ovaj rezultat ukazuje na to da ekspresija gena koji kodira transkript *eEF1A-12* najviše doprinosi povećanju zastupljenosti eEF1A proteina u uslovima visoke temperature kod sorte Festival u odnosu na ostale analizirane gene, što otvara mogućnost za njegovo korišćenje u kreiranju novih, termotolerantnih sorti krompira putem klasičnih metoda selekcije i metoda genetičkog inženjeringa.

## 6. Zaključci

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Nakon 30 dana izlaganja različitih sorti krompira temperaturnim tretmanima od 21 °C i 29 °C, u tuber-indukujućim uslovima *in vitro*, ustanovljeno je da na preživljavanje eksplantata sorta/genotip krompira je imala veći uticaj nego visoka temperatura.
- Visoka temperatura (29 °C) je negativno uticala na inicijaciju mikrokrtola, a pozitivno na rast izdanaka kod pojedinih sorti krompira koje su gajene u tuber-indukujućim uslovima *in vitro*. Kod sorte Liseta, visoka temperatura je dovela do smanjenja broja iniciranih mikrokrtola u odnosu na broj iniciranih na temperaturni tretman od 21 °C, a na rast izdanaka nije imala uticaja, dok kod sorte Arnova, visoka temperatura je najviše uticala na rast izdanaka, ali ne i na inicijaciju mikrokrtola. Kod sorti Agria i Désirée, visoka temperatura je imala značajan uticaj na rast izdanaka i na inicijaciju mikrokrtola, dok kod sorti Festival i Cleopatra nije ustanovljen uticaj na date procese. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da inicijacija mikrokrtola kod sorti Festival i Cleoptra, nije osetljiva na delovanje visoke temperature, što nije slučaj i kod sorti Liseta, Agria i Désirée. Kako je kod sorte Désirée, visoka temperatura dovela je do najvećeg smanjenja broja mikrokrtola, može se smatrati da je faza inicijacija mikrokrtola, kod ove sorte krompira, najosetljivija na delovanje visoke temperature u odnosu na ostale *in vitro* ispitivane sorte krompira.
- Kod dve odabrane sorte krompira sa različitim tuberizacionim odgovorom, Désirée i Festival, ustanovljeno je da je visoka temperatura (29 °C) uticala na rast mikrokrtola samo kod sorte Désirée, što se ogledalo u smanjenju mase, dijametra i prinosa po bočici u odnosu na temperaturni tretman od 21 °C. Ovi rezultati pokazuju da je rastenje (nalivanje) mikrokrtola kod sorte Désirée podložnije uticaju visoke temperature nego kod sorte Festival. Takođe, kod obe sorte krompira, visoka temperatura je uticala na prekid dormancije mikrokrtola, promovšući rastenje apikalnog pupoljka i razviće izdanaka.

- Rezultati dobijeni u experimentima *in vitro*, pokazuju da različite sorte/genotipovi krompira imaju različite optimalne temperaturne opsege za preživljavanje eksplantata, rast izdanaka, inicijaciju i rast mikroktola.
- Analiza ekspresija eEF1A u mikroktolama i izdancima dve sorte krompira, Désirée i Festival koje su rasle u tuber-indukujućim uslovima *in vitro*, je pokazala da sorta Festival akumulira 2,2 puta više ovog proteina u mikroktolama u uslovima visoke temperature (29 °C) u odnosu sortu Désirée, što ukazuje na moguću ulogu ovog proteina u ublažavanju negativnog uticaja visoke temperature na inicijaciju i rast mikroktola.
- Na osnovu rezultata imunoblot analize ekspresije HSP17.6 i HSP101, koji su korišćeni kao proteinski markeri toplotnog stresa, u izdancima i mikroktolama krompira sorti Désirée i Festival gajenih u tuber-indukujućim uslovima *in vitro*, je ustanovljeno da je temperatura od 29 °C predstavljala toplotni stres za ispitivane sorte krompira.
- Veća zastupljenost eEF1A u uslovima toplotnog stresa u većim i starijima minikrtolama kod sorte Festival u odnosu na kontrolu, kao i značajno veći broj ovih minikrtola u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu, ukazuje na značajnu ulogu proteina eEF1A u smanjenju negativnog uticaja toplotnog stresa na inicijaciju minikrtola. Da je protein eEF1A značajan u formiranju broja minikrtola u uslovima visoke temperature, potvrđuje i imunoblot analiza njegove zastupljenosti kod sorte Désirée. Naime, kod ove sorte krompira je ustanovljeno smanjenje broja minikrtola u uslovima visoke temperature u odnosu na kontrolu, ali isto tako i manja zastupljenost eEF1A u minikrtolama u uslovima toplotnog stresa u odnosu na kontrolu.
- Na osnovu rezultata imunoblot analize ekspresije HSP17.6 i HSP101, koji su korišćeni kao proteinski markeri toplotnog stresa, u listovima, stolonima i minikrtolama krompira sorti Désirée i Festival gajenih u uslovima *ex vitro*, je ustanovljeno da je korišćeni temperaturni režim 30/24 °C, dan/noć, predstavljao toplotni stres za ove sorte krompira.

- 
- Pozitivna korelacija ustanovljena je između nivoa zastupljenosti eEF1A tokom visokih temperatura kod različitih sorti krompira gajenih u eksperimentalnom polju i broja krtola i prinosa iz proseka dve ekstremno tople godine, što potvrđuje značajnost ovog proteina u ublažavanju negativnog uticaja toplotnog stresa na proces tuberizacije kod krompira. Drugim rečima, one sorte koje su akumulirale više eEF1A tokom delovanja visoke temperature, su na kraju imale i veći prinos.
  - Kod krompira eEF1A se sastoji od više proteinskih izoformi, a povećanju zastupljenosti eEF1A najviše doprinose od 2-3 polipeptida/izoforme iz bazne grupe.
  - Genomska analiza tetraploidnih komercijalnih sorti krompira je pokazala postojanje eEF1A genske familije koja se sastoji od 6 ili više genskih kopija. Ekspresija pojedinih genskih kopija je inducibilna ili regulisana visokom temperaturom. Kvantitativnim PCR-om je ustanovljeno da dolazi do povećanja ekspresije gena kome odgovara transkript *eEF1A-1*, a da je gen čiji je transkript *eEF1A-12* izuzetno inducibilan u minikrtolama, u uslovima toplotnog stresa kod sorte Festival, dok je na osnovu analize ostalih transkripta kod ove sorte ustanovljeno blago smanjenje zastupljenosti transkripta (*eEF1A-5* i *eEF1A-11*) ili nije došlo do značajne promene u zastupljenosti. Međutim, povećanje zastupljenosti transkripta *eEF1A-12* od 2342,9 puta u uslovima toplotnog stresa, najviše doprinosi povećanju zastupljenosti eEF1A proteina u minikrtolama. Kod sorte Désirée, na osnovu analize eEF1A transkripata se može zaključiti da visoka temperatura negativno reguliše ekspresiju gena koji kodiraju protein eEF1A, što ima za posledicu i manju zastupljenost ovog proteina u uslovima visoke temperature u minikrtolama.
  - Gen koji kodira transkript *eEF1A-12* je izuzetno inducibilan u uslovima toplotnog stresa kod sorte Festival i verovatno ima glavni uticaj na akumulaciju eEF1A proteina u krtolama, što otvara mogućnost za njegovo korišćenje u kreiranju novih, termotolerantnih sorti krompira putem klasičnih metoda selekcije ili metoda genetičkog inženjeringa.

