

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Manja Z. Božić

PROMENE NA NIVOU TRANSKRIPTOMA U RANIM  
FAZAMA RAZVIĆA KUKURUZA (*Zea mays* L.)  
IZAZVANE STRESOM NISKIM TEMPERATURAMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Manja Z. Božić

TRANSCRIPTOME CHANGES DURING EARLY  
DEVELOPMENTAL STAGES OF MAIZE (*Zea mays* L.)  
CAUSED BY LOW-TEMPERATURE STRESS

Doctoral Dissertation

Beograd, 2025

**Mentori:**

---

dr Aneta Sabovljević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

---

dr Ana Nikolić, naučni savetnik,  
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

**Članovi komisije za ocenu doktorske disertacije:**

---

dr Milorad Vujičić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

---

dr Dragana Ignjatović Micić, naučni savetnik,  
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

---

dr Nikola Grčić, viši naučni saradnik,  
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

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

## ZAHVALNICA

*Na prvom mestu, moram da spomenem svoju mentorku dr Anu Nikolić, kojoj dugujem najveću zahvalnost i bez čijeg truda i posvećenosti ove disertacije ne bi bilo. Veliko hvala za svaku pomoć u ekperimentalnom radu, dosadnim javnim nabavkama, nabavljanju tečnog azota, transportu uzoraka, čitanju i ispravljanju svih mogućih apstrakata i radova i same disertacije, i za sve drugo što sam ovde zaboravila da spomenem. Izuzetno sam zahvalna na ukazanom poverenju kroz godine zajedničkog rada i svim pruženim prilikama za napredovanje – od međunarodnih konferencija i raznovrsnih obuka, pa sve do Fulbrajtove stipendije. Nadam se da nas čeka dugi niz godina zajedničke saradnje, jutarnjih kafa i aperola (van radnog vremena naravno).*

*Posebnu zahvalnost dugujem i mentorki prof. dr Aneti Sabovljević, koja me je vodila kroz početke moje istraživačke karijere od osnovnih, preko master i sve do doktorskih studija. Hvala na nesebično prenetom znanju i savetima tokom trajanja studija, koji su značajno doprineli mom profesionalnom i naučno-istraživačkom razvoju.*

*Takođe, veliku zahvalnost dugujem i dr Dragani Ignjatović Micić, članu komisije i rukovodiocu moje laboratorije na institutu, bez čije pomoći, konstruktivnih kritika i saveta ova doktorska disertacija ne bi bila ista.*

*Veliko hvala i članovima komisije, dr Miloradu Vujučiću i dr Nikoli Črčiću na svim savetima, detaljnom čitanju teze i korisnim komentarima koji su značajno unapredili njen kvalitet.*

*Zahvaljujem se i Institutu za kukuruz Zemun Polje i svim mojim kolegama! Posebno se zahvaljujem koleginicama iz laba – Jeleni, Danijeli, Mariji, Sanji i Miri, na velikoj podršci kroz sve ove godine zajedničkog rada. Moram izdvojiti svoju „mamu sa instituta“ Kseniju, koja me je odmah usvojila i pružala neprestana ohrabrenja, savete i podršku kroz godine za šta ću se specijalno odužiti dugačkim nizom odlazaka u bioskop! Takođe, jako sam zahvalna Mileni i Marku, ZP juniorima, koji su kroz godine u istom „sосу“, za konstantna bodrenja i slušanja svakog mog kukanja – nadam se da ćemo jako brzo slaviti i vaše odbranjene doktorate!*

*Poseban pasus moram da posvetim prof. dr Jason Wallace i celoj ekipi iz laboratorije (Darrian, Courtney, Dan & Mary-Frances) koji su me primili u svoju laboratoriju na University of Georgia širom otvorenih ruku i bez čije ekspertize, saveta i pomoći bi mi bilo izuzetno teško da završim bilo koju bioinformatičku analizu u ovoj disertaciji!*

*Hvala mojim prijateljima koji me godinama unazad podržavaju u svim mogućim aspektima života, slušaju, savetuju i pomažu bilo da je reč o nekoj sitnici ili velikom problemu! Izuzetno mi je drago što smo kroz godine ostali ovako bliski i nadam se da će tako ostati još decenijama u budućnosti!*

*Na kraju, ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, pre svega mami i sestri, jer bez njih ništa od ovoga ne bi bilo moguće! Hvala na bezgraničnoj podršci, motivaciji, ljubavi, pomoći – stvarno bez vas ne bih ja bila ja... Hvala što se uvek verovala u mene i volim vas do nebaaa!*

# PROMENE NA NIVOU TRANSKRIPTOMA U RANIM FAZAMA RAZVIĆA KUKURUZA (*Zea mays L.*) IZAZVANE STRESOM NISKIM TEMPERATURAMA

## SAŽETAK

Kukuruz je jedan od najznačajnijih i najšire gajenih useva. Međutim, kukuruz je i jedna od vrsta najosetljivijih na negativne faktore životne sredine izazvane klimatskim promenama. Stoga su razvijene brojne strategije sa ciljem ublažavanja uticaja klimatskih promena na proizvodnju navedenog useva. S obzirom da kukuruz gajen u umerenim oblastima dostiže vegetativne faze najosetljivije na visoke temperature i sušu (cvetanje i nalivanje zrna) u doba godine kada se navedeni klimatski ekstremi dešavaju, rana setva se izdvaja kao jedna od najperspektivnijih strategija održavanja visokog prinosa i proizvodnje. Ipak, rana setva znači i izlaganje biljaka kukuruza niskim temperaturama (NT) u ranim fazama razvića, odnosno u fazi nicanja (VE). Stoga je neophodno dobro poznavanje mehanizama koji su u osnovi odgovora i razvijanja tolerantnosti na NT u ranim fazama razvića kukuruza.

Da bi se navedeni cilj postigao, urađeno je sekvenciranje ukupnog transkriptoma dve linije kukuruza kontrastne tolerantnosti na NT ( $L_S$  i  $L_T$ ) u fazi klijanaca starih pet dana. Izolacija RNK i sekvenciranje su urađeni nakon 6h i 24h tretmana niskim temperaturama (10/8°C). Isto je urađeno za kontrolne klijance gajene u optimalnim uslovima (25°/20°C). Dobijeni sirovi podaci o sekvencama su podvrgnuti proverbi kvaliteta i mapiranju na referentni genom, i urađene su specifične analize za svaku od ispitanih klasa RNK – informacione (geni), duge nekodirajuće (lncRNK), cirkularne (circRNK) i mikroRNK (miRNK). Takođe su predviđene i potencijalne interakcije između navedenih klasa RNK i konstruisana je mreža interakcija.

Pronađeno je ukupno 508 diferencijalno eksprimiranih gena, 63 lncRNK i 649 miRNK između kontrole i tretmana. circRNK nisu bile uključene u odgovor na niske temperature u VE fazi kukuruza. Na osnovu ekspresije gena, lncRNK i miRNK pokazano je da su niske temperature negativno uticale na fotosintetske procese i stabilizaciju proteina. Takođe, razlika između genotipova je uočena kroz odbrambene reakcije na ove promene, što ukazuje da bi oni mogli biti od značaja za uspostavljanje tolerantnosti na NT.

**Ključne reči:** Klimatske promene, kukuruz (*Zea mays L.*), odgovor na stres niskih temperatura, analiza transkriptoma

**Naučna oblast:** BIOLOGIJA

**Uža naučna oblast:** MOLEKULARNA GENETIKA BILJAKA

**UDK Broj:** (633.15 +581.143): 533.581 (043.3)

# TRANSCRIPTOME CHANGES DURING EARLY DEVELOPMENTAL STAGES OF MAIZE (*Zea mays* L.) CAUSED BY LOW-TEMPERATURE STRESS

## ABSTRACT

Maize is one of the most important and widely cultivated agricultural crops. However, it is also one of the species most sensitive to negative environmental factors caused by climate change. Therefore, numerous strategies have been developed with the aim of mitigating the impact of climate change on the production of this crop. Given that maize grown in temperate areas reaches the stages most sensitive to high temperatures and drought (flowering and grain filling) at the time of year when these climate extremes occur, early sowing stands out as one of the most promising strategies for ensuring high yield and production. However, it also means exposing maize plants to low temperatures (LT) during the early stages of development, i.e. the emergence stage (VE). Therefore, understanding the mechanisms underlying the response and establishing of tolerance to LT in the early stages of maize development is of great importance.

In order to achieve this, whole transcriptome sequencing of two maize lines of contrasting tolerance to LT (L<sub>s</sub> and L<sub>T</sub>) was performed at the stage five-day-old seedling stage. RNA isolation and sequencing were performed after 6h and 24h of low-temperature treatment (10/8°C). The same was done for control seedlings grown in optimal conditions (25°/20°C). The sequence data was then subjected to quality control and mapping to the reference genome, and specific analyses were performed for each of the investigated RNA classes – messenger (genes), long non-coding (lncRNA), circular (circRNA) and microRNA (miRNA). Potential interactions between the examined classes of RNA were also predicted and an interaction network was constructed.

A total of 508 differentially expressed genes, 63 lncRNAs and 649 miRNAs were found between control and treatment. circRNAs were not involved in the low-temperature response of maize in the VE stage. Based on the expression of genes, lncRNA and miRNA, it was shown that low temperatures negatively affected photosynthetic processes and protein stabilization. Also, the difference between the genotypes was observed through the defense reactions to these changes, which indicates that they could be important for the establishment of LT tolerance.

**Key words:** Climate change, maize (*Zea mays* L.), low-temperature stress response, whole transcriptome profiling

**Scientific field:** BIOLOGY

**Scientific subfield:** PLANT MOLECULAR GENETICS

**UDK Number:** (633.15 +581.143): 533.581 (043.3)

## **Lista skraćénica:**

5-CQA – 5-O-kafeoilhinska (neohlorogena) kiselina

A – apsorbancia

ABA – abscisinska kiselina

ACC – 1-aminociklo-propan-1-karboksilna kiselina

AGNES – aglomerativna hijerarhijska klaster analiza (eng. *agglomerative clustering/nesting*)

AGO – eng. *argonaut*

AI – veštačka inteligencija (eng. *artificial intelligence*)

*anth* – indeks sadržaja antocijanina

APX – askorbat peroksidaza

ARF – faktor odgovora na auksin (eng. *auxin response factor*)

ASA – askorbinska kiselina

AT – asemblirani transkripti (eng. *assembled transcripts*)

BAM – izlazna datoteka mapiranja u binarnoj formi (eng. *binary alignment map*)

BBP – eng. *basic blue protein*

BCP – eng. *blue copper protein*

BCV – koeficijent biološke varijabilnosti (eng. *biological coefficient of variation*)

bHLH – eng. *basic Helix-Loop-Helix*

BIN2 – eng. *brassinosteroid insensitive 2*

bp – bazni par

BR - brasinosteroidi

BS – mesta spajanja reverzne orijentacije (eng. *back-splicing*)

BSA – goveđi serum albumin (eng. *bovine serum albumin*)

BTF3L – eng. *basic transcription factor 3 (BTF3)-like protein*

bZIP – eng. *basic leucine zipper*

BZR1 – eng. *brassinazole resistant 1*

C – kontrola (optimalni uslovi)

CAB – hlorofil-vezujući proteini (eng. *chlorophyll a-b binding*)

CaM/CML – eng. *calmodulin/calmodulin-like protein*

CAMTA – kalmodulin-vezujući transkripcioni aktivator (eng. *calmodulin-binding transcription activator*)

CAP – eng. *cold acclimation proteins*

CASPL – eng. *Casparian strip membrane protein like*

CAT – katalaza

CBF – eng. *C-repeat binding factors*

CBL – eng. *calcineurin B-like protein*

CCA1 – eng. *circadian clock associated 1*

cDNK – komplementarna DNK (eng. *complementary DNA*)

CDPK – kalcijum-zavisne protein kinaze (eng. *calcium dependant protein kinase*)

CE – kapilarna elektroforeza (eng. *capillary electrophoresis*)

ceRNA – eng. *competing endogenous RNA*

Ces – eng. *cellulose synthase 2*

chl – indeks sadržaja hlorofila

CID – fragmentacija kolizionom indukovanom disocijacijom (eng. *collision-induced*)

CIPK – eng. *CBL-interacting protein kinases*

circRNK – cirkularne RNK

CNGC – eng. *cyclic nucleotide-gated channels*

COG1-OsSERL2 – eng. *chilling tolerance in Gengdao 1 - somatic embryogenesis receptor-like kinase 2*

COI1 – eng. *coronatine insensitive 1*

COLD1 – eng. *chilling-tolerance divergence 1*

contrib – individualni doprinosi svake PC

coord – koordinate svake PC

COR – eng. *cold regulated*

cor – korelacije između PC i dimenzija analize

cos2 – cos2 vrednosti PC

c<sub>prot</sub> – koncentracija proteina u uzorku

CRF – faktori odgovora na citokinin (eng. *cytokinin response factors*)

CRK – eng. *cysteine-rich protein kinases*, CRKs

CRLK1 – eng. *Ca<sup>2+</sup>/CaM-regulated receptor-like kinase 1*

CSD – Cu/Zn superoksid dismutaza

C<sub>T</sub> – broj ciklusa u kom je fluorescentni signal prešao određen prag amplifikacije, automatski zadat od aparata

DAG – diacilglicerol

DCL1 – eng. *DICER-LIKE 1*

ddH<sub>2</sub>O – duplo destilovana voda

DE – diferencijalna ekspresija

DEG – diferencijalno eksprimiran gen

DEM – diferencijalno eksprimiran metabolit

dG – slobodna energija vezivanja (eng. *binding free energy*, deltaG )

DHN – dehidrin

DI – dužina izdanka

DK – dužina korena

$D_{kol}$  – dužina koleoptila

DL – duboko mašinsko učenje (eng. *deep learning*)