---

## 7. Literatura

- Abel, K., Yoder, M. D., Hilgenfeld, R., & Jurnak, F. (1996). An  $\alpha$  to  $\beta$  conformational switch in EF-Tu. *Structure*, 4(10), 1153-1159.
- Ahloowalia, B. S. (1994). Production and performance of potato mini-tubers. *Euphytica*, 75(3), 163-172.
- Ahn, Y. J., & Zimmerman, J. L. (2006). Introduction of the carrot HSP17. 7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization *in vitro*. *Plant, Cell & Environment*, 29(1), 95-104.
- Aien, A., Bahuguna, R. N., Khetarpal, S., & Pal Singh, M. (2011). Higher glycinebetaine and antioxidant enzymes activity are associated with high temperature tolerance in potato. *Indian Journal of Plant Physiology*, 16(3), 285-293.
- Al-Khatib, K., & Paulsen, G. M. (1990). Photosynthesis and productivity during high-temperature stress of wheat genotypes from major world regions. *Crop Science*, 30(5), 1127-1132.
- Almekinders, C. J. M., & Struik, P. C. (1996). Shoot development and flowering in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 39(4), 581-607.
- Ambrosone, A., Di Giacomo, M., Leone, A., Grillo, M. S., & Costa, A. (2013). Identification of early induced genes upon water deficit in potato cell cultures by cDNA-AFLP. *Journal of Plant Research*, 126(1), 169-178.
- Andersen, G. R., Nissen, P., & Nyborg, J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(8), 434-441.
- Andersen, G. R., Pedersen, L., Valente, L., Chatterjee, I., Kinzy, T. G., Kjeldgaard, M., & Nyborg, J. (2000). Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex eEF1A: eEF1B $\alpha$ . *Molecular Cell*, 6(5), 1261-1266.
- Ashraf, M., Saeed, M. M., & Qureshi, M. J. (1994). Tolerance to high temperature in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) at initial growth stages. *Environmental and Experimental Botany*, 34(3), 275-283.
- Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C., & Lescure, B. (1989). The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 $\alpha$ : molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics*, 219(1-2), 106-112.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Montero, M., Etxeberria, E., Sesma, M. T., Ovecka, M., ... & Pozueta-Romero, J. (2009). Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant and Cell Physiology*, 50(9), 1651-1662.

- 
- Basha, E., Jones, C., Wysocki, V., & Vierling, E. (2010). Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11489-11497.
- Basu, P. S., & Minhas, J. S. (1991). Heat tolerance and assimilate transport in different potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 42(7), 861-866.
- Bektaş, M., Nurten, R., Gürel, Z., Sayers, Z., & Bermek, E. (1994). Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Letters*, 356(1), 89-93.
- Berberich, T., Sugawara, K., Harada, M., & Kusano, T. (1995). Molecular cloning, characterization and expression of an elongation factor 1 $\alpha$  gene in maize. *Plant Molecular Biology*, 29(3), 611-615.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O., Schirmer, N. K., Sprinzl, M., & Hilgenfeld, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature*, 365(6442), 126-132.
- Berisio, R., Ruggiero, A., & Vitagliano, L. (2010). Elongation Factors EF1A and EF-Tu: Their Role in Translation and Beyond. *Israel Journal of Chemistry*, 50(1), 71-79.
- Berry, J., & Bjorkman, O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 491-543.
- Bhattacharjee, S., & Mukherjee, A. K. (1998). The deleterious effects of high temperature during early germination on membrane integrity and subsequent germination of *Amaranthus lividus*. *Seed Science and Technology*, 26(1), 1-8.
- Blum, A., Klueva, N., & Nguyen, H. T. (2001). Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica*, 117(2), 117-123.
- Bodlaender, K. B. A., Lugt, C., & Marinus, J. (1964). The induction of second-growth in potato tubers. *European Potato Journal*, 7(1), 57-71.
- Booth, A., & Lovell, P. H. (1972). The effect of pre-treatment with gibberellic acid on the distribution of photosynthate in intact and disbudded plants of *Solanum tuberosum*. *New Phytologist*, 71(5), 795-804.
- Bösl, B., Grimminger, V., & Walter, S. (2006). The molecular chaperone Hsp104 - a molecular machine for protein disaggregation. *Journal of Structural Biology*, 156(1), 139-148.
- Boston R.S., Viitanen P.V., & Vierling E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. In W. Filipowicz & T. Hohn (Eds.) *Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants* (pp. 191-222). Dordrecht: Springer.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bradshaw, J. E., & Ramsay, G. (2009). Potato origin and production. In *Advances in potato chemistry and technology*. In J. Singh & L. Kaur (Eds.) *Advances in Potato Chemistry and Technology* (pp. 1-26). Elsevier.
-



- 
- Bročić, Z., & Stefanović R. (2012). Krompir, proizvodnja, ekonomika i tržište, monografija, 408 p. Beograd: Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Brown, C. R. (2005). Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research*, 82(2), 163-172.
- Brown, C. R. (2008). Breeding for phytonutrient enhancement of potato. *American Journal of Potato Research*, 85(4), 298-307.
- Brown, C. R., Culley, D., Bonierbale, M., & Amorós, W. (2007). Anthocyanin, carotenoid content, and antioxidant values in native South American potato cultivars. *HortScience*, 42(7), 1733-1736.
- Browning, K. S. (1996). The plant translational apparatus. In: W. Filipowicz & T. Hohn (Eds) *Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants* (pp. 107-144). Dordrecht: Springer.
- Bukhov, N. G., Wiese, C., Neimanis, S., & Heber, U. (1999). Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynthesis Research*, 59(1), 81-93.
- Bukovnik, U., Fu, J., Bennett, M., Prasad, P. V., & Ristic, Z. (2009). Heat tolerance and expression of protein synthesis elongation factors, EF-Tu and EF-1 $\alpha$ , in spring wheat. *Functional Plant Biology*, 36(3), 234-241.
- Burton, W. G. (1989). Post-harvest physiology. In *The potato* (pp. 423-522). Harlow: Longman Scientific and Technical.
- Camejo, D., Rodríguez, P., Morales, M. A., Dell'Amico, J. M., Torrecillas, A., & Alarcón, J. J. (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology*, 162(3), 281-289.
- Campbell, J. L., Klueva, N. Y., Zheng, H. G., Nieto-Sotelo, J., Ho, T. H., & Nguyen, H. T. (2001). Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochimica et Biophysica Acta -Gene Structure and Expression*, 1517(2), 270-277.
- Carneiro, N. P., Hughes, P. A., & Larkins, B. A. (1999). The eEF1A gene family is differentially expressed in maize endosperm. *Plant Molecular Biology*, 41(6), 801-814.
- Carotenuto, R., De Marco, N., Biffo, S., Wilding, M., Vaccaro, M. C., Marchisio, P. C., ... & Campanella, C. (2005). Phosphorylation of p27BBP/eIF6 and its association with the cytoskeleton are developmentally regulated in *Xenopus oogenesis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(14), 1641-1652.
- Carr, T., Wang, Y., Huang, Z., Yeakley, J. M., Fan, J. B., & Whitham, S. A. (2006). Tobamovirus infection is independent of HSP101 mRNA induction and protein expression. *Virus Research*, 121(1), 33-41.
-