DML3 – eng. *DEMETER-LIKE PROTEIN 3*

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DNTB – 5-tiodinitrobenzojeva kiselina

dNTP – dezoksinukleozidtrifosfat

$D_{rad}$  – dužina radikule

DREB – eng. *dehydration responsive element-binding*

E – koeficijent efikanosti amplifikacije reakcije polimeraze

EDTA – etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina

EK – endogena kontrola

EPFL – eng. *epidermal patterning factor-like protein*

ERF – eng. *ethylene responsive factor*

EST – eng. *expressed sequence tags*

EtBr – etidijum-bromid

ETH – etilen

ETR – brzina prenosa elektrona (eng. *electron transfer rate*)

F – stabilna fluorescencija adaptirana na svetlost

$F_0$  – minimalni fluorescentni signal

FC – promena ekspresije (eng. *fold change*)

FCR – Folin–Ciocalteu reagens

FEA – analiza funkcionalnog obogaćivanja (eng. *functional enrichment analysis*)

*flav* – indeks sadržaja flavonola

$F_M$  – maksimalni signal fluorescencije

$F_M'$  – maksimalna fluorescencija adaptirana na svetlost

FPKM – broj fragmenata po kilobazi transkripata za svakih milion mapiranih sekvenci (eng. *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*)

FS – režim masene spektrometrije za potpuno skeniranje (eng. *full scanning*)

FT-ICR – eng. *Fourier transfer ion cyclotron resonance*

$F_v/F_m$  – maksimalni kvantni prinos fotosistema II (eng. *maximum quantum yield of photosystem II*)

g – gram

G6P – glukozo-6-fosfat

GAE – ekvivalenati galne kiseline (eng. *gallic acid equivalents*)

GAMYB – eng. *gibberellin-and-abscisic-acid-regulated MYB*

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfatna dehidrogenaza

GASA – eng. *Gibberellic acid-stimulated Arabidopsis*

GC – guanin-citozin parovi

GFF – eng. *general feature format*

GGPP – geranil-geranil pirofosfat

GH – gasna hromatografija

GIF – GRF-interagujući faktori

GO – genska ontologija (eng. *gene onthology*)

GPX – glutation peroksidaza

GRF – faktori regulacije rasta (eng. *growth regulating factors*)

GRX – glutaredoksini

GSH – redukovani glutation

GSSG – oksidovani glutation

GST – glutation transferaza

GTF – eng. *general transfer format*

GWAS – analize asocijacija na nivou kompletnog genoma (eng. *genome wide association study*)

h – sat

ha – hektar

HCA – hijerarhijska klaster analiza (eng. *hierarchical cluster analysis*)

HEN2 – eng. *HUA enhancer 2*

HOS1 – eng. *high expression of osmotically responsive gene 1*

HPAEC-PAD – visoko-efikasna anjonska hromatografija sa elektrohemijском detekcijom (eng. *High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*)

HSF – transkripcioni faktori toplotnog stresa (eng. *heat shock factors*)

hsp – proteini toplotnog stresa (eng. *heat shock proteins*)

Hz – herc

i5 – indeks 2 adapteri

i7 – indeks 1 adapteri  
ICE1 – eng. *inducer of CBF expression 1*  
ID – identifikacioni broj  
IP3 – inozitol(1,4,5)trifosfat  
iRNK – informacione RNK  
IS - intenzitet svetlosti  
JA – jasmonska kiselina  
JAZ – eng. *jasmonate zim-domain*  
JMS – broj jedinstveno mapiranih sekvenci (eng. *unique mapped reads*)  
kb – kilobaza  
KEGG – eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*  
kg – kilogram  
Konc. – koncentracija  
KPNB1- homolog humanog importina  $\beta$   
L – litar  
LC – tečna gromatografija (eng. *liquid chromatography*)  
LCR – eng. *LEAF CURLING RESPONSIVENESS*  
LEA - eng. *late embryogenesis abundant*  
LH – eng. *light harvesting*  
LHY – eng. *late elongated hypocotyl*  
lincRNK – intergenske lincRNK  
lncRNK – duge nekodirajuće RNK (eng. *long non-coding RNA*)  
log – logaritam  
L<sub>s</sub> – linija, odnosno genotip, kukuruza osetljiva na niske temperature  
L<sub>T</sub> – linija, odnosno genotip, kukuruza tolerantna na niske temperature  
M – molarna koncentracija  
m/z – odnos mase i napona  
MAPK – mitogen indukovana proteinska kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinases*)  
MAPKK – MAPK kinaza  
MAS – selekcija pomoću molekularnih markera (eng. *marker-assisted selection*)  
MAX – eng. *more axillary growth*  
MCA – eng. *mid complementing activity*  
MDA – malonil dialdehid  
MDASA – monodehidroaskorbinska kiselina

mg – miligram  
MI – sveža masa izdanka  
min – minut  
miRNK – mikroRNK  
MK – sveža masa korena  
ML – mašinsko učenje (eng. *machine learning*)  
mL – mililitar  
mM – milimolarna koncentracija  
MQTL – meta QTL  
MS – masena spektrometrija  
N% – sadržaj neidentifikovanih baza  
N<sub>B</sub> – ukupan broj baza  
N<sub>BVK</sub> – ukupan broj baza visokog kvaliteta  
N<sub>SS</sub> – broj sirovih sekvenci  
N<sub>SVK</sub> – ukupan broj sekvenci visokog kvaliteta  
NAC – eng. *no apical meristem (NAM)*, *Arabidopsis transcription activation factor (ATAF)*, *cup-shaped cotyledon (CUC)*  
NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
ncRNK – nekodirajuće RNK (eng. *non-coding*)  
nDG – slobodna energija vezivanja, dG, normalizovana po dužinama RNK molekula  
NEST – eng. *nuclear expressed sequence tag*  
NF-Y – nuklearni faktor Y  
ng – nanogram  
NGS – metode sekvenciranja nove generacije (eng. *next generation sequencing*)  
nm – nanometar  
NMR - nuklearna magnetne rezonanca  
nt – nukleotid  
NT – niska temperatura  
OP – optički put svetlosti  
ORA – analiza prezastupljenosti (eng. *over-representation analysis*)  
ORF – otvoreni okvir čitanja gena (eng. *open reading frame*)  
OsSAPK8 – eng. *osmotic stress/aba-activated protein kinase 8*  
OST1 – eng. *open stomata 1*  
PAR – fotosintetski aktivno zračenje (eng. *photosynthetically active radiation*)

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

PC – glavna komponenta (eng. *principal component*)

PCA – analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*)

PCF – eng. *proliferating cell factor*

PCR – reakcija lančanog umnožavanja, odnosno polimerizacije (eng. *polymerase chain reaction*)

PDF – protodermalni faktor

PDS – fitoen desaturaza

PE – tip sekvenciranja neophodan za iRNK, lncRNK, i circRNK (eng. *paired end, PE*)

PGPR – rizobakterije koje promovišu rast biljaka (eng. *plant growth-promoting rhizobacteria*)

PHB – eng. *PHBULOSA*

PIF – fitohrom-interagujući faktori (eng. *phytochrome interacting factors*)

PIS – režim masene spektrometrije za skeniranje jonskih proizvoda (eng. *product ion scanning*)

POD – peroksidaza

PPM – eng. *parts per million*

pre-miRNK – prekursorske miRNK

PSI – fotosistem I

PSII – fotosistem II

PSY – fitoen sintaza

PTM - post-translacione modifikacije

Q20 – procenat sekvenci sa ocenom kvaliteta većom od 20

Q30 – procenat sekvenci sa ocenom kvaliteta većom od 30

QC – Fredova ocena kvaliteta sekvenciranja (eng. *Phred quality score*)

qCML – metoda kvantilno prilagođene uslovne maksimalne verodostojnosti (eng. *quantile-adjusted conditional maximum likelihood*)

QE – kvercetin

qRT-PCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

QTL – lokus za kvantitativne osobine (eng. *quantitative trait locus*)

R<sup>2</sup> – linearnost standardne krive

RABT – pristupa zasnovanog na korišćenju referentne datoteke (eng. *reference annotation based transcript*)

RC – broj sekvenci (eng. *read count*)

RCA – Rubisco aktivaza

RE – relativna ekspresija

RIN – ocena kvaliteta i integriteta izolovane RNK (eng. *RNA integrity number*)

*RNA-Seq* – sekvenciranje populacija fragmenata cDNK metodama NGS

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivna kiseonična vrsta (eng. *reactive oxygen species*)

RPM – broj sekvenci za svakih milion mapiranih sekvenci (eng. *reads per million*)

rRNK – ribozomalna RNK

RT – reverzna transkripcija

Rubisco - ribuloza-bisfosfatna karboksilaza

RV – relativna vlažnost vazduha

RVE – protein *REVEILLE*

s – sekunda

S6PDH – sorbitol-6-fosfat dehidrogenaza

SA – salicilna kiselina

SAGE – serijska analiza genske ekspresije (eng. *serial analysis of gene expression*)

SALUS – eng. *system approach for land use sustainability*

SAPK – eng. *serine/threonine protein kinases*

SBPaza – sedoheptulozo-1,7-bisfosfataza

SDD1 – eng. *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1*

SDH – sorbitol dehidrogenaza

SDR – eng. *short-chain dehydrogenase/reductase*

SDS-PAGE – eng. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*

SE – tip sekvenciranja potreban za miRNK (eng. *single end*)

SEP3 – eng. *SEPALLATA 3*

SG – stopa greški

SI – stopa inhibicije

SJ – mesta spajanja (eng. *splicing junctions*)

SL – strigolaktoni

SM – sveža masa klijanca

SMI – suva masa izdanka

SMK – suva masa korena

SMXL – eng. *suppressor of max2-like*

snoRNK – male nukleolarne RNK (eng. *small nucleolar RNA*)

SNP – pojedinačni nukleotidni polimorfizmi (eng. *single nucleotide polymorphism*)

SnRK2 – eng. *SNF1-related protein kinase 2*

snRNK – male nuklearne RNK (eng. *small nuclear RNA*)

SOD – superoksid dismutaza

SP – stopa preživljavanja

SPL - proteini nalik na one koji se vezuju za skvamoza promotor (eng. *squamosa promoter-binding (SPB) like proteins*)

sRNK – male RNK (eng. *small RNA*)

sRNK<sub>ER</sub> – sekvence sRNK mapirane na egzonske regione

sRNK<sub>IR</sub> – sekvence sRNK mapirane na intronske regione

SSR – mikrosateliti (eng. *simple sequence repeats*)

STP – eng. *soft threshold power, STP*

SWEET – eng. *sugar will eventually be exported transporter*

T – tretman niskim temperaturama

t – tona

TBA – tiobarbituratna kiselina

TCA – trihlorosirćetna kiselina

TCP – eng. *teosinte branched1/cycloidea/PCF*

TE – Tris/EDTA

TF – transkripcioni faktor

T<sub>H</sub> – temperatura hibridizacije prajmera

TIC – eng. *translocon of the inner chloroplast envelopes*

TOF – eng. *time of flight*

TPM – broj transkripata na milion sekvenci (eng. *transcripts per million reads*)

TPS – trehalozo-6-fosfat sintaza

t<sub>R</sub> – retenciono vreme

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

tRNK – transportne RNK

Trx – tioredoksin

T<sub>T</sub> – temperatura topljenja prajmera

V1 – vegetativna faza u razviću kukuruza u kojoj je potpuno formiran prvi list

V2 – vegetativna faza u razviću kukuruza u kojoj je potpuno formiran drugi list

V3 – vegetativna faza u razviću kukuruza u kojoj je potpuno formiran treći list

VE – vegetativna faza nicanja u razviću kukuruza u (eng. *emergence stage*)

U – jedinica

UF3GT – antocijanidin 3-O-glukoziltransferaza

UHPLC – ultra-visokoefikasna tečna hromatografija (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

UHPLC–DAD MS/MS – UHPLC spregnuta sa detektorom umreženih fotodioda i hibridnim masenim spektrometrom (eng. *UHPLC with a Diod Array Detector and Triple-Quadrupole Mass Spectrometer*)

UMS – ukupan broj mapiranih sekvenci (eng. *total mapped reads*)

USP – univerzalni proteini stresa

V – volt

WGCNA – eng. *weighted gene co-expression network analysis*

WGS – sekvence ukupnog genoma (eng. *whole-genome sequences*)

Y(NO) – kvantna efikasnost neregulisanog oslobađanja energije u PSII (eng. *quantum efficiency of unregulated energy dissipation in PSII*)

Y(NPQ) – kvantna efikasnost regulisanog oslobađanja energije u PSII (eng. *quantum efficiency of regulated dissipation of energy in the PSII*)

µg – mikrogram

µL – mikrolitar

µm – mikrometar

µM – mikromolarna koncentracija

µmol – mikromol

Φ<sub>PSII</sub> – fotohemijska efikasnost fotosistema II (eng. *photochemical efficiency of photosystem II*)

## **Sadržaj:**

1. Uvod .....	1
1.1. Klimatske promene i njihov uticaj na proizvodnju kukuruza .....	1
1.1.1. Uticaj klimatskih promena na poljoprivredu .....	1
1.1.2. Uticaj klimatskih promena na proizvodnju kukuruza .....	3
1.1.3. Strategije ublažavanja uticaja klimatskih promena u poljoprivredi .....	4
1.2. Stres izazvan niskim temperaturama i odgovor kukuruza .....	6
1.2.1. Percepcija i transdukcija signala niskih temperatura .....	7
1.2.2. Glavni mehanizam odgovora na niske temperature (ICE1-CBF-COR regulon) ....	8
1.2.3. Uloga fitohormona u regulaciji odgovora na niske temperature .....	10
1.2.4. Uloga nekodirajućih RNK u regulaciji odgovora na niske temperature .....	12
1.2.4.1. Uloga miRNK u regulaciji odgovora na niske temperature .....	12
1.2.4.2. Uloga lncRNK u regulaciji odgovora na niske temperature .....	14
1.2.4.3. Uloga circRNK u regulaciji odgovora na niske temperature .....	15
1.2.5. Uticaj niskih temperatura na biljke kukuruza .....	15
1.2.5.1. Mehanizam odgovora na niske temperature kod kukuruza .....	16
1.2.5.2. Uloga fitohormona u regulaciji odgovora na niske temperature kod kukuruza .....	18
1.2.5.3. Uloga ncRNK u regulaciji odgovora na niske temperature kod kukuruza .	18
1.3. Pristupi u proučavanju odgovora na stres izazvan niskim temperaturama .....	19
1.3.1. Istorija proučavanja odgovora na stres izazvan niskim temperaturama .....	19
1.3.2. Uvođenje tehnologija molekularne biologije u proučavanje odgovora na stres izazvan niskim temperaturama .....	20
1.3.3. Genomska era proučavanja odgovora na niske temperature .....	21
1.3.3.1. Metode strukturne genomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature .....	21
1.3.3.2. Metode funkcionalne genomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature .....	23
1.3.3.2.1. Metode transkriptomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature .....	24
1.3.3.2.2. Metode proteomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature .....	25
1.3.3.2.3. Metode metabolomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature .....	27