- 
- Chang, Y. W. E., & Traugh, J. A. (1998). Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity. *European Journal of Biochemistry*, 251(1-2), 201-207.
- Chen, H. H., Shen, Z. Y., & Li, P. H. (1982). Adaptability of Crop Plants to High Temperatures Stress. *Crop Science*, 22(4), 719-725.
- Chen, J., Burke, J. J., Xin, Z., Xu, C., & Velten, J. (2006). Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant Cell and Environment*, 29(7), 1437-1448.
- Chen, Q., Lauzon, L. M., DeRocher, A. E., & Vierling, E. (1990). Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. *The Journal of Cell Biology*, 110(6), 1873-1883.
- Child, A. (1990). A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) (D'Arcy) (*Tuberarium* (Dun.) Bitter (s. 1.)). *Feddes Repertorium*, 101(5-6), 209-235.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Chuang, S. M., Chen, L. I., Lambertson, D., Anand, M., Kinzy, T. G., & Madura, K. (2005). Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 403-413.
- Chung, E. S., Cho, C. W., So, H. A., Yun, B. H., & Lee, J. H. (2009). Differential expression of soybean SLTI100 gene encoding translation elongation factor 1A by abiotic stresses. *Journal of Plant Biotechnology*, 36(3), 255-260.
- Cooper, P., & Ho, T. H. D. (1983). Heat shock proteins in maize. *Plant Physiology*, 71(2), 215-222.
- Cordewener, J. H., Hause, G., G6rger, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H. J., ... & Pechan, P. (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta*, 196(4), 747-755.
- Costa, A., Di Giacomo, M., Massarelli, I., De Palma, M., Leone, A., & Grillo, M. S. (2010). Isolation, characterization and expression of an elongation factor 1 $\alpha$  gene in potato (*Solanum tuberosum*) cell cultures. *Plant Biosystems*, 144(3), 618-625.
- Crofts, A. J., & Denecke, J. (1998). Calreticulin and calnexin in plants. *Trends in Plant Science*, 3(10), 396-399.
- Cui, S., Hu, J., Yang, B., Shi, L., Huang, F., Tsai, S. N., ... & Zhang, J. (2009). Proteomic characterization of *Phragmites communis* in ecotypes of swamp and desert dune. *Proteomics*, 9(16), 3950-3967.
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y., & Liu, J. (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5(12), 3162-3172.
-

- 
- Cutter, E. G. (1978). Structure and development of the potato plant. In P. M. Harris (Ed.) *The potato crop* (pp. 70-152). Boston: Springer.
- Čiamporová, M., & Mistrík, I. (1993). The ultrastructural response of root cells to stressful conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 33(1), 11-26.
- De Las Rivas, J., & Barber, J. (1997). Structure and thermal stability of photosystem II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 36(29), 8897-8903.
- De Ronde, J. A., Cress, W. A., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., & Van Staden, J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1211-1224.
- DeRocher, A. E., Helm, K. W., Lauzon, L. M., & Vierling, E. (1991). Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiology*, 96(4), 1038-1047.
- Destefano-Beltrán, L., Knauber, D., Huckle, L., & Suttle, J. C. (2006). Effects of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues. *Plant Molecular Biology*, 61(4), 687-697.
- Dever, T. E., Costello, C. E., Owens, C. L., Rosenberry, T. L., & Merrick, W. C. (1989). Location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine, and glycerylphosphorylethanolamine. *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20518-20525.
- Doyle, S. M., & Wickner, S. (2009). Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(1), 40-48.
- Doyle, S. M., Genest, O., & Wickner, S. (2013). Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 14(10), 617-629.
- Dragičević, I., Konjević, R., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., & Nešković, M. (2008). The effects of IAA and tetcyclacis on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot cultures *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 54(3), 189-193.
- Dunn, M. A., Morris, A., Jack, P. L., & Hughes, M. A. (1993). A low-temperature-responsive translation elongation factor 1 $\alpha$  from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology*, 23(1), 221-225.
- Durso, N. A., & Cyr, R. J. (1994). A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *The Plant Cell*, 6(6), 893-905.
- Dutt, S., Parkash, J., Mehra, R., Sharma, N., Singh, B., Raigond, P., ... & Singh, B. P. (2015). Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. *Biologia Plantarum*, 59(3), 401-412.
-

- Edmonds, B. T., Bell, A., Wyckoff, J., Condeelis, J., & Leyh, T. S. (1998). The effect of F-actin on the binding and hydrolysis of guanine nucleotide by *Dictyostelium* elongation factor 1A. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10288-10295.
- Edmonds, B. T., Wyckoff, J., Yeung, Y. G., Wang, Y., Stanley, E. R., Jones, J., Seagal, J. & Condeelis, J. (1996). Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *Journal of Cell Science*, 109(11), 2705-2714.
- Ejiri, S. I. (1986). Purification and characterization of polypeptide chain elongation factor 1 from plants. In A. Weissbach & H. Weissbach (Eds.) *Methods in Enzymology* (Vol. 118, pp. 140-153). Orlando: Academic Press.
- Ejiri, S. I. (2002). Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(1), 1-21.
- Eurostat (2018). European statistics. <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do> Accessed 06 July 2018
- Evans, L. T. (1975). Beyond photosynthesis - the role of respiration, translocation and growth potential in determining productivity. In J. P. Cooper (Ed.) *Photosynthesis and Productivity in Different Environments* (pp. 501-507). London: Cambridge University Press
- Ewing, E. E. (1981). Heat stress and the tuberization stimulus. *American Journal of Potato Research*, 58, 31-49.
- Ewing, E. E. (1995). The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. In P. J. Davies (Ed.) *Plant Hormones* (pp. 698-724). Dordrecht: Springer.
- Ewing, E. E., & Struik, P. C. (1992). Tuber formation in potato: Induction, initiation, and growth. *Horticultural Review*, 14, 89-198.
- FAO (2009). Newlight on a hiddentreasure - International Year of the Potato 2008 - An end-of-year review. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep/011/i0500e/i0500e00.htm> Accessed 02 Sept 2018
- FAO (2015). Statistical pocketbook: World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/3/a-i4691 e.pdf>. Accessed 07 Sept 2017
- Farrar, J. F. (1988). Temperature and the partitioning and translocation of carbon. In S.P. Long & F.I. Woodward (Eds.) *Plants and Temperature* (Vol. 42, pp 203-235). Symposium of the Society of Experimental Biology. Cambridge: Company of Biologists.
- Farrar, J. F., & Williams, M. L. (1991). The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, Cell & Environment*, 14(8), 819-830.

- 
- Folgado, R., Panis, B., Sergeant, K., Renaut, J., Swennen, R., & Hausman, J. F. (2013). Differential protein expression in response to abiotic stress in two potato species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4912-4933.
- Friedman, M., Lee, K. R., Kim, H. J., Lee, I. S., & Kozukue, N. (2005). Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 6162-6169.
- Fu, J., Momcilovic, I., & Prasad, P. V. V. (2012a). Molecular bases and improvement of heat tolerance in crop plants. In S. Josipovic & E. Ludwig (Eds.) *Heat stress: Causes, Prevention and Treatments* (pp. 185-213). New York: Nova Science Publishers.
- Fu, J., Momčilović, I., & Prasad, P. V. (2012b). Roles of protein synthesis elongation factor EF-Tu in heat tolerance in plants. *Journal of Botany*, Volume 2012, Article ID 835836, 8 pages.Momc
- Furukawa, R., Jinks, T. M., Tishgarten, T., Mazzawi, M., Morris, D. R., & Fechheimer, M. (2001). Elongation factor 1 $\beta$  is an actin-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1527(3), 130-140.
- Gammulla, C. G., Pascovici, D., Atwell, B. J., & Haynes, P. A. (2011). Differential proteomic response of rice (*Oryza sativa*) leaves exposed to high-and low-temperature stress. *Proteomics*, 11(14), 2839-2850.
- Gangadhar, B. H., Yu, J. W., Sajeesh, K., & Park, S. W. (2014). A systematic exploration of high-temperature stress-responsive genes in potato using large-scale yeast functional screening. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(2), 185-201.
- Garner, N., & Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany*, 63(6), 663-674.
- Ge, C., Wan, D., Wang, Z., Ding, Y., Wang, Y., Shang, Q., Ma, F. & Luo, S. (2007). Response of rice roots to 1, 2, 4-trichlorobenzene stress. *Acta Agronomica Sinica*, 33(12), 1991-2000.
- Gifford, R. M., & Evans, L. T. (1981). Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 485-509.
- Ginzberg, I., Oren-Shamir, M., Hirschberg, J., Mandolino, G., Parisi, B., Faigenboim, A., Fogelman, E., & Ovadia, R. (2017). The effect of hot climate on anthocyanins, carotenoids and glycoalkaloids biosynthesis. *Proceedings of the 20th Triennial EAPR Conference, Versailles, France, 9th-14th July. The European Association for Potato Research.*
- Gonen, H., Smith, C. E., Siegel, N. R., Kahana, C., Merrick, W. C., Chakraborty, K., ... & Ciechanover, A. (1994). Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7648-7652.
-

- 
- Gong, M., van der Luit, A. H., Knight, M. R., & Trewavas, A. J. (1998). Heat-shock-induced changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology*, 116(1), 429-437.
- Gopal, J., & Minocha, J. L. (1998). Effectiveness of *in vitro* selection for agronomic characters in potato. *Euphytica*, 103(1), 67-74.
- Gross, S. R., & Kinzy, T. G. (2005). Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(9), 772-778.
- Gross, S. R., & Kinzy, T. G. (2007). Improper organization of the actin cytoskeleton affects protein synthesis at initiation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5), 1974-1989.
- Grosshans, H., Hurt, E., & Simos, G. (2000a). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes & Development*, 14(7), 830-840.
- Grosshans, H., Simos, G., & Hurt, E. (2000b). Transport of tRNA out of the Nucleus—Direct Channeling to the Ribosome?. *Journal of Structural Biology*, 129(2-3), 288-294.
- Hamilton, E. W., & Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, 126(3), 1266-1274.
- Hannapel, D. J., Chen, H., Rosin, F. M., Banerjee, A. K., & Davies, P. J. (2004). Molecular controls of tuberization. *American Journal of Potato Research*, 81(4), 263-274.
- Hanneman Jr, R. E. (1994). The testing and release of transgenic potatoes in the North American center of diversity. In A. F. Krattiger & A. Rosemarin (Eds.) *Biosafety for Sustainable Agriculture: Sharing Biotechnology Regulatory Experiences of the Western Hemisphere* (pp. 47-67). Ithaca and Stockholm: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), Stockholm Environment Institute (SEI).
- Hanneman Jr, R. E. (1995). Ecology and reproductive biology of potato: the potential for and the environmental implications of gene spread. In R. J. Fredrick, I. Virgin & E. Lindarte (Eds.) *Environmental Concerns with Transgenic Plants in Centers of Diversity: Potato as a Model* (pp. 19-38). Proceedings from a regional workshop, Parque National Iguazu, Argentina. Stockholm, Sweden: Biotechnology Advisory Commission and San Jose, Costa Rica: Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture.
- Harmey, M. A., Crowley, M. P., & Clinch, P. E. M. (1966). The effect of growth regulators on tuberisation of cultured stem pieces of *Solanum tuberosum*. *European Potato Journal*, 9(3), 146-151.
- Havaux, I. (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant, Cell & Environment*, 16(4), 461-467.
-

- 
- Havaux, M. (1995). Temperature sensitivity of the photochemical function of photosynthesis in potato (*Solanum tuberosum*) and a cultivated Andean hybrid (*Solanum x juzepczukii*). *Journal of Plant Physiology*, 146(1-2), 47-53.
- Haverkort, A. J., & Struik, P. C. (2015). Yield levels of potato crops: recent achievements and future prospects. *Field Crops Research*, 182, 76-85.
- Hawkes, J.G. (1992). History of the potato. In P. M. Harris (Ed.) *The Potato Crop* (pp. 1–12). World Crop Series. Dordrecht: Springer.
- Hawkes, J.G., (1990). *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*, 259 pp. London: Belhaven Press.
- Helenius, A., Trombetta, E. S., Hebert, D. N., & Simons, J. F. (1997). Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in Cell Biology*, 7(5), 193-200.
- Heuvelink, J. H., Pieper, F. R., Ramaekers, F. C., Timmermans, L. J., Kuijpers, H., Bloemendal, H., & van Venrooij, W. J. (1989). Association of mRNA and eIF-2 $\alpha$  with the cytoskeleton in cells lacking vimentin. *Experimental Cell Research*, 181(2), 317-330.
- Hijmans, R. J. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research*, 80(4), 271-279.
- Hiller, L. K., Koller, D. C., & Thornton, R. E. (1985). Physiological disorders of potato tubers. In L. H. Paul (Ed.) *Potato Physiology* (pp. 389-455). Academic Press, Inc.
- Ho, L. C. (1979a). Partitioning of  $^{14}\text{C}$ -assimilate within individual tomato leaves in relation to the rate of export. In R. Marcelle, H. Clijsters, & M. van Poucke (Eds.) *Photosynthesis and Plant Development* (pp. 243-250). The Hague: D W Junk.
- Ho, L. C. (1979b). Regulation of assimilate translocation between leaves and fruits in the tomato. *Annals of Botany*, 43, 437-448.
- Hong, S. W. & Vierling, E. (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4392-4397.
- Hotokezaka, Y., Többen, U., Hotokezaka, H., Van Leyen, K., Beatrix, B., Smith, D. H., ... & Wiedmann, M. (2002). Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18545-18551.
- Howard, H. W. (1970). *Genetics of the Potato, Solanum tuberosum*, 126 pp. New York: Springer –Verlag.
- Howe, J. G., & Hershey, J. W. (1984). Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells. *Cell*, 37(1), 85-93.
- Huber, S. C., & Israel, D. W. (1982). Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* Merr.) leaves. *Plant Physiology*, 69(3), 691-696.
-