1.3.3.2.4. Integrativni pristupi genomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature .....	28
1.4. Perspektive i budući pristupi u proučavanju odgovora na abiotički stres .....	30
2. Cilj rada .....	33
3. Materijal i metode .....	34
3.1. Biljni materijal .....	34
3.2. Određivanje tolerantnosti na niske temperature i odabir genotipova kukuruza za analizu transkriptoma .....	34
3.2.1. Germinacija i tretman niskim temperaturama odabranih genotipova kukuruza .	34
3.2.2. Ispitivanje parametara tolerantnosti na niske temperature .....	35
3.2.2.1. Analiza morfoloških parametara .....	35
3.2.2.2. Analiza fizioloških parametara .....	35
3.2.3. Izbor genotipova kukuruza za dalje eksperimentalne analize .....	35
3.3. Biohemijska i fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature tolerantnog ( $L_T$ ) i osetljivog ( $L_s$ ) genotipa kukuruza .....	36
3.3.1. Biohemijska karakterizacija .....	36
3.3.1.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola .....	36
3.3.1.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida .....	37
3.3.1.3. Određivanje sadržaja pojedinačnih šećera i šećernih alkohola .....	37
3.3.1.4. Određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina	38
3.3.2. Fiziološka karakterizacija .....	40
3.3.2.1. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije .....	40
3.3.2.2. Određivanje koncentracije proteina primenom Bradfordovog testa .....	41
3.3.2.3. Određivanje aktivnosti peroksidaze (POD) .....	42
3.3.2.4. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (APX) .....	43
3.3.2.5. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPX) .....	44
3.3.2.6. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) .....	45
3.3.2.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	46
3.3.2.8. Određivanje fotosintetske efikasnosti .....	47
3.4. Sekvenciranje ukupnog transkriptoma .....	48
3.4.1. Dizajn eksperimenta .....	48
3.4.2. Priprema uzoraka za formiranje biblioteka komplementarne DNK .....	49
3.4.2.1. Izolacija ukupne RNK .....	49
3.4.2.2. Prečišćavanje ukupne RNK .....	50

3.4.2.3.	Provera kvaliteta ukupne RNK .....	50
3.4.3.	Priprema biblioteka komplementarne DNK .....	51
3.4.3.1.	Uklanjanje ribozomalne RNK .....	51
3.4.3.2.	Priprema PE biblioteka za sekvenciranje .....	52
3.4.3.2.1.	Sinteza komplementarne DNK .....	52
3.4.3.2.2.	Adenilacija 3' krajeva i ligacija adaptera .....	54
3.4.3.2.3.	Umnožavanje cDNK fragmenata i formiranje cDNK biblioteka .....	54
3.4.3.3.	Priprema SE biblioteka za sekvenciranje .....	55
3.4.4.	Sekvenciranje ukupnog transkriptoma .....	56
3.5.	Bioinformatička obrada podataka dobijenih sekvenciranjem .....	57
3.5.1.	Obrada sirovih podataka i poravnanje sa referentnim genomom .....	57
3.5.2.	Analiza ekspresije iRNK .....	59
3.5.2.1.	Kvantifikacija iRNK .....	59
3.5.2.2.	Analiza glavnih komponenti (PCA) .....	59
3.5.2.3.	Hijerarhijska analiza grupisanja (HCA) .....	59
3.5.2.4.	Analiza diferencijalne ekspresije (DE analiza) .....	60
3.5.2.5.	Analiza funkcionalnog obogaćivanja .....	60
3.5.2.6.	Analiza obrazaca koekspresije .....	60
3.5.3.	Analiza ekspresije lncRNK .....	61
3.5.4.	Analiza ekspresije circRNK .....	61
3.5.5.	Analiza ekspresije miRNK .....	62
3.5.6.	Analiza interakcija između različitih klasa RNK i konstrukcija mreža interakcije .....	62
3.6.	Validacija rezultata sekvenciranja transkriptoma .....	63
3.6.1.	Sinteza cDNK .....	63
3.6.1.1.	Priprema uzoraka za reverznu transkripciju RNK i sintezu cDNK .....	63
3.6.1.2.	Reverzna transkripcija RNK i sinteza cDNK .....	64
3.6.1.3.	Provera uspešnosti sinteze cDNK .....	64
3.6.2.	Odabir gena za validaciju rezultata sekvenciranja .....	65
3.6.2.1.	Određivanje temperature hibridizacije pojedinačnih parova prajmera .....	65
3.6.3.	Određivanje efikasnosti izabranih prajmera za DE gene i ncRNK .....	66
3.6.4.	Validacija rezultata sekvenciranja qRT-PCR metodom .....	67
4.	Rezultati .....	69
4.1.	Određivanje tolerantnosti na niske temperature i odabir genotipova kukuruza za analizu transkriptoma .....	69

4.1.1.	Morfološki parametri .....	69
4.1.2.	Fiziološki parametri .....	75
4.1.3.	Izbor genotipova kukuruza za analizu transkriptoma .....	75
4.2.	Biohemijska i fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature tolerantnog ( $L_T$ ) i osetljivog ( $L_s$ ) genotipa kukuruza .....	77
4.2.1.	Biohemijska karakterizacija .....	77
4.2.1.1.	Ukupan sadržaj fenola .....	77
4.2.1.2.	Ukupan sadržaj flavonoida .....	78
4.2.1.3.	Sadržaj pojedinačnih šećera i šećernih alkohola .....	79
4.2.1.4.	Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina .....	81
4.2.2.	Fiziološka karakterizacija .....	83
4.2.2.1.	Nivo lipidne peroksidacije .....	83
4.2.2.2.	Aktivnost antioksidativnih enzima .....	84
4.2.2.2.1.	Aktivnost peroksidaze (POD) .....	84
4.2.2.2.2.	Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) .....	85
4.2.2.2.3.	Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) .....	85
4.2.2.2.4.	Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) .....	86
4.2.2.2.5.	Aktivnost katalaze (CAT) .....	86
4.2.2.3.	Fotosintetska efikasnost .....	87
4.3.	Sekvenciranje ukupnog transkriptoma .....	87
4.4.	Bioinformatička obrada podataka .....	88
4.4.1.	Kvalitet sirovih podataka sekvenciranja .....	88
4.4.2.	Poravnanje prečišćenih sekvenci sa referentnim genomom .....	89
4.4.3.	Ekspresija iRNK .....	91
4.4.3.1.	Analiza glavnih komponenti (PCA) .....	91
4.4.3.2.	Hijerarhijska analiza grupisanja (HCA) .....	92
4.4.3.3.	Diferencijalna ekspresija gena .....	94
4.4.3.4.	Funkcionalno obogaćivanje gena .....	96
4.4.3.5.	Obrasci koekspresije gena .....	97
4.4.4.	Ekspresija lncRNK .....	97
4.4.5.	Ekspresija circRNK .....	101
4.4.6.	Ekspresija miRNK .....	104
4.4.6.1.	Identifikacija poznatih miRNK .....	104
4.4.6.2.	Identifikacija potencijalno novih miRNK .....	105

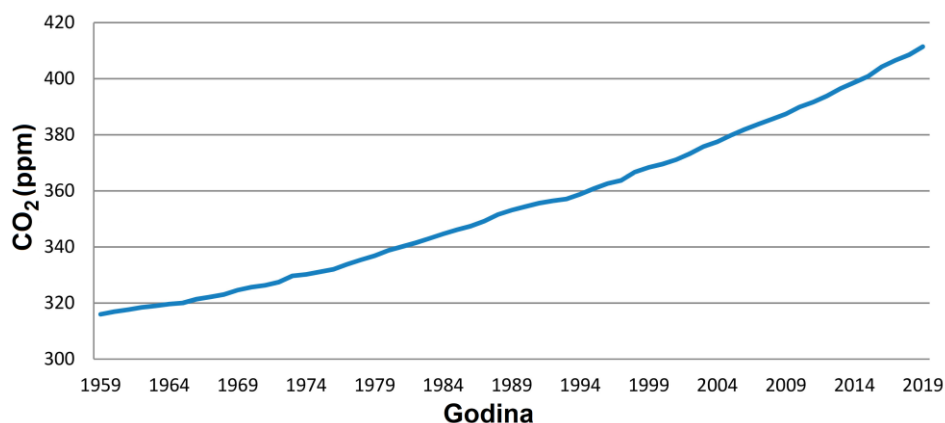
4.4.6.3.	Kvantifikacija identifikovanih miRNK .....	107
4.4.6.4.	Diferencijalno eksprimirane miRNK .....	109
4.4.6.5.	Hijerarhijska analiza grupisanja miRNK .....	111
4.4.7.	Interakcije između različitih klasa RNK .....	112
4.4.7.1.	Interakcije između miRNK i drugih klasa RNK .....	112
4.4.7.2.	Interakcije između lncRNK i iRNK .....	114
4.4.7.3.	Mreža interakcija .....	115
4.5.	Validacija rezultata sekvenciranja transkriptoma .....	116
4.5.1.	Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno eksprimiranih iRNK (gena) ...	116
4.5.2.	Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno eksprimiranih lncRNK .....	117
4.5.3.	Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno eksprimiranih miRNK .....	119
5.	Diskusija .....	120
5.1.	Odabir genotipova kukuruza za analizu transkriptoma .....	120
5.2.	Biohemijska karakterizacija odgovora na niske temperature osetljivog i tolerantnog genotipa kukuruza .....	121
5.2.1.	Promene u nivou fenolnih jedinjenja .....	122
5.2.2.	Promene u nivou šećera i šećernih alkohola .....	124
5.2.2.1.	Promene u nivou šećera .....	124
5.2.2.2.	Promene u nivou šećernih alkohola .....	127
5.3.	Fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature osetljivog i tolerantnog genotipa .....	129
5.3.1.	Nivo lipidne peroksidacije .....	129
5.3.2.	Aktivnost peroksidaze (POD) .....	130
5.3.3.	Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) .....	130
5.3.4.	Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) .....	131
5.3.5.	Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) .....	131
5.3.6.	Aktivnost katalaze (CAT) .....	132
5.3.7.	Fotosintetska efikasnost .....	132
5.3.8.	Karakterizacija odgovora na niske temperature .....	133
5.4.	Promene na nivou transkriptoma izazvane niskim temperaturama .....	133
5.4.1.	Geni uključeni u odgovor na NT .....	134
5.4.1.1.	PCA i HCA .....	134
5.4.1.2.	Diferencijalno eksprimirani geni uključeni u proces fotosinteze .....	134
5.4.1.2.1.	Uticaj niskih temperatura na fotosisteme .....	134

5.4.1.2.2.	Uticaj niskih temperatura na enzime Kalvinovog ciklusa .....	135
5.4.1.2.3.	Uticaj niskih temperatura na fotoinhibiciju i aktivirane zaštitne mehanizme .....	136
5.4.1.3.	Diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni u odgovor na abiotički stimulus .....	139
5.4.1.3.1.	Diferencijalno eksprimirani hsp i HSF geni .....	139
5.4.1.3.2.	Diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni u odgovor na NT .....	140
5.4.1.3.3.	Diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni u odgovor na oksidativni stres .....	140
5.4.2.	lncRNK uključene u odgovor na NT .....	141
5.4.3.	circRNK uključene u odgovor na NT .....	142
5.4.4.	miRNK uključene u odgovor na NT .....	143
5.4.5.	Interakcije između različitih klasa RNK .....	144
5.4.5.1.	Interakcije između miRNK i drugih klasa RNK .....	145
5.4.5.1.1.	Interakcije između miRNK i iRNK (gena) .....	145
5.4.5.1.2.	Interakcije između miRNK i drugih nekodirajućih RNK .....	148
5.4.5.2.	Interakcije između lncRNK i iRNK (gena) .....	148
5.4.5.3.	Mreža interakcija između klasa RNK .....	149
6.	Zaključci .....	151
7.	Literatura .....	153

# **1. Uvod**

## **1.1 Klimatske promene i njihov uticaj na proizvodnju kukuruza**

Klimatske promene su definisane kao oscilacije u statističkoj distribuciji klimatskih obrazaca u dužem vremenskom periodu, uglavnom uzrokovane emisijom gasova staklene bašte koji dovode do „zarobljavanja“ toplote u atmosferi što uzrokuje globalno zagrevanje. Iako postoje i prirodni izvori ovih gasova, smatra se da su glavni uzročnici klimatskih promena antropogenog porekla – proizvodnja energije, industrijske aktivnosti, šumarstvo i poljoprivreda (Rawat i sar., 2023). Prema protokolu iz Kjota, najznačajniji gasovi staklene bašte su ugljen dioksid (CO<sub>2</sub>), metan (CH<sub>4</sub>), azot oksid (N<sub>2</sub>O) i F-gasovi, poput hidrofluorokarbona (UNFCCC, 2008). Među njima, najveći udeo zauzima CO<sub>2</sub> u najvećoj meri generisan sagorevanjem fosilnih goriva, koje je neophodno za proizvodnju energije i različite industrijske aktivnosti, uključujući i poljoprivredu (Fawzy i sar., 2020). Povećanje koncentracije ugljen dioksida u atmosferi u periodu od 1959. do 2019. godine je prikazano na Slici 1.1. U navedenom periodu emisija CO<sub>2</sub> se povećala za više od 25%.



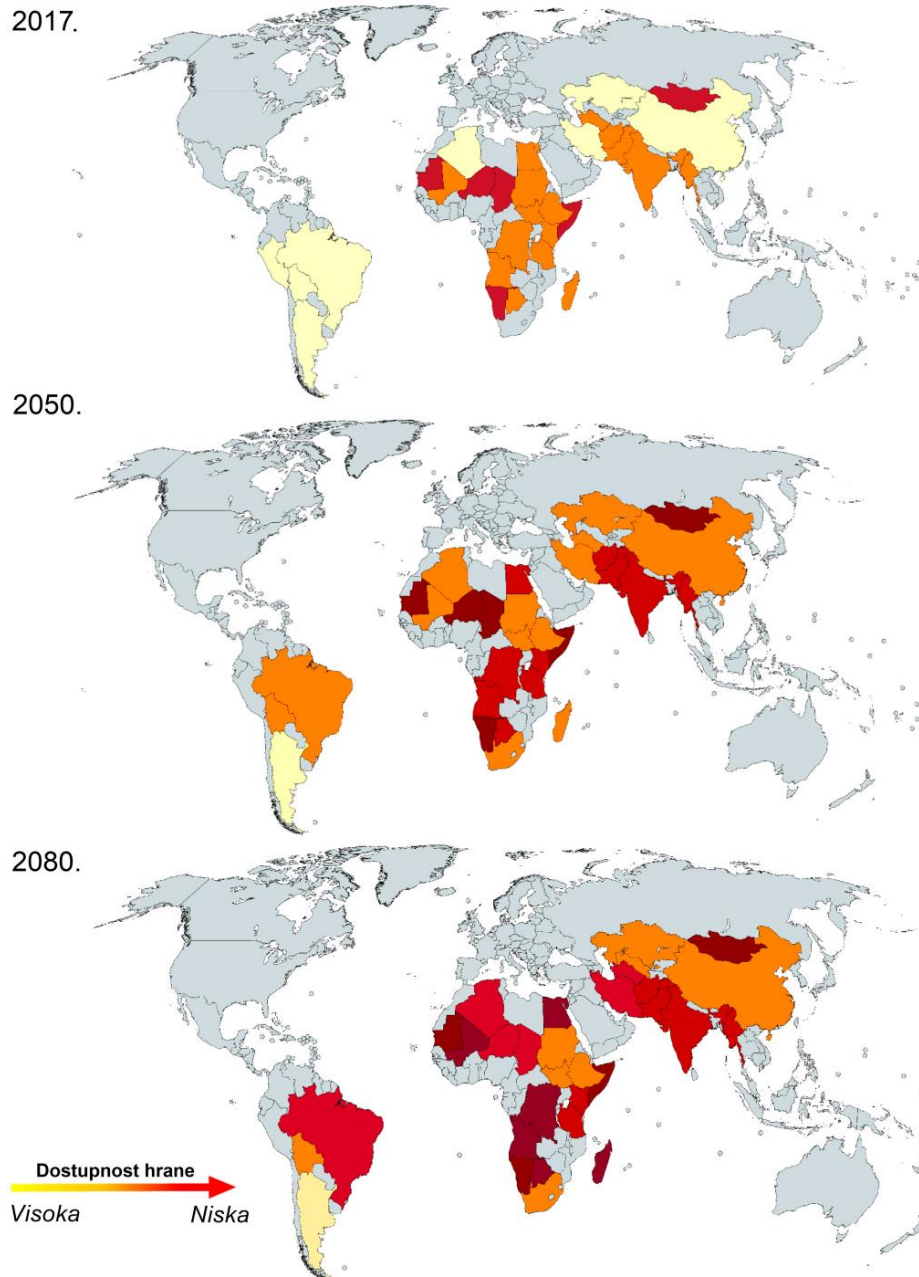
**Slika 1.1 Povećanje koncentracije ugljen dioksida u atmosferi u periodu od 1959. do 2019. godine.** Koncentracija ugljen dioksida je prikazana u PPM (eng. *parts per million*, PPM). Preuzeto iz Malhi i sar., (2021).

Direktne posledice povećane koncentracije gasova staklene bašte u atmosferi su raznovrsne i uključuju povećanje prosečne temperature, podizanje nivoa svetskog mora, promene u obrascima precipitacije i promene u okeanskim strujama (Rawat i sar., 2023). Prosečne globalne temperature se povećavaju stopom od 0,2°C po deceniji od 1975. godine (Malhi i sar., 2021) i do 2100. godine se očekuje povećanje od 2,5-4,5°C (Wang i sar., 2018a). Povećanje prosečnih globalnih temperatura uzrokuje učestalije pojave suša, poplava, uragana, intenzivnih oluja, toplotnih talasa i požara, što dovodi i do promena u obrascima godišnjih doba, distribucije zaraznih bolesti, dezertifikacije i degradacije zemljišta (UNCCS 2019; Fawzy i sar., 2020). Prema 15. izdanju izveštaja o globalnim rizicima klimatskih promena (WEF, 2020), posledice klimatskih promena po ljude uključuju gubitke života uzrokovane prirodnim katastrofama, smanjeni pristup hrani i vodi, povećanu stopu migracija izazvanu vremenskim nepogodama, geopolitičke tenzije i konflikte, kao i negativan uticaj na različite privredne i tržišne sektore, uključujući poljoprivredu.

### **1.1.1. Uticaj klimatskih promena na poljoprivredu**

Poljoprivredna proizvodnja useva zauzima 40% zemljišta na planeti (koje nije pokriveno ledom), a njen razvoj u prethodnih nekoliko decenija je uspeo da zadovolji potrebe za hranom rastuće ljudske populacije. Ipak, poljoprivredna proizvodnja je takođe imala značajan negativan

uticaj na životnu sredinu – klimatske promene, zagađenje voda i vazduha, kao i gubitak biodiverziteta. Poljoprivreda je odgovorna za 25% emisije gasova staklene bašte i 80–90% svetske upotrebe azota i fosfora (Campbell i sar., 2017). Paralelno sa rastom svetske populacije, raste i potreba za resursima (Godfray i sar., 2010; Zeifman i sar., 2022). To znači da će biti neophodno da se poljoprivredna proizvodnja poveća, kako bi se obezbedila dostupnost (sigurnost) hrane. Projekcije mogućih scenarija dostupnosti hrane u 2050. i 2080 su prikazane na Slici 1.2.



**Slika 1.2** Projekcije mogućih scenarija dostupnosti hrane u 2050. i 2080. i poređenje sa vrednostima iz 2017. godine. Preuzeto i modifikovano iz Wang i sar., (2018a).

Sa druge strane, poljoprivreda je privredni sektor najviše pogođen klimatskim promenama zbog svoje široke rasprostranjenosti i osetljivosti na meteorološke parametre, što dovodi do ogromnih ekonomskih gubitaka (Mendelsohn, 2009). Kao što je već rečeno, promene u regionalnoj distribuciji padavina i temperatura negativno utiču na poljoprivrednu proizvodnju

(Kerr i sar., 2022, IPCC 2023) i prinos mnogih vrsta useva (Anderson i sar., 2020; Benitez-Alfonso i sar., 2023). Raznovrsni klimatski modeli su pokazali da kombinovani efekat klimatskih promena i povećane koncentracije CO<sub>2</sub> u atmosferi dovodi do smanjenja prinosa useva u umerenim klimatskim područjima (Jägermeyr i sar., 2021). Povećanje prosečnih temperatura negativno utiče na prinos na više načina – visoke temperature skraćuju životni ciklus mnogih vrsta useva, dovodeći do redukcije u usvajanju ugljenika i do stresa suše (Wang i sar., 2018a; Zhu i sar., 2018b). Zhao i sar (2017) su pokazali da je povećanje prosečnih globalnih temperatura za 1°C povezano sa prosečnim smanjenjem prinosa od 3-7% mnogih važnih vrsta useva. Predikcije dobijene u istraživanju Deutsch i sar. (2018) su imale zabrinjavajuće vrednosti u još većoj meri – očekivani gubici u prinosu pirinča, kukuruza i pšenice sa povećanjem prosečne temperature za 1°C bili su 10-25%. Učestalije suše takođe rezultuju značajnim redukcijama u proizvodnji useva (van Dijk i sar., 2013; Rippey, 2015), dok ekstremne padavine i poplave mogu dovesti do povećane stope pojave lokalnih kriza u dostupnosti hrane (Bhutta i sar., 2022). Slično usevima, i proizvodnja i produktivnost domaćih životinja, odnosno efikasnost konverzije resursa (hrana, voda) u poljoprivredne proizvode (meso, mleko, jaja) su u negativnoj korelaciji sa povećanjem prosečnih temperatura, jer zagrevanje dovodi do smanjene prehrane i stope rasta, kao i povećane učestalosti zaraznih bolesti (Kerr i sar., 2022).

Dakle, poljoprivreda je jedina grana privrede koja se nalazi pod izuzetnim negativnim uticajem klimatskih promena, dok istovremeno značajno doprinosi ovom problemu. Stoga, unapređenje poljoprivredne proizvodnje i njena stabilnost iz godine u godinu biće od ključne važnosti za dugoročnu globalnu dostupnost hrane i održivost životne sredine (Tilman i sar., 2011; Hunter i sar., 2017).

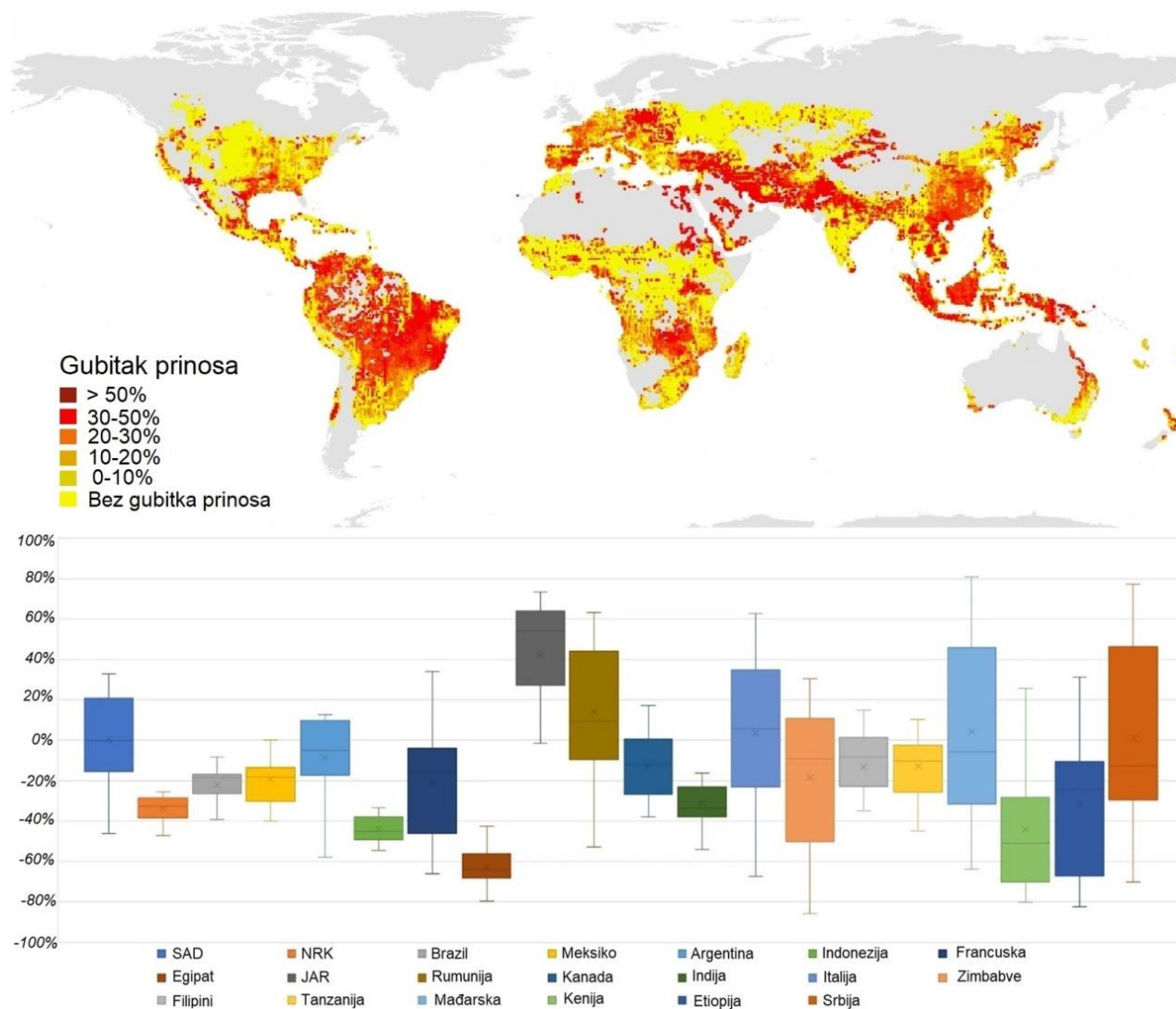
### **1.1.2. Uticaj klimatskih promena na proizvodnju kukuruza**

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jedan od najznačajnijih useva, sa širokim spektrom primena – stočna ishrana, ljudska ishrana, industrijska primena (biogorivo, bioplastika). Zbog toga, kukuruz je jedan od najzastupljenijih i najšire kultivisanih useva na svetu. Prema podacima koje je objavila Organizacija za hranu i poljoprivredu (*Food and Agriculture Organization*, FAO; <http://www.fao.org/faostat/en>), u 2023. godini kukuruz je prema površini na kojoj je gajen (ha) i proizvodnji (t) bio drugi na svetu, odmah iza pšenice. Srbija je 2023. godine bila u prvih 40 zemalja na svetu prema površinama na kojima je gajen kukuruz, a u prvih 25 prema proizvodnji ovog useva. Kukuruz je najznačajniji usev u Srbiji – u 2023. je gajen na 920 hiljada hektara obradive površine, dok je proizvedeno preko 6,6 miliona tona ovog useva.