- 
- Infante, C., Asensio, E., Cañavate, J. P., & Manchado, M. (2008). Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 19.
- Ismail, A. M., & Hall, A. E. (1999). Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. *Crop Science*, 39(6), 1762-1768.
- Izawa, T., Fukata, Y., Kimura, T., Iwamatsu, A., Dohi, K., & Kaibuchi, K. (2000). Elongation factor-1 $\alpha$  is a novel substrate of rho-associated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(1), 72-78.
- Jackson, S. D. (1999). Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology*, 119(1), 1-8.
- Jenkins, P. D., & Mahmood, S. (2003). Dry matter production and partitioning in potato plants subjected to combined deficiencies of nitrogen, phosphorus and potassium. *Ingenta Connect*, 143(2), 215–229.
- Jespersen, D., Belanger, F. C., & Huang, B. (2017). Candidate genes and molecular markers associated with heat tolerance in colonial Bentgrass. *PloS One*, 12(2), e0171183.
- Kamiie, K., Taira, H., Kobayashi, K., Yamashita, T., Kidou, S., and Ejiri, S. I. (1999). Expression of elongation factor 1 $\beta'$  in *Escherichia coli* and its interaction with elongation factor 1 $\alpha$  from silk gland. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(4), 666-671.
- Kanabus, J., Pikaard, C. S., & Cherry, J. H. (1984). Heat shock proteins in tobacco cell suspension during growth cycle. *Plant Physiology*, 75(3), 639-644.
- Karim, M. A., Fracheboud, Y., & Stamp, P. (1997). Heat tolerance of maize with reference of some physiological characteristics. *Annals of Bangladesh Agriculture* 7(2), 22-36.
- Karim, M. A., Fracheboud, Y., & Stamp, P. (1999). Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves. *Physiologia Plantarum*, 105(4), 685-693.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S., & Leberman, R. (1996). The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu· EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature*, 379(6565), 511-518.
- Kee, S. C., & Nobel, P. S. (1986). Concomitant changes in high temperature tolerance and heat-shock proteins in desert succulents. *Plant Physiology*, 80(2), 596-598.
- Khan, M. A., Munive, S., & Bonierbale, M. (2015). Early generation *in vitro* assay to identify potato populations and clones tolerant to heat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(1), 45-52.
-



- 
- Kidou, S. I., & Ejiri, S. I. (1998). Isolation, characterization and mRNA expression of four cDNAs encoding translation elongation factor 1A from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 36(1), 137-148.
- Kim, H. J., Hwang, N. R., & Lee, K. J. (2007b). Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation. *Molecules & Cells*, 23(2), 123-131.
- Kim, S., & Coulombe, P. A. (2010). Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*, 11(1), 75-81.
- Kim, S., Kellner, J., Lee, C. H., & Coulombe, P. A. (2007a). Interaction between the keratin cytoskeleton and eEF1B $\gamma$  affects protein synthesis in epithelial cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(10), 982-983.
- Knight, H. (1999). Calcium signaling during abiotic stress in plants. In *International Review of Cytology* (Vol. 195, pp. 269-324). Academic Press.
- Koonin, E. V., Tatusov, R. L., Altschul, S. F., Bryant, S. H., Mushegian, A. R., Bork, P., & Valencia, A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1 $\gamma$  contains a glutathione transferase domain - Study of a diverse, ancient protein super family using motif search and structural modeling. *Protein Science*, 3(11), 2045-2055.
- Kosová, K., Vítámvás, P., & Prášil, I. T. (2014). Proteomics of stress responses in wheat and barley - search for potential protein markers of stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 5, 711.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310-316.
- Kozłowski, L. P. (2016). IPC–isoelectric point calculator. *Biology direct*, 11(1), 55.
- Kraal, B., Lippmann, C., & Kleanthous, C. (1999). Translational regulation by modifications of the elongation factor Tu. *Folia Microbiologica*, 44(2), 131-141.
- Krauss, A. (1978). Tuberization and abscisic acid content in *Solanum tuberosum* as affected by nitrogen nutrition. *Potato Research*, 21(2), 183-193.
- Krauss, A., & Marschner, H. (1982). Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Research*, 25(1), 13-21.
- Krauss, A., & Marschner, H. (1984). Growth rate and carbohydrate metabolism of potato tubers exposed to high temperatures. *Potato Research*, 27(3), 297-303.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496-3507.
- Lachman, J., & Hamouz, K. (2005). Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition-a review. *Plant Soil and Environment*, 51(11), 477-482.
-

- 
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Lafta, A. M., & Lorenzen, J. H. (1995). Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiology*, 109(2), 637-643.
- Laisk, A., Eichelmann, H., Oja, V., Talts, E., & Scheibe, R. (2007). Rates and roles of cyclic and alternative electron flow in potato leaves. *Plant and Cell Physiology*, 48(11), 1575-1588.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B., & Ward, J. M. (1999). The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *The Plant Cell*, 11(4), 707-726.
- Lang, A., & Düring, H. (1991). Partitioning control by water potential gradient: evidence for compartmentation breakdown in grape berries. *Journal of Experimental Botany*, 42(9), 1117-1122.
- Lang, A., & Thorpe, M. R. (1986). Water potential, translocation and assimilate partitioning. *Journal of Experimental Botany*, 37, 495-503.
- Larkindale, J., & Huang, B. (2004). Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*, 51(1), 57-67.
- Laursen, R. A., L'Italien, J. J., Nagarkatti, S., & Miller, D. L. (1981). The amino acid sequence of elongation factor Tu of *Escherichia coli*. The complete sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 256(15), 8102-8109.
- Law, R. D., & Crafts-Brandner, S. J. (1999). Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology*, 120(1), 173-182.
- Lawrence, C. H., & Barker, W. G. (1963). A study of tuberization in the potato, *Solanum tuberosum*. *American Potato Journal*, 40(10), 349-356.
- Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D., Lee, I. J., & Lee, B. H. (2007). A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 7(18), 3369-3383.
- Lee, G. J., & Vierling, E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*, 122(1), 189-198.
- Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*, 497 pp. New York: Academic Press.
- Levy, D., & Veilleux, R. E. (2007). Adaptation of potato to high temperatures and salinity-a review. *American Journal of Potato Research*, 84(6), 487-506.
- Levy, D., Seabrook, J. E., & Coleman, S. (1993). Enhancement of tuberization of axillary shoot buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 44(2), 381-386.
-