Kao i kod drugih useva, klimatske promene imaju značajan negativan efekat na prinos i proizvodnju kukuruza, a predviđeno je da će se taj efekat u narednim godinama pogoršati. Takođe, kukuruz gajen u umerenim klimatskim oblastima dostiže faze cvetanja i nalivanja zrna, koje su najosetljivije na visoke temperature i sušu (Deryng i sar., 2014) u doba godine kada se navedeni klimatski ekstremi dešavaju. U proseku, za kukuruz se predviđa gubitak prinosa od 7,4% za svaki porast temperature od 1°C (Zhao i sar., 2017). Prema SALUS modelu na srednjem zapadu SAD, prinos kukuruza će opasti za 5-22% (Liu i Basso, 2020). Neke studije su predvidele još veće vrednosti: do 23% u Sjedinjenim Državama (Xu i sar., 2016) ili 30% u Meksiku (Murray-Tortarolo i sar., 2018). Predviđeno je da će do kraja veka na površinama na kojima se proizvodi preko 50% kukuruza doći do značajnih gubitaka prinosa (Pugh i sar., 2016; Zhao i sar., 2017). Projekcije gubitka prinosa kukuruza, dobijene simulacijom porasta temperature za 2°C, primenom pet klimatskih modela prema Li i sar. (2022b) su prikazane na Slici 1.3.

S obzirom na to da je kukuruz jedan od najvažnijih useva na svetu i da je prinos pod velikim negativnim uticajem klimatskih promena, adaptacija kukuruza na klimatske promene, uz

očuvanje stabilnog prinosa koji bi obezbedio dostupnost hrani, je od izuzetnog značaja (Faroq i sar., 2023).



**Slika 1.3** Projekcije gubitka prinosa kukuruza, dobijene simulacijom porasta temperature za 2°C, primenom pet klimatskih modela prema Li i sar. (2022b). Na gornjoj slici je prikazan geografski raspored gubitka prinosa, dok je na donjoj prikazan gubitak prinosa po državama. Preuzeto i modifikovano iz Li i sar., (2022b).

### **1.1.3. Strategije ublažavanja uticaja klimatskih promena u poljoprivredi**

Klimatske promene su već izazvale značajne izmene u poljoprivrednoj proizvodnji i prinosu i čak i kada bi danas došlo do ogromnih redukcija u emisiji gasova staklene bašte, one ne bi bile anulirane (IPCC, 2019). Da bi se obezbedilo unapređenje poljoprivredne produktivnosti i povećanje prinosa, neophodno je uvođenje određenih strategija u poljoprivrednu proizvodnju koje bi ublažile negativan uticaj faktora klimatskih promena. Glavne metode za postizanje navedenog cilja se mogu klasifikovati u tehnologije očuvanja resursa, tehnologije unapređenja useva i socio-ekonomske intervencije, odnosno donošenje uredbi i zakona (Venkateswarlu i Shanker, 2009).

Tehnologije očuvanja resursa (eng. *conservation agriculture*) su tehnologije fokusirane na smanjenje negativnih uticaja poljoprivrede na klimatske promene, bez smanjenja prinosa i prihoda. Cilj ovih strategija je sprečavanje gubitka plodnosti zemljišta i regeneracija već degradiranih obradivih površina, uglavnom kroz upotrebu pokrovnih useva i malčiranje,

redukovanu obradu zemljišta i diverzifikaciju gajenih biljnih vrsta. Ovoj grupi strategija pripada i precizna poljoprivreda, odnosno specifično upravljanje usevima optimizovano tako da se smanji navodnjavanje i korišćenje veštačkih đubriva bez smanjenja profitabilnosti (Shafi i sar., 2019). Tehnologije očuvanja resursa su od izuzetne važnosti jer dovode do smanjenja emisije gasova staklene bašte, smanjene upotrebe đubriva i veće sekvestracije ugljenika u zemljištu (Pisante i sar., 2014).

Druga klasa strategija ublažavanja uticaja klimatskih promena jeste unapređenje useva i tehnologije njihove proizvodnje (eng. *cropping systems*), čiji je fokus više usmeren ka povećanju poljoprivredne proizvodnje i osiguravanju dostupnosti dovoljne količine hrane. Sa stalnim i brzim promenama u klimatskim uslovima, očekuju se i promene u optimalnim lokacijama za gajenje različitih vrsta useva (Pathak i sar., 2018), što iziskuje brzu adaptaciju upravljanja usevima i poljoprivredne proizvodnje. Jedan od načina jeste zamena useva, odnosno gajenje novih vrsta tolerantnih na uslove životne sredine na datoj lokaciji. Druga bitna strategija obuhvata oplemenjivanje i selekciju novih sorti vrsta koji se već gaje na tim područjima, sposobnih za uspešno preživljavanje nadolazećih negativnih faktora klimatskih promena – suše, toplotnih talasa, oluja (Anderson i sar., 2020). Ovaj proces zahteva selekciju germplazme, skraćivanje ciklusa oplemenjivanja i ispitivanja podobnosti sorti za ciljno okruženje na velikom broju lokacija (Chhogyel i sar., 2016; Atlin i sar., 2017). Genomika i druge genomske tehnologije su već integrisane u strategije oplemenjivanja useva za tolerantnost na abiotički stres izazvan klimatskim promenama, ali je napredak spor. Ubrzanje ciklusa oplemenjivanja zahteva značajne investicije u genomske i fenotipske resurse radi određivanja genetičke osnove osobina bitnih za poljoprivrednu proizvodnju (Anderson i sar., 2020). Nove tehnologije, poput genskog, odnosno genomskog editovanja (eng. *gene/genome editing*), mogu pomoći u ciljanoj produkciji unapređenih sorti, ali je efikasna upotreba ovih alata ograničena problemima poput protivljenja javnog mnjenja i nedonošenja zakona koji bi uredili njihovo korišćenje (Scheben i Edwards, 2018).

Bitno je napomenuti da oplemenjivanje i selekcija novih sorti useva tolerantnih na negativne faktore klimatskih promena, ne mora podrazumevati samo tolerantnost na sušu i visoke temperature (Benitez-Alfonso i sar., 2023). Strategije unapređenja useva obuhvataju i strategije izbegavanja direktnih posledica klimatskih promena. Navedenim strategijama pripadaju rana setva, gajenje prolećnih sorti kasnijih grupa zrenja ili usvajanje zimskih kultivara (Liu i sar., 2017; Collins i Chenu, 2021; Zhu i sar., 2022). Kada je reč o selekciji i oplemenjivanju kukuruza, rana setva se izdvaja kao važna i perspektivna strategija izbegavanja direktnog uticaja visokih temperatura i vodnog deficita, nastalih kao posledica klimatskih promena. Veći broj istraživanja je pokazao da ona može imati pozitivan uticaj na prinos, ukoliko se primenjuje uz odgovarajuće agrotehničke mere (Bassu i sar., 2021; Zhu i sar., 2022). U umerenim klimatskim oblastima, rana setva može osigurati uspešno završavanje faze cvetanja i nalivanja zrna pre perioda suša i ekstremnih temperatura tokom leta. Razviće kukuruza je znatno otežano i usporeno na temperaturama nižim od 15°C (Silva-Neta i sar., 2015), a rana setva podrazumeva izlaganje biljaka kukuruza niskim temperaturama (NT) u ranim fazama razvića, odnosno u fazi nicanja, VE (eng. *emergence stage*). VE faza je termosenzitivna i niske temperature tokom ove faze mogu izazvati gubitak prinosa (Jiang i sar., 2021; Beegum i sar., 2023). S druge strane, tokom leta biljke kukuruza su izložene kombinovanom efektu vodnog deficita i visokih temperatura, koji zajedno uzrokuju veće redukcije u prinosu od njihovog pojedinačnog delovanja (Zandalinas i sar., 2018; Hussain i sar., 2019). Proučavanje efekta i odgovora na jedan faktor stresa, odnosno niske temperature, je manje kompleksno od proučavanja odgovora na kombinovano delovanje vodnog deficita i visokih temperatura.

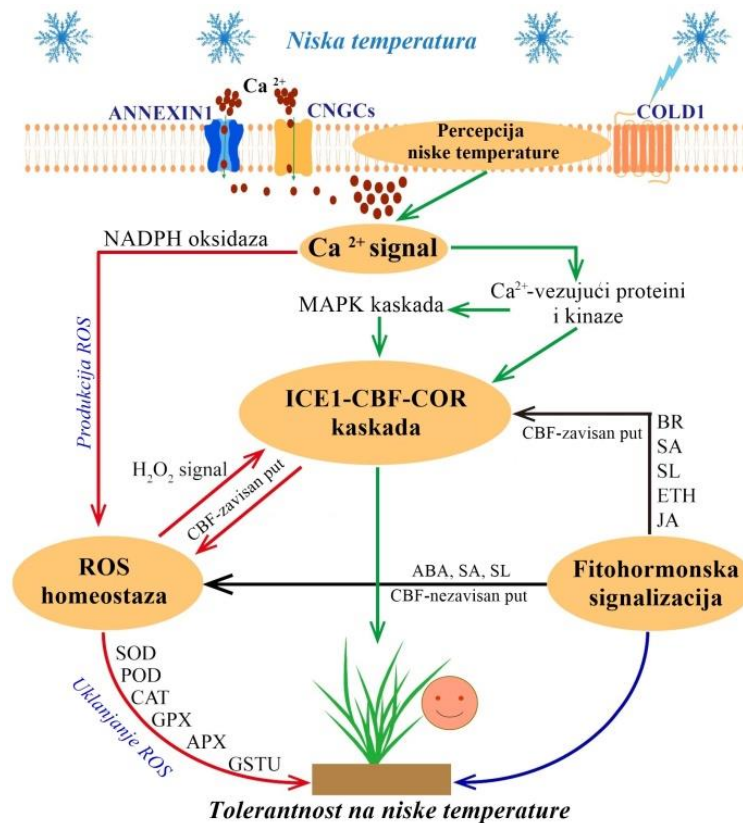
## **1.2. Stres izazvan niskim temperaturama i odgovor kukuruza**

Biljke su tokom celog životnog ciklusa izložene dejstvu brojnih faktora spoljašnje sredine koji utiču na njihovo rastenje i razviće, distribuciju i produktivnost. Kada su efekti ovih faktora izvan granica optimuma za odvijanje fizioloških i metaboličkih procesa, oni se smatraju faktorima stresa ili stresorima (Stikić i Jovanović, 2012). Ukoliko su faktori stresa fizičko-hemijske prirode, označeni su kao abiotički faktori stresa i njima pripadaju temperatura (visoka i niska), voda (suša i poplava), radijacija kao i različiti hemijski agensi (soli, herbicidi, insekticidi). Negativni faktori životne sredine izazvani klimatskim promenama pripadaju abiotičkim faktorima stresa. S obzirom da su biljke sesilni organizmi, abiotički faktori stresa su često presudni faktori sa izuzetno štetnim posledicama na njihovo rastenje i razviće koje su označene kao abiotički stres. Molekularni mehanizmi odgovora biljke na navedene faktore su kompleksni, odvijaju se na različitim nivoima i obuhvataju raznovrsne procese, koji zajedno rezultuju prepoznavanjem faktora stresa, signalnom transdukcijom, transkripcijom, translacijom i proteinskim modifikacijama (Zhang i sar., 2023). Takođe, primarni abiotički faktori stresa, poput ekstremnih temperatura ili suše, mogu dovesti i do pojave sekundarne vrste stresa kod biljaka – osmotski i oksidativni stres (Zhang i sar., 2023). Abiotički faktori stresa kod biljaka pored direktnih posledica na biljku, kao što su pogrešna konformacija proteina ili disrupcija strukture ćelijskog zida, mogu indukovati i promene koje vode ka aklimatizaciji i povećanoj tolerantnosti na abiotički stres (Radha i sar., 2023).

Dobro poznavanje odgovora na abiotičke faktore stresa je neophodno za razvoj strategija ublažavanja negativnih efekata koje uzrokuju klimatske promene. Mehanizmi odgovora na abiotičke faktore stresa i dalje nisu u potpunosti definisani, iako je identifikovan veliki broj gena koji učestvuju u ovom procesu (Radha i sar., 2023). Takođe, primena stečenog znanja u oplemenjivanju i proizvodnji useva poboljšane tolerantnosti se pokazala kao veliki izazov (Zhang i sar., 2023). Navedeni proces je dodatno otežan činjenicom da se rastenje i razviće često nalaze u negativnoj korelaciji sa tolerantnošću na stres – tokom perioda stresa, energija i resursi su usmereni na aklimatizaciju i preživljavanje, što često ograničava rastenje (Zhang i sar., 2023). S obzirom da je rana setva jedna od glavnih strategija osiguravanja visokog prinosa i produktivnosti kukuruza u uslovima klimatskih promena, dobro poznavanje odgovora ove biljne vrste na niske temperature je od ogromnog značaja.