- 
- Li, D., Wei, T., Abbott, C. M., & Harrich, D. (2013). The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 253-266.
- Li, Z., & Chen, S. (1999). Inducible expression of translation elongation factor 1A gene in rice seedlings in response to environmental stresses. *Acta Botanica Sinica*, 41(8), 800-806.
- Lindquist, S. L., & Kelly, J. W. (2011). Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases—progress and prognosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a004507.
- Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(1), 100-127.
- Liu, G., Tang, J., Edmonds, B. T., Murray, J., Levin, S., & Condeelis, J. (1996). F-actin sequesters elongation factor 1alpha from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction. *The Journal of Cell Biology*, 135(4), 953-963.
- Liu, J. H., Li, Y. C., Zhang, J., Gao, P. Z., Wang, A. B., Zhang, N., ... & Jin, Z. Q. (2016). Banana *MaEF1A* facilitates plant growth and development. *Biologia Plantarum*, 60(3), 435-442.
- Liu, X., Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science*, 40(2), 503-510.
- Lopez-Valenzuela, J. A., Gibbon, B. C., Hughes, P. A., Dreher, T. W., & Larkins, B. A. (2003). eEF1A isoforms change in abundance and actin-binding activity during maize endosperm development. *Plant Physiology*, 133(3), 1285-1295.
- Löw, D., Brändle, K., Nover, L., & Forreiter, C. (2000). Cytosolic heat-stress proteins Hsp17. 7 class I and Hsp17. 3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo*. *Planta*, 211(4), 575-582.
- Lugt, C., Bodlaender, K. B. A., & Goodijk, G. (1964). Observations on the induction of second-growth in potato tubers. *European Potato Journal*, 7(4), 219-227.
- Lukash, T. O. (2006). Eukaryotic elongation factor 1a disintegrates aggregates of phenylalanyl-trna synthetase. *Biopolymers and Cell*, 22(1), 29-32.
- Malik, M. K., Slovin, J. P., Hwang, C. H., & Zimmerman, J. L. (1999). Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, Hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal*, 20(1), 89-99.
- Mansfield, M. A., & Key, J. L. (1988). Cytoplasmic distribution of heat shock proteins in soybean. *Plant Physiology*, 86(4), 1240-1246.
- Mares, D. J., Marschner, H., & Kranss, A. (1981). Effect of gibberellic acid on growth and carbohydrate metabolism of developing tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 52, 267-274.
- Martineau, J. R., Specht, J. E., Williams, J. H., & Sullivan, C. Y. (1979). Temperature Tolerance in Soybeans. I. Evaluation of a Technique for Assessing Cellular Membrane Thermostability. *Crop Science*, 19(1), 75-78.
-

- Mayer, M. P. (2010). Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular Cell*, 39(3), 321-331.
- McDonald, G. K., & Paulsen, G. M. (1997). High temperature effects on photosynthesis and water relations of grain legumes. *Plant and Soil*, 196(1), 47-58.
- McLoughlin, F., Basha, E., Fowler, M. E., Kim, M., Bordowitz, J., Katiyar-Agarwal, S., & Vierling, E. (2016). Class I and II small heat-shock proteins protect protein translation factors during heat stress. *Plant Physiology*, pp-00536.
- Menzel, C. M. (1983). Tuberization in potato at high temperatures: gibberellin content and transport from buds. *Annals of Botany*, 52(5), 697-702.
- Merrick, W. C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews*, 56(2), 291-315.
- Miernyk, J. A. (1999). Protein folding in the plant cell. *Plant Physiology*, 121(3), 695-703.
- Mirande, M., Le Corre, D., Louvard, D., Reggio, H., Pailliez, J. P., & Waller, J. P. (1985). Association of an aminoacyl-tRNA synthetase complex and of phenylalanyl-tRNA synthetase with the cytoskeletal framework fraction from mammalian cells. *Experimental cell research*, 156(1), 91-102.
- Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K. L., Schönfeld, H. J., Vierling, E., & Bukau, B. (2003). Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 31033–31042.
- Mohabir, G., & John, P. (1988). Effect of temperature on starch synthesis in potato tuber tissue and in amyloplasts. *Plant Physiology*, 88(4), 1222-1228.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459-481.
- Momčilović, I., & Ristic, Z. (2007). Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development. *Journal of plant physiology*, 164(1), 90-99.
- Momčilović, I., & Fu, J. (2014). Protein synthesis elongation factors EF-Tu and eEF1A: biosynthesis, functions and application in the improvement of heat tolerance in plants. In C. Bethaz & V. L. Puma (Eds.) *New Research on Protein Synthesis* (pp. 1–49). New York: Nova Science Publishers.
- Momčilović, I., Pantelić, D., Zdravković-Korać, S., Oljača, J., Rudić, J., & Fu, J. (2016). Heat-induced accumulation of protein synthesis elongation factor 1A implies an important role in heat tolerance in potato. *Planta*, 244(3), 671-679.
- Morelli, J. K., Zhou, W., Yu, J., Lu, C., & Vayda, M. E. (1998). Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 116(4), 1227-1237.

- 
- Munshi, R., Kandl, K. A., Carr-Schmid, A., Whitacre, J. L., Adams, A. E., & Kinzy, T. G. (2001). Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. *Genetics*, 157(4), 1425-1436.
- Muramatsu, K., Masumizu, T., Maitani, Y., Hwang, S. H., Kohno, M., Takayama, K., & Nagai, T. (2000). Electron spin resonance studies of dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing soybean-derived sterylglucoside. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(5), 610-613.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326.
- Narayanan, S., Prasad, P. V. V., Fritz, A. K., Boyle, D. L., & Gill, B. S. (2015). Impact of high night-time and high daytime temperature stress on winter wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(3), 206-218.
- Narayanan, S., Tamura, P. J., Roth, M. R., Prasad, P. V., & Welti, R. (2016). Wheat leaf lipids during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. *Plant, Cell & Environment*, 39(4), 787-803.
- Nešković, M., Konjević, R. & Čulafić, L. (2003): *Fiziologija biljaka*. Beograd: NNK International.
- Nieto-Sotelo, J., Martínez, L. M., Ponce, G., Cassab, G. I., Alagón, A., Meeley, R. B., ... & Yang, R. (2002). Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell*, 14, 1621-33.
- Norbeck, J., & Blomberg, A. (1997). Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast*, 13(16), 1519-1534.
- Nowak, J., & Colborne, D. (1989). *In vitro* tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. *American Potato Journal*, 66(1), 35-45.
- Owen, C. H., Derosier, D. J., & Condeelis, J. (1992). Actin crosslinking protein EF-1 a of *Dictyostelium discoideum* has a unique bonding rule that allows square-packed bundles. *Journal of Structural Biology*, 109(3), 248-254.
- Pantelić, D., Dragičević, I. Č., Rudić, J., Fu, J., & Momčilović, I. (2018). Effects of high temperature on *in vitro* tuberization and accumulation of stress-responsive proteins in potato. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59(3), 315-324.
- Pareek, A., Singla, S. L., & Grover, A. (1997). Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Annals of Botany*, 80(5), 629-639.
-