Stres izazvan niskim temperaturama je karakterističan za predele umerene klime, odnosno prostore gde postoje izražena godišnja doba i sezonske razlike u temperaturi. Niska temperatura može izazvati stres hladnoće (niske temperature iznad 0°C) i stres mraza (niske temperature ispod 0°C) (Stikić i Jovanović, 2012). Efekat stresa niskih temperatura zavisi od više faktora – od biljne vrste, vegetativne faze, intenziteta i trajanja stresa i interakcije sa drugim faktorima stresa. Niske temperature značajno utiču na rastenje, razviće, prinos i geografsku distribuciju biljaka (Guan i sar., 2023). Svoj efekat niske temperature prvo ostvaruju na ćelijskim membranama (plazma membrana i membrane organela), povećavajući njihovu permeabilnost i smanjujući fluidnost, što dalje dovodi do poremećaja u membranskom transportu, procesu fotosinteze i osmotskom potencijalu. Uzrokuju i formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species, ROS*), a mogu dovesti i do ćelijske smrti (Qian i sar., 2024). Takođe, ukoliko je stres dovoljno velikog intenziteta i biljke su njemu izložene tokom dužeg perioda, može dovesti i do uvenuća. Kada je reč o proizvodnji useva, niske temperature inhibiraju vigor semena, stopu klijanja, usporavaju rastenje useva i dovode do redukcije u prinosu i kvalitetu (Xu i sar., 2022a). Ipak, kroz dugotrajnu evoluciju biljke su razvile određene mehanizme kojima razvijaju tolerantnost na ovaj faktor stresa putem postepenog izlaganja niskim temperaturama

iznad 0°C – proces aklimatizacije (Qi i sar., 2022). Aklimatizacija je proces koji obuhvata percepciju i transdukciju signala niskih temperatura, ekspresiju gena tolerantnosti na hladnoću (eng. *cold tolerance genes*) i specifične metaboličke i fiziološke promene (Qian i sar., 2024). Pregled mehanizama odgovora biljaka na niske temperature je prikazan na Slici 1.4.



Slika 1.4 Pregled mehanizama odgovora biljaka na niske temperature i uspostavljanje tolerantnosti. Preuzeto i modifikovano iz Qian i sar., (2024).

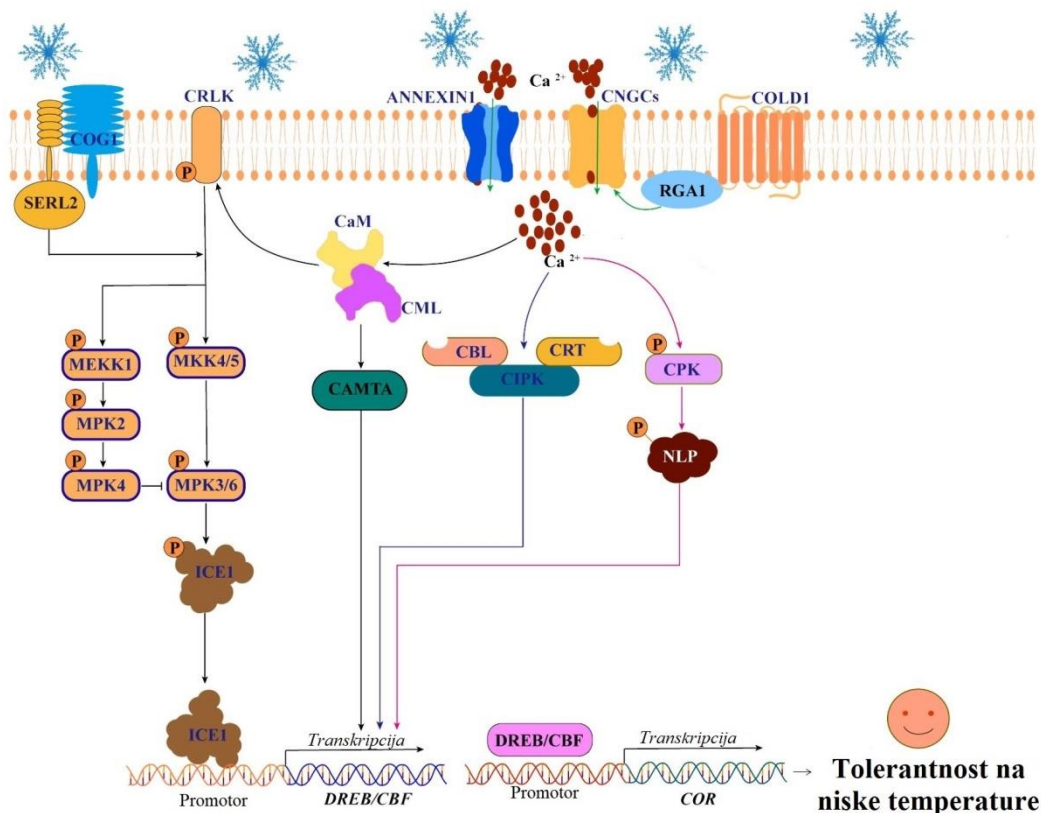
### 1.2.1. Percepcija i transdukcija signala niskih temperatura

Termoreceptori na plazmamembrani, među kojima su COL1 (eng. *chilling-tolerance divergence 1*) kod *Arabidopsis thaliana* (Ma i sar., 2015b) i COG1-OsSERL2 kompleks (eng. *chilling tolerance in Gengdao 1 - somatic embryogenesis receptor-like kinase 2*) kod pirinča (Xia i sar., 2023) registruju snižavanje temperature u životnoj sredini biljke i iniciraju influks jona kalcijuma ( $Ca^{2+}$ ). Takođe, novija istraživanja ukazuju da niske temperature registruju još neki membranski proteini, poput CNGC (eng. *cyclic nucleotide-gated channels*), ANNEXIN1, MCA1 i 2 (eng. *mid1/2 complementing activity*) (Qian i sar., 2024). Pri optimalnim temperaturama aktivnost ovih  $Ca^{2+}$ -jonskih kanala je inhibirana i aktiviraju se tek nakon izlaganja biljaka suboptimalnim temperaturama. Stoga je razumevanje mehanizma njihove aktivacije presudno za razumevanje odgovora biljke na niske temperature. Ipak način njihove regulacije nije potvrđen. Novija istraživanja na pirinču ukazuju na mogućnost aktivacije navedenih jonskih kanala fosforilacijom specifičnog peptida u njima (PSY1R) pomoću protein kinaze OsSAPK8 (eng. *osmotic stress/ABA-activated protein kinase 8*) (Wang i sar., 2021a; Peng i sar., 2024).

Influks jona  $Ca^{2+}$  i povećavanje njihove koncentracije u citoplazmi aktivira signalne puteve tri  $Ca^{2+}$ -vezujuća proteina – CaM/CML (eng. *calmodulin/calmodulin-like protein*), CBL (eng. *calcineurin B-like protein*) i CDPK/CPK (eng. *calcium-dependent protein kinase*) (Qian i sar., 2024). Joni kalcijuma se prvo vezuju za CaM i CML, čime se inicira aktivacija CRLK1 (eng. *Ca<sup>2+</sup>/CaM-regulated receptor-like kinase 1*) i CAMTA (eng. *calmodulin-binding transcription activator*), kao i

kaskadna fosforilacija pomoću MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinases*). CRLK, CAMTA i MAPK signalna kaskada aktiviraju ICE1 (eng. *inducer of CBF expression 1*) i DREB/CBF (eng. *dehydration-responsive element binding/C-repeat binding factors*), TF neophodne za uspostavljanje tolerantnosti na niske temperature (Gusain i sar., 2023; Qian i sar., 2024). CBL, preko interakcija sa CIPK (eng. *CBL-interacting protein kinases*), takođe dovode do povećane ekspresije CBF i poboljšanja tolerantnosti na NT kod *Arabidopsis thaliana* (Huang i sar., 2011). Takođe, joni  $Ca^{2+}$  mogu indukovati ekspresiju CBF preko fosforilacije specifičnog NLP7 proteina pomoću CDPK/CPK (Ding i sar., 2022).

Aktivacija ICE1 i DREB/CBF rezultuje indukcijom ekspresije *COR* gena (eng. *cold responsive*) i uspostavljanje tolerantnosti na NT (Qian i sar., 2024). Kompletan signalni put percepcije niskih temperatura i aktivacije ICE1–CBF–COR regulona je prikazan na Slici 1.5.



Slika 1.5 Signalni put percepcije niskih temperatura i aktivacije ICE1–CBF–COR. Preuzeto i modifikovano iz Qian i sar., (2024).

### 1.2.2. Glavni mehanizam odgovora na niske temperature (ICE1–CBF–COR regulon)

$Ca^{2+}$ -signalne kaskade dovode do aktivacije ICE1–CBF–COR regulona (Gusain i sar., 2023) koji se smatra najvažnijim i evolutivno najočuvanijim signalnim putem odgovora na niske temperature (Qian i sar., 2024).

ICE1, bHLH (eng. *basic helix-loop-helix*) transkripcioni faktor, je centralni regulator ekspresije gena u odgovoru na NT (Wang i sar., 2023a). Kod *Arabidopsis thaliana* i pirinča učestvuje u aktivaciji CBF gena, vezujući se za njihove promotore, što dalje dovodi do indukcije *COR* gena i pozitivne regulacije odgovora na NT (Kim i sar., 2015; Verma i sar., 2020). CBF indukuju ekspresiju DREB faktora i zajedno sa njima su odgovorni za regulaciju ekspresije 10-20% *COR* gena kod *Arabidopsis thaliana* (Kosová i sar., 2021). Takođe, ICE1 se može direktno vezati za promotore *COR* gena i regulisati njihovu ekspresiju i na taj način (Tang i sar., 2020).

Kompleksnost mehanizama odgovornih za uspostavljanje odgovora i tolerantnosti na niske temperature dodatno potvrđuje činjenica da osim od strane NT i  $Ca^{2+}$ , ICE1-CBF-COR regulon je dodatno regulisan i velikim brojem transkripcionih faktora, post-translacionim modifikacijama (PTM), svetlosnim signalima i faktorima cirkadijalnog ritma (Qian i sar., 2024). Regulon ICE1-CBF-COR je regulisan od strane više klasa TF i proteina – Myb, NAC (eng. *no apical meristem* – *NAM*, *Arabidopsis transcription activation factor* – *ATAF*, *cup-shaped cotyledon* – *CUC*), WRKY, bZIP (eng. *basic leucine zipper*), tireodoksina. Na primer, NAC1, tioredoksin h2 (Trx-H2) i BTF3L (eng. *BTF3-like protein*) su poznati regulatori ICE1-CBF-COR (Qian i sar., 2024). Faktori svetlosne signalizacije, PIF (eng. *phytochrome interacting factors*), uz pomoć fitohroma B, funkcionišu kao negativni regulatori *CBF*, i svojim vezivanjem za ove gene smanjuju njihovu ekspresiju (Jiang i sar., 2020). REVEILLE4 (RVE4), REVEILLE8 (RVE8), CCA1 (eng. *circadian clock associated 1*) i LHY (eng. *late elongated hypocotyl*) su proteini neophodni za održavanje cirkadijalnog ritma koji takođe učestvuju u regulaciji navedenog regulona (Kidokoro i sar., 2023; Kim i sar., 2024). RVE4 i RVE8 tokom tretmana niskim temperaturama imaju ulogu u aktivaciji DREB1 transkripcionih faktora, dok CCA1 i LHY inhibiraju ekspresiju DREB1 u optimalnim uslovima (Qian i sar., 2024). Post-translacione modifikacije poput fosforilacije, miristilacije i ubikvitinacije mogu uticati na strukturu, stabilnost, aktivnost i funkciju ICE1-CBF-COR faktora (Ding i sar., 2019b; Qian i sar., 2024). Na primer, OST1 (eng. *open stomata 1*) vrši fosforilaciju ICE1 radi povećanja njegove stabilnosti, dok fosforilacija pomoću BIN2 (eng. *brassinosteroid insensitive 2*) promoviše njegovu degradaciju. Odnos navedena dva procesa je važan za balansiranje rastenja biljke i odgovora na stres (Ye i sar., 2019). Takođe, HOS1 (eng. *high expression of osmotically responsive gene 1*), E3 ubikvitin ligaza, promoviše degradaciju ICE1, ali je taj proces sprečen od strane OST1 na niskim temperaturama (Qian i sar., 2024).

Za odgovor biljke na stres izazvan niskim temperaturama odgovorni su *COR* geni, kojima pripadaju različite grupe gena čija je ekspresija indukovana NT. *COR* geni uključuju gene koji kodiraju enzime neophodne za sintezu osmotskih regulatora, krioprotektivnih proteina (prolin) i rastvorljivih šećera i šećernih alkohola. Takođe, njihova ekspresija je neophodna za uklanjanje ROS i povećanje membranske stabilnosti (Chen i sar., 2022). Uklanjanje ROS podrazumeva enzimске antioksidativne mehanizme kao što su katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD), askorbat peroksidaze (APX) i peroksidaze (POD) (Zhang i sar., 2020d; Ye i sar., 2024), kao i neenzimske, poput akumulacije askorbinske kiseline, glutationa (GSH), karotenoida i antocijanina (Qian i sar., 2024). U regulaciji akumulacije ROS učestvuju i joni  $Ca^{2+}$ . Istraživanja su pokazala da značajan deo ROS vodi poreklo od aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid (NADPH) oksidaze (Kawarazaki i sar., 2013). Aktivnost NADPH je regulisana od strane CDPK i CIPK (Kimura i sar., 2013), što potvrđuje ulogu jona kalcijuma u ovom procesu i homeostazi ROS. Bitno je naglasiti da iako je akumulacija ROS uglavnom vezana za oksidativna oštećenja, brojna istraživanja su pokazala da one imaju važnu ulogu i u signalnoj transdukciji abiotičkog stresa (You i Chan, 2015).