- 
- Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 437-496.
- Patrick, J. W. (1988). Assimilate partitioning in relation to crop productivity. *HortScience (USA)*, 23, 33-40.
- Peters, H. I., Chang, Y. W. E., & Traugh, J. A. (1995). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity. *The FEBS Journal*, 234(2), 550-556.
- Pincheira, R., Chen, Q., Huang, Z., & Zhang, J. T. (2001). Two subcellular localizations of eIF3 p170 and its interaction with membrane-bound microfilaments: implications for alternative functions of p170. *European Journal of Cell Biology*, 80(6), 410-418.
- Pittman, Y. R., Kandl, K., Lewis, M., Valente, L., & Kinzy, T. G. (2009). Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4739-4747.
- Pokalsky, A. R., Hiatt, W. R., Ridge, N., Rasmussen, R., Houck, C. M., & Shewmaker, C. K. (1989). Structure and expression of elongation factor 1 $\alpha$  in tomato. *Nucleic Acids Research*, 17(12), 4661-4673.
- Portis Jr, A. R. (1995). The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1285-1291.
- Prange, R. K., McRae, K. B., Midmore, D. J., & Deng, R. (1990). Reduction in potato growth at high temperature: role of photosynthesis and dark respiration. *American Potato Journal*, 67(6), 357-369.
- Priya, S., Sharma, S. K., & Goloubinoff, P. (2013). Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Letters*, 587(13), 1981-1987.
- Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E., & Lindquist, S. (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(4), 479-492.
- Ransom, W. D., Lao, P. C., Gage, D. A., & Boss, W. F. (1998). Phosphoglycerylethanolamine posttranslational modification of plant eukaryotic elongation factor 1 $\alpha$ . *Plant Physiology*, 117(3), 949-960.
- Reynolds, M. P., Ewing, E. E. & Owens, T. G. (1990). Photosynthesis at high temperature in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology* 93, 791– 797.
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., & Prat, S. (2006). Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 151-180.
- Rowe, R. C. (1993). Potato Health Management: A Holistic Approach. In R. C. Rowe & D. Curwen (Eds.) *Potato Health Management* (pp 3-10). St. Paul: The American Phytopathological Society Press.
-

- 
- Salvucci, M. E., & Ogren, W. L. (1996). The mechanism of Rubisco activase: insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research*, 47(1), 1-11.
- Sanchez, Y., & Lindquist, S. L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, 248(4959), 1112-1115.
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A., & Lindquist, S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO Journal*, 11(6), 2357-2364.
- Sasikumar, A. N., Perez, W. B., & Kinzy, T. G. (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(4), 543-555.
- Savić, J., Dragičević, I., Pantelić, D., Oljača, J., & Momčilović, I. (2012). Expression of small heat shock proteins and heat tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 135-144.
- Scharf, K. D., Siddique, M., & Vierling, E. (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing  $\alpha$ -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 225-237.
- Shanahan, J. F., Edwards, I. B., Quick, J. S., & Fenwick, J. R. (1990). Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. *Crop Science*, 30(2), 247-251.
- Shin, D., Moon, S. J., Park, S. R., Kim, B. G., & Byun, M. O. (2009). Elongation factor 1 $\alpha$  from *A. thaliana* functions as molecular chaperone and confers resistance to salt stress in yeast and plants. *Plant Science*, 177(3), 156-160.
- Simmonds, N. W. (1966). Studies of the tetraploid potatoes. III. Progress in the experimental re-creation of the Tuberosum Group. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 59(379), 279-288.
- Singla, S. L., & Grover, A. (1994). Detection and quantitation of a rapidly accumulating and predominant 104 kDa heat shock polypeptide in rice. *Plant Science*, 97(1), 23-30.
- Singla, S. L., Pareek, A., Kush, A. K., & Grover, A. (1998). Distribution patterns of 104 kDa stress-associated protein in rice. *Plant Molecular Biology*, 37(6), 911-919.
- Smith, O. (1977). *Potatoes: Production, storage, processing*. 2nd Edition. Connecticut: The Avi Publishing Co. Inc.
- Spreitzer, R. J., & Salvucci, M. E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 449-475.
- Stapulionis, R., Kolli, S., & Deutscher, M. P. (1997). Efficient mammalian protein synthesis requires an intact F-actin system. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 24980-24986.
- Sterrett, S. B., Henninger, M. R., Yench, G. C., Lu, W., Vinyard, B. T., & Haynes, K. G. (2003). Stability of internal heat necrosis and specific gravity in tetraploid  $\times$  diploid potatoes. *Crop Science*, 43(3), 790-796.
-

- 
- Sterrett, S. B., Henningre, M. R., & Lee, G. S. (1991). Relationship of internal heat necrosis of potato to time and temperature after planting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(4), 697-700.
- Steyn, P. (1999). Handleiding vir aartappelverbouig in Suid Afrika. (Manual for potato production in South Africa). United Litho. ISBN, 1-86849-120-X.
- Struik, P. C. (2007a). Responses of the potato plant to temperature. In *Potato Biology and Biotechnology* (pp. 367-393). Oxford: Elsevier.
- Struik, P. C. (2007b). Above-ground and below-ground plant development. In *Potato Biology and Biotechnology* (pp. 219-236). Oxford: Elsevier.
- Struik, P. C., Geertsema, J., & Custers, C. H. (1989). Effects of shoot, root and stolon temperature on the development of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant. III. Development of tubers. *Potato Research*, 32(2), 151-158.
- Suda, M., Fukui, M., Sogabe, Y., Sato, K., Morimatsu, A., Arai, R., ... & Hirata, D. (1999). Overproduction of elongation factor 1 $\alpha$ , an essential translational component, causes aberrant cell morphology by affecting the control of growth polarity in fission yeast. *Genes to Cells*, 4(9), 517-527.
- Suhandono, S., Apriyanto, A., & Ihsani, N. (2014). Isolation and characterization of three cassava elongation factor 1 alpha (*MeEF1A*) promoters. *PloS One*, 9(1), e84692.
- Sullivan, C. Y. and Ross W. M. (1979). Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. In H. Mussell & R. Staples (Eds.) *Stress Physiology in Crop Plants* (pp. 263-281). New York: John Wiley and Sons.
- Sullivan, C. Y., Jordan, W. R., Blum, A., & Traore, M. (1990). An overview of heat resistance. In *Proceedings of the International Congress of Plant Physiology*, New Delhi, India, 15-20 February 1988. Volume 2. (pp. 916-922). Society for Plant Physiology and Biochemistry.
- Sun, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1577(1), 1-9.
- Sun, W., Wang, H., & Huang, J. (2000). The effect of external betaine on membrane lipid peroxidation of wheat seedling under water stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 21(3), 487-491.
- Taiz L., & Zeiger E. (2006). *Plant Physiology*, Fourth Edition, 700 p. Sunderland: Sinauer Associates.
- Timlin, D., Lutfor Rahman, S. M., Baker, J., Reddy, V. R., Fleisher, D., & Quebedeaux, B. (2006). Whole plant photosynthesis, development, and carbon partitioning in potato as a function of temperature. *Agronomy Journal*, 98(5), 1195-1203.
- Treweek, T. M., Lindner, R. A., Mariani, M., & Carver, J. A. (2000). The small heat-shock chaperone protein,  $\alpha$ -crystallin, does not recognise stable molten globule states of cytosolic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1481(1), 175-188.
-



- 
- van Dam, J., Kooman, P. L., & Struik, P. C. (1996). Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 39(1), 51-62.
- van Montfort, R. L., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C., & Vierling, E. (2001). Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Structural and Molecular Biology*, 8(12), 1025-1030.
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., & Goloubinoff, P. (1998). The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11032-11037.
- Venema, R. C., Peters, H. I., & Traugh, J. A. (1991). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12574-12580.
- Verkleij, F. N., & Challa, H. (1988). Diurnal export and carbon economy in an expanding source leaf of cucumber at contrasting source and sink temperature. *Physiologia Plantarum*, 74(2), 284-293.
- Vettermann, C., Jäck, H. M., & Mielenz, D. (2002). A colloidal silver staining–destaining method for precise assignment of immunoreactive spots in two-dimensional protein patterns. *Analytical Biochemistry*, 308(2), 381-387.
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 579-620.
- Vijaykumar, D., Ramachander, T. V. N., Mahishi, L. H., Kaul, R., Pyati, P., Paul, B., & Rawal, S. K. (2002). Molecular cloning, characterization and tissue specific expression of an elongation factor 1A gene in *Saccharum officinarum* L. *Plant Science*, 162(2), 315-321.
- Vreugdenhil, D., & Struik, P. C. (1989). An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 75(4), 525-531.
- Vreugdenhil, D., Boogaard, Y., Visser, R. G., & de Bruijn, S. M. (1998). Comparison of tuber and shoot formation from *in vitro* cultured potato explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(3), 197-204.
- Wahid, A., & Shabbir, A. (2005). Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*, 46(2), 133-141.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.
- Wang, P. J., & Hu, C. Y. (1982). *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *American Potato Journal*, 59(1), 33-37.
-

- 
- Wang, W., & Poovaiah, B. W. (1999). Interaction of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase with a homolog of eukaryotic elongation factor-1 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 12001-12008.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-252.
- Wang, Y., Jiang, Y., Meyering-Voss, M., Sprinzl, M., & Sigler, P. B. (1997). Crystal structure of the EF-Tu EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 4(8), 650-656.
- Watanabe, K., & Peloquin, S. J. (1991). The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x, and 6x wild, tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(5), 621-626.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
- Waters, E. R. (2012). The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 391-403.
- Waters, E. R., Lee, G. J., & Vierling, E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(3), 325-338.
- Webb, M. S., & Green, B. R. (1991). Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1060(2), 133-158.
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H. E., ... & Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses role of phospholipase D $\alpha$  in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31994-32002.
- Welti, R., Shah, J., Li, W. Q., Li, M. Y., Chen, J. P., Burke, J. J., ... & Wang, X. M. (2007). Plant lipidomics: discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. *Frontiers in Bioscience*, 12, 2494–2506.
- Wiltshire, J. J. J., & Cobb, A. H. (1996). A review of the physiology of potato tuber dormancy. *Annals of Applied Biology*, 129(3), 553-569.
- Wise, R. R., Olson, A. J., Schrader, S. M., & Sharkey, T. D. (2004). Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell & Environment*, 27(6), 717-724.
- Wivutvongvana, M. 1979. Physiological response of heat tolerant and heat sensitive potatoes (*Solanum* species). Ph.D. Thesis, Cornell Univ.
- Wolf, S., Marani, A., & Rudich, J. (1990). Effects of temperature and photoperiod on assimilate partitioning in potato plants. *Annals of Botany*, 66(5), 513-520.
- Wolf, S., Marani, A., & Rudich, J. (1991). Effect of temperature on carbohydrate metabolism in potato plants. *Journal of Experimental Botany*, 42(5), 619-625.
-

- 
- Wolswinkel, P. (1985). Phloem unloading and turgor-sensitive transport: Factors involved in sink control of assimilate partitioning. *Physiologia Plantarum*, 65(3), 331-339.
- Xu, W. L., Wang, X. L., Wang, H., & Li, X. B. (2007). Molecular characterization and expression analysis of nine cotton GhEF1A genes encoding translation elongation factor 1A. *Gene*, 389(1), 27-35.
- Xu, X., van Lammeren, A. A., Vermeer, E., & Vreugdenhil, D. (1998a). The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiology*, 117(2), 575-584.
- Xu, X., Vreugdenhil, D., & Lammeren, A. A. V. (1998b). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany*, 49(320), 573-582.
- Yamagata, A., Kristensen, D. B., Takeda, Y., Miyamoto, Y., Okada, K., Inamatsu, M., & Yoshizato, K. (2002). Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *PROTEOMICS: International Edition*, 2(9), 1267-1276.
- Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S., & Condeelis, J. (1990). Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a. *Nature*, 347, 494-496.
- Yang, Y., Jiang, D. A., Xu, H. X., Yan, C. Q., & Hao, S. R. (2006). Cyclic electron flow around photosystem 1 is required for adaptation to salt stress in wild soybean species *Glycine cyrtoloba* ACC547. *Biologia Plantarum*, 50(4), 586-590.
- Zhang, J. H., Wang, L. J., Pan, Q. H., Wang, Y. Z., Zhan, J. C., & Huang, W. D. (2008). Accumulation and subcellular localization of heat shock proteins in young grape leaves during cross-adaptation to temperature stresses. *Scientia Horticulturae*, 117(3), 231-240.
- Zheng, G., Tian, B. O., Zhang, F., Tao, F., & Li, W. (2011). Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant, Cell & Environment*, 34(9), 1431-1442.
- Ziyin, L., & Shouyi, C. (1999). Inducible expression of translation elongation factor 1A gene in rice seedlings in response to environmental stresses. *Acta Botanica Sinica*, 41(8), 800-806.
- Zobel-Thropp, P., Yang, M. C., Machado, L., & Clarke, S. (2000). A novel post-translational modification of yeast elongation factor 1A – methylesterification at the C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37150-37158.
- Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., & Mueller, M. J. (2012). Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology*, 160, 365–378.
- Zolkiewski, M., Zhang, T., & Nagy, M. (2012). Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 520(1), 1-2.
-

## **Biografija autora**

Danijel I. Pantelić rođen je 04.09.1983. godine u Pančevu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, upisao je školske 2002/2003 godine. Redovne studije je završio 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,69 i ocenom 10 iz diplomskog rada, čime je stekao naziv diplomiranog biologa. Iste godine je upisao i doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Danijel Pantelić je zaposlen od 2012. godine na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, a od 2013. godine radi kao istraživač saradnik na istom mestu.

Tokom naučno-istraživačke karijere, Danijel Pantelić je bio angažovan na dva projekta, međunarodnom: „Priming of the heat and drought tolerance in potato“ (SCOPEs Joint Research Project IZ73Z0\_128031/1, Swiss National Science Foundation) i nacionalnom projektu: „Razvoj i primena proteinskih markera u odabiru sorti krompira otpornih prema visokim temperaturama“ (TR 31049, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije).

U toku svog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada, koautor je većeg broja naučnih radova u domaćim i međunarodnim časopisima, u celini ili izvodu, uključujući i četiri rada u časopisima sa SCI liste, od kojih su dva iz doktorske disertacije. Takođe, Danijel Pantelić je i koautor jednog poglavlja u knjizi.