Među *COR* gene su uključeni i oni koji kodiraju razne šaperone i proteine nalik na šaperone, sa ulogom u sprečavanju pogrešnih konformacija i degradacije proteina u ćeliji – proteini toplotnog stresa, HSP (eng. *heat shock proteins*), dehidrini (DHN) i drugi LEA proteini (eng. *late embryogenesis abundant*) (Jahed i sar., 2023). Proteini toplotnog stresa su neophodni za pravilnu konformaciju i zaštitu od gubitka funkcije i degradacije nosivih proteina usled delovanja raznih tipova i abiotičkog i biotičkog stresa, a ne samo stresa visokih temperatura (ul Haq i sar., 2019). HSP su klasifikovani na osnovu molekulske mase u nekoliko grupa – mali HSP, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100 (Hu i sar., 2022a). Niske temperature dovode do povećane ekspresije *hsp* gena i akumulacije HSP kod velikog broja vrsta – *Arabidopsis thaliana* (Bae i sar.,

2003), duvana (Jin i sar., 2011) i pšenice (Vítámvás i sar., 2012). Dehidrini su podgrupa LEA proteina koja se akumulira kod biljaka tokom abiotičkog stresa, uključujući i niske temperature (Hwarari i sar., 2022). DHN učestvuju u zaštiti membrana od oštećenja uzrokovanih mrazom kroz interakciju sa membranskim lipidima ili kroz funkciju molekularnih šaperona (Wan i sar., 2014a). Na primer, kod *Arabidopsis thaliana*, dehidrin AtCOR15A se vezuje za membranske proteine i štiti ih od deformacije (Vazquez-Hernandez i sar., 2017). Kod pirinča, dehidrini poput OsDhn1, lip5, i lip9 učestvuju u regulaciji odgovora na niske temperature kroz interakciju sa CBF signalnim putem (Hwarari i sar., 2022).

Sve navedene promene u fiziološkim aktivnostima indukovane promenama u ekspresiji brojnih *COR* gena, omogućavaju održavanje ćelijske aktivnosti, zaštitu od oksidativnih oštećenja izazvanih ROS i održavanje stabilnosti biološki aktivnih ćelijskih membrana i proteinskih struktura (Ritonga i Chen, 2020). Iako su funkcije i regulatorni mehanizmi mnogih gena uključenih u uspostavljanje tolerantnosti identifikovani i razjašnjeni, neophodni su dodatni podaci i ispitivanja ne bi li se utvrdilo na koji način su pojedinačni geni integrisani u kompleksnu mrežu mehanizama uključenu u odgovor na niske temperature (Qian i sar., 2024).

### **1.2.3. Uloga fitohormona u regulaciji odgovora na niske temperature**

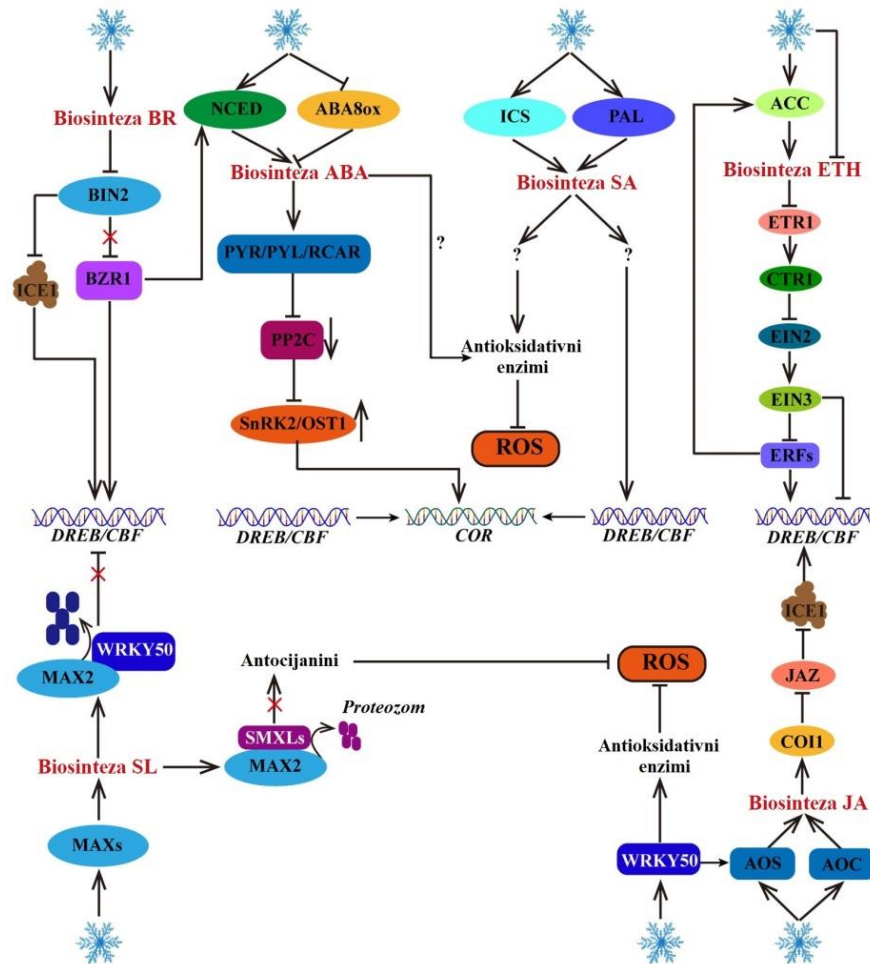
U regulaciji odgovora na niske temperature uglavnom preko modifikacija ICE1-CBF-COR regulona, značajnu ulogu imaju i biljni hormoni apscisinska kiselina (ABA), salicilna kiselina (SA), jasmonska kiselina (JA), strigolaktini (SL), brasinosteroidi (BR) i etilen (ETH). Mehanizmi regulacije ICE1-CBF-COR regulona od strane navedenih hormona su prikazani na Slici 1.6.

ABA je poznata kao glavni hormon stresa i mnoga istraživanja su potvrdila njen značaj u uspostavljanju odgovora na stres izazvan niskim temperaturama (Guo i sar., 2021b; Shen i sar., 2022). Ekspresija gena neophodnih za sintezu ovog hormona i njegova akumulacija su indukovane niskim temperaturama (Shen i sar., 2022), dok nanošenje egzogene ABA rezultuje povećanom tolerantnošću na NT i povećanom aktivnošću antioksidativnih enzima (Huang i sar., 2015; Li i sar., 2021b). Niske temperature indukuju ekspresiju biosintetskog gena ovog hormona (*NCED*) i redukuju degradaciju ABA kroz inhibiciju ekspresije gena *CYP707A* (Shen i sar., 2022). Sa druge strane, ABA učestvuje i u aktivaciji određenih *COR* gena kroz fosforilaciju SnRK2 (eng. *SNF1-related protein kinase 2*)/OST1 proteinskih kinaza (Lim i Lee, 2020).

Akumulacija brasinosteroida ima pozitivan efekat i na akumulaciju ABA – indukcija ekspresije gena važnih za sintezu i signalne puteve brasinosteroida, *DWARF* i *BZR1* (eng. *brassinazole resistant 1*) dovodi do povećane ekspresije gena biosintetskog puta ABA (An i sar., 2023). Gen uključen u signalne puteve brasinosteroida, *BZR1*, pozitivno utiče na tolerantnost na mraz kroz CBF-zavisan put – regulacijom CBF1/CBF2 i CBF-nezavisan put – inicijacijom ekspresije određenih *COR* gena (Li i sar., 2017). Takođe, niske temperature inhibiraju aktivnost BIN2, negativnog regulatora signalnog puta brasinosteroida (An i sar., 2023).

Stres niskih temperatura indukuje i akumulaciju SA. Mnoga istraživanja su pokazala da nanošenje egzogene SA rezultuje povećanom tolerantnošću na NT kroz unapređenje antioksidativnog odgovora i indukciju ekspresije *COR* gena (Wang i sar., 2020; Li i Wang, 2021). Isti efekat je dokazan i za jasmonsku kiselinu – nanošenje egzogene JA dovodi do povećane tolerantnosti na NT (Hu i sar., 2017; Wang i sar., 2023a). Niske temperature indukuju ekspresiju gena za alenoksid ciklazu (*MfAOC2*), enzima neophodnog za sintezu JA. Povećana akumulacija jasmonske kiseline u ćeliji dovodi i do povećane ekspresije *CBF* gena i tolerantnosti na NT kod *Medicago truncatula* (Yang i sar., 2023b). Takođe, u optimalnim temperaturnim uslovima, inhibitor JA signalnog puta JAZ (eng. *jasmonate zim-domain*) se vezuje za ICE1/2 i inhibira

njihovu ekspresiju. Međutim u uslovima NT, povećava se ekspresija COI1 (eng. *coronatine insensitive 1*) koji vrši degradaciju JAZ, čime se prekida inhibicija ICE1/2 i dolazi do inicijacije ekspresije *CBF* gena (Hu i sar., 2013).



**Slika 1.6** Mehanički odgovori na niske temperature i regulacija ICE1-CBF-COR puta od strane fitohormona. Fitohormoni koji učestvuju u regulaciji odgovora na niske temperature su apscisinska kiselina (ABA), salicilna kiselina (SA), jasmonska kiselina (JA), strigolaktini (SL), brasinosteroidi (BR) i etilen (ETH). Preuzeto i modifikovano iz Qian i sar., (2024).

Strigolaktini su fitohormoni koji učestvuju u regulaciji morfogeneze, ali je dokazano da u uslovima niskih temperatura dolazi do njihove povećane sinteze (Cooper i sar., 2018) preko povećane ekspresije *MAX* gena (eng. *more axillary growth*) (Chi i sar., 2021). Wang i sar. (2023d) su pokazali da povećana ekspresija *MAX2* gena i akumulacija strigolaktina tokom perioda mraza dovode do degradacije WRKY41 faktora, čime se uklanja njihov inhibicioni efekat na ekspresiju *CBF* gena. Takođe, *MAX2* transkripcijski faktor inicira degradaciju *SMXL* (eng. *suppressor of max2-like*) stimulišući akumulaciju antocijana kod *Arabidopsis thaliana*.

Uloga etilena u odgovoru na stres niskih temperatura je pokazana kod više biljnih vrsta. Na primer, kod paradajza transkripcijski faktor *SINAM3*, indukovani niskim temperaturama, inicira ekspresiju nekoliko gena neophodnih za sintezu etilena, čime se započinje njegova akumulacija i povećava tolerancija na NT. To su *SIACS1*, gen za sintazu ACC (1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina) i *SIACO*, gen za oksidazu ACC (Dong i sar., 2022). Kod *Arabidopsis thaliana* je pokazano suprotno – za toleranciju na niske temperature je neophodan snižen nivo etilena, što se postiže preko inhibicije njegove sinteze negativnom regulacijom *ETR*-*CTR1*-*EIN2*-*EIN3* (eng. *ACS-ethylene-ethylene receptor (ETR)-constitutive triple response 1 (CTR1)-ethylene insensitive 2 (EIN2)-EIN3*) biosintetskog puta (Shi i sar., 2012). Kod navedene vrste, samo

izlaganje niskim temperaturama inhibira biosintezu etilena i dovodi do inhibicije njegovog signalnog puta, čime se povećava ekspresija *CBF* gena (Shi i sar., 2012). Ipak, na osnovu nekih novijih istraživanja, može se zaključiti da nije neophodna samo inhibicija etilenske biosinteze za uspostavljanje tolerantnosti, već je neophodno da se nivo etilena održava na tačno određenom nivou (Catalá i sar., 2014).

#### **1.2.4. Uloga nekodirajućih RNK u regulaciji odgovora na niske temperature**

Važan aspekt odgovora na bilo koji faktor stresa kod biljaka, uključujući i niske temperature, a koji se intenzivno proučava poslednjih nekoliko godina kod velikog broja useva, jeste njegova regulacija nekodirajućim RNK (eng. *non-coding RNA*, ncRNK). Nekodirajuće RNK, kojima pripadaju male RNK (eng. *small RNA*, sRNK), i to pre svega mikroRNK (miRNK), kao i duge nekodirajuće RNK (eng. *long non-coding RNA*, lncRNK) i cirkularne RNK (eng. *circular RNA*, circRNK) su uključene u regulaciju genske ekspresije velikog broja biljnih vrsti (Yu i sar., 2019b).

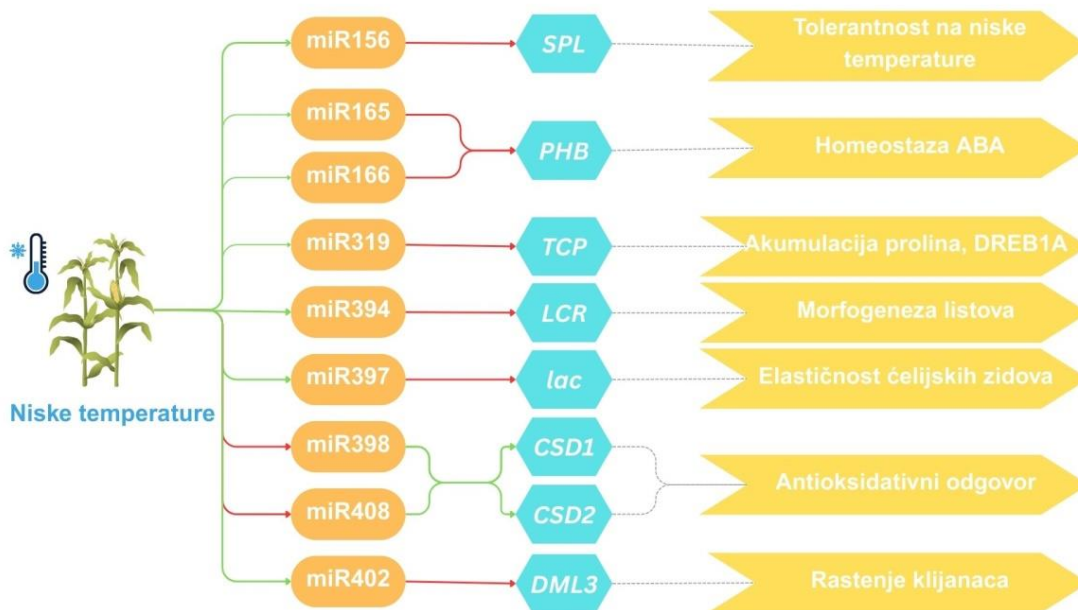
##### ***1.2.4.1. Uloga miRNK u regulaciji odgovora na niske temperature***

mikroRNK su klasa sRNK dužine 18-30 nt koji regulišu ekspresiju gena kroz odsecanje i translacionu inhibiciju ciljnih, informacionih RNK (iRNK) (Zhang i sar., 2022). *MIR* geni kodiraju mikroRNK i njihovom transkripcijom se sintetišu jednolančani transkripti, koji se transformišu u miRNK/miRNK\* dvolančane molekule. miRNK/miRNK\* su potom obrađene od strane DCL1 enzima (eng. *DICER-LIKE 1*) čime nastaju prekursorske miRNK (pre-miRNK). Dalje se pre-miRNK vezuju za AGO protein (eng. *argonaut*), miRNK\* lanac se odbacuje i miRNK-AGO kompleks se transportuje u citoplazmu gde učestvuje u post-transkripcionom utišavanju gena (Huo i sar., 2022). mikroRNK učestvuju u kontroli kompleksnih regulatornih mreža koje su neophodne za odvijanje širokog opsega bioloških procesa. Pokazano je da su miRNK kritični regulatori procesa razvića i odgovora na različite faktore stresa (Millar, 2020). S obzirom da svoju regulaciju vrše kroz interakciju sa većim brojem gena u isto vreme, miRNK se smatraju obećavajućom strategijom za poboljšanje kompleksnih, multigenskih osobina, uključujući prinos, biomasu i tolerantnost na stres (Sun, 2012). Mogućnost primene različitih funkcija miRNK radi postizanja poželjnih agronomskih osobina kod važnih vrsta useva, posebno tolerantnost na abiotičke faktore stresa, su naglasili i Zhang i sar. (2022).

Uloga miRNK u regulaciji odgovora na niske temperature je dokazana kod velikog broja biljnih vrsta i opisani su određeni putevi miRNK-posredovane modulacije ekspresije ključnih gena (Megha i sar., 2018). Istraživanja su prvo rađena na model vrsti *Arabidopsis thaliana* (Sunkar i Zhu, 2004; Liu i sar., 2008), a zatim i na brojnim vrstama useva – pirinač, pšenica, šećerna trska, paradajz, soja (Huo i sar., 2022). Bitno je naglasiti da su obrasci ekspresije miRNK značajno zavisili od biljne vrste. Na primer, ekspresija mir397 je bila indukovana niskim temperaturama kod *Arabidopsis thaliana*, a inhibirana kod vinove loze (Sunkar i Zhu, 2004; Sun i sar., 2015). Takođe veliki uticaj imaju i metoda detekcije miRNK, vegetativna faza, tkivo, temperatura i dužina perioda izlaganja stresu. S obzirom na prostornu i vremensku varijabilnost ekspresije miRNK uključenih u odgovor na niske temperature, neophodna su dodatna istraživanja pre primene znanja o aktivnostima miRNK u poboljšanju osobina useva. mikroRNK sa potvrđenim ulogama u odgovoru na niske temperature su miR156, miR165, miR166, miR319, miR394, miR398, miR397, miR402 i miR408 (Megha i sar., 2018; Huo i sar., 2022). Navedene miRNK, način njihove regulacije od strane niskih temperatura i njihovi ciljni geni su prikazani na Slici 1.7.

Jedna od prvootkrivenih familija miRNK uključenih u odgovor na niske temperature je miR397 (Sunkar i Zhu, 2004). Biljke *Arabidopsis thaliana* sa overekspimiranim miR397a

pokazuju veću tolerantnost na niske temperature, uz razvijenu otpornost na smrzavanje (Dong i Pei, 2014). Autori su opisani fenomen povezali sa povećanom ekspresijom *CBF2*, koja je indukovala i povećanu ekspresiju brojnih *COR* gena. Takođe, među ciljnim genima miR397 su pronađeni i geni koji kodiraju lakaze (*lac*), koje mogu redukovati akumulaciju lignina u ćelijskim zidovima. Navedeni rezultati pokazuju da miR397 potencijalno vrše svoju funkciju i preko modulacije elastičnosti ćelijskih zidova. *lac* geni su ciljni geni i miRNK iz familije miR408, i overekspresija navedenih miRNK takođe ima pozitivan uticaj na tolerantnost na niske temperature (Ma i sar., 2015a). miR408 zajedno sa miR398, učestvuju i u regulaciji antioksidativnog odgovora u biljkama – regulišu ekspresiju gena koji kodiraju Cu/Zn superoksid dismutazu 1 i 2 (*CSD1* i *CSD2*) za koje je dokazano da pozitivno utiču na tolerantnost na NT (Megha i sar., 2018; Huo i sar., 2022). Overekspresija miR402 kod *Arabidopsis thaliana* ubrzava germinaciju semena i promovise rastenje klijanaca u uslovima niskih temperatura preko regulacije *DML3* gena (eng. *DEMETER-LIKE PROTEIN 3*) koji učestvuje u metilaciji DNK (Tiwari i sar., 2020). Navedeno pokazuje da miRNK učestvuju i u regulaciji epigenetičkih promena tokom odgovora na niske temperature. miR394 su evolutivno veoma očuvane miRNK prisutne i kod monokotila i dikotila, i njihova uloga u odgovoru na stres niskim temperaturama je potvrđena kod *Arabidopsis thaliana* (Song i sar., 2012). Neki od ciljnih gena ovih miRNK su *LCR* (eng. *LEAF CURLING RESPONSIVENESS*), sa važnom ulogom u morfogenezi listova. Povećana ekspresija miR394a i miR394b kod *Arabidopsis thaliana* je rezultovala i poboljšanom tolerantnošću na mraz, ukazujući da su ove miRNK pozitivni regulatori odgovora na niske temperature (Song i sar., 2016).



**Slika 1.7** Mehanizmi regulacije odgovora na niske temperature od strane miRNK. mikroRNK sa potvrđenim ulogama u odgovoru na niske temperature su prikazane narandžastom bojom, njihovi ciljni geni tirkiznom i proces na koji utiču žutom. Ukoliko niske temperature dovode do smanjene ekspresije miRNK to je prikazano crvenom strelicom, a suprotno zelenom. Istim principom je obeležen i uticaj miRNK na ekspresiju ciljnih gena.

miR165/166 se ponašaju kao negativni regulatori odgovora na abiotički stres kod *Arabidopsis thaliana* preko regulacije ekspresije *PHB* gena (eng. *PHBULOSA*) i homeostaze ABA u ćeliji (Yan i sar., 2016). miR156 su ključni regulatori ekspresije gena koji kodiraju *SPL* proteine (eng. *squamosa promoter-binding (SPB) like proteins*), neophodne za uspostavljanje tolerantnosti na niske temperature kod više vrsta. Overekspresija OsmiR156 rezultuje povećanom tolerantnošću na niske temperature i kod transgenih biljaka *Arabidopsis thaliana* i pirinča, kroz

utišavanje *SPL3* gena i inhibicije WRKY71, čime se prekida inhibicija ekspresije OsMYB2 i OsMYB3R-2, neophodnih za odgovor na NT i ekspresiju *COR* gena (Zhou i Tang, 2019). miR319 pozitivno regulišu odgovor na NT utišavanjem ekspresije dva *TCP* (eng. *teosinte branched1/cycloidea/proliferating cell factor (PCF)*) gena – *PCF6* i *TCP21*. Inhibicija ekspresije *PCF6* i *TCP21* dovodi do povećanog nivoa prolina, redukcije u nivou ROS i ekspresije *DREB1A* (Wang i sar., 2014c).

Na osnovu svega navedenog, miRNK sa pozitivnom ulogom u regulaciji odgovora na niske temperature svoju funkciju vrše kroz inhibiciju ekspresije negativnih regulatornih gena tolerantnosti na NT. Takođe, većina miRNK svoju regulaciju vrši na većem broju ciljnih gena, što ukazuje na kompleksnost regulacije signalne transdukcije u odgovoru na stres niskih temperatura.

#### **1.2.4.2. Uloga lncRNK u regulaciji odgovora na niske temperature**

Duge, nekodirajuće RNK predstavljaju linearne ncRNK, duže od 200 nt (Waseem i sar., 2021). Slično iRNK, većina lncRNK je transkribovana sa 5' kraja RNK polimerazom II, nakon čega se dodaje 5'-kapa i vrši 3'-poliadenilacija. Sličnosti koje dele sa iRNK su i post-transkripciona obrada, karakteristike promotora i formacija RNK strukture. Za razliku od iRNK, lncRNK su kraće i odlikuju se nedostatkom ORF motiva (eng. *open reading frame*). Takođe se odlikuju nižim nivoima ekspresije i većom varijabilnošću u nivou ekspresije (Huo i sar., 2022). Mnoge lncRNK pokazuju spacio-temporalnu, tkivnu i ćelijsku specifičnost, a odlikuju se i niskom stopom evolutivne konzervisanosti među vrstama (Nejat i Mantri, 2018).

Klasa lncRNK svoju funkciju u regulaciji genske ekspresije vrši posredstvom više mehanizama. Duge nekodirajuće RNK mogu biti prekursori za sintezu miRNK ili siRNK, a takođe se mogu vezivati za druge biomolekule i na taj način vršiti svoju funkciju – epigenetske modifikacije, regulacija splajsovanja, interakcije sa drugim klasama RNK (Wang i sar., 2023c; Gonzales i sar., 2024). Ipak, jedan od najbolje proučenih mehanizama jeste regulacija aktivnosti miRNK opisana kroz ceRNA (eng. *competing endogenous RNA*) hipotezu (Salmena i sar., 2011; He i sar., 2020b). Kao što je navedeno, miRNK su poznati inhibitori ekspresije gena koji funkcionišu kroz post-transkripciono utišavanje gena, odnosno ciljnih iRNK. Prema ceRNA hipotezi, lncRNK mogu uticati na utišavanje RNK preko vezujućih mesta za miRNK koje dele sa ciljnim iRNK. Ovom kompeticijom za vezivanje miRNK sa ciljnim iRNK, lncRNK mogu smanjiti nivo inhibicije ciljnih iRNK i na taj način izvršiti svoj uticaj na transkripciju.

Uloga lncRNK u odgovoru na abiotički stres je uglavnom proučavana u istraživanjima sa fokusom na sušu i povećan nivo soli u zemljištu (Wang i sar., 2023c), dok su istraživanja njihove uloge u odgovoru na niske temperature zastupljena u manjoj meri. Ipak, uloga lncRNK u odgovoru na niske temperature je proučavana kod *Arabidopsis thaliana* (Tiwari i sar., 2020; Liu i sar., 2022a), pirinča (Yuan i sar., 2018; Leng i sar., 2020), pšenice (Lu i sar., 2020b) i *Medicago sativa* (Cui i sar., 2019). Jedna od najbolje okarakterisanih lncRNK koje učestvuju u odgovoru na niske temperature je CIL1, identifikovana kod *Arabidopsis thaliana* (Liu i sar., 2022a). Calixto i sar. (2019) su pokazali da se kod iste vrste preko 100 različitih lncRNK odlikuje diferencijalnom ekspresijom između kontrole i tretmana niskim temperaturama. Kindgren i sar. (2018) su dokazali da specifična lncRNK, označena kao SVALKA, učestvuje u regulaciji *CBF1* gena u uslovima stresa niskih temperatura kod *Arabidopsis thaliana*. Oni su pokazali da se SVALKA transkribuje sa intergenskog regiona između *CBF3* i *CBF1* gena. Transkripcijom tog regiona nastaje „antisens“ *CBF1* lncRNK (as $CBF1$ ) i njenom obradom od strane HEN2 nukleozoma (eng. *HUA enhancer 2*) nastaje SVALKA. Takođe je pokazano da transkripcija i *CBF1* i SVALKA izaziva

koliziju RNK polimeraza II iz suprotnih pravaca, čime se ograničava transkripciona efikasnost CBF1.

#### **1.2.4.3. Uloga circRNK u regulaciji odgovora na niske temperature**

Cirkularne RNK (circRNK) su endogeni, jednolančani i kovalentno-zatvoreni RNK molekuli, sintetisani specifičnim spajanjem reverzne orijentacije (eng. *back-splicing*) od iRNK tokom post-transkripcione obrade (Han i sar., 2020b). Za razliku od životinja, sinteza biljnih circRNK zavisi od nekanonskih (eng. *noncanonical*), odnosno ne-GT/AG signala spajanja (eng. *splicing signals*) (Yu i sar., 2019b). Funkcije ovih molekula su malo poznate, ali istraživanja su pokazala da slično lncRNK i circRNK mogu funkcionisati kao miRNK „sunderi“ (eng. *miRNA sponges*) (Hansen i sar., 2013), interagovati sa proteinima i transkripcionim faktorima (Li i sar., 2015a), uticati na genomsku strukturu (Dong i sar., 2016) i voditi proteinsku translaciju (Yang i sar., 2017a). Cirkularne RNK se eksprimiraju na tkivno-specifičan način kod različitih biljnih vrsta i pokazuju mnogo viši nivo evolutivne konzervisanosti od lncRNK, mada su prisutne u još manjim količinama od njih (Yu i sar., 2019b).

Cirkularne RNK su klasa ncRNK koja je najmanje proučavana. Ipak, identifikovane su kod velikog broja biljnih vrsta, uključujući *Arabidopsis thaliana* (Ye i sar. 2015; Pan i sar. 2018), pirinač (Zhou i sar., 2021), pšenicu (Han i sar., 2021) i paradajz (Tan i sar., 2017). Takođe postoji mali broj funkcionalnih istraživanja biljnih circRNK. Potpuna funkcionalna karakterizacija postoji za jednu circRNK – *SEP3* (eng. *SEPALLATA 3*) egzon 6 circRNK kod *Arabidopsis thaliana*, koja je negativni regulator roditeljskog gena *SEP3* (Conn i sar. 2017). Navedena circRNK se vezuje za roditeljski DNK lokus i formira R-petlju koja onemogućava transkripciju navedenog egzona, čime se povećava nivo transkripata *SEP3* bez egzona 6, koji utiču na cvetne homeotične fenotipove. Takođe, Gao i sar., (2019b) su pokazali da overekspresija specifične circRNK iz vinove loze, *VvcircATS1*, poreklom od gena za glicerol-3-P aciltransferazu, rezultuje poboljšanom tolerantnošću na NT kod *Arabidopsis thaliana*. Osim navedenih primera, većina istraživanja circRNK je zasnovana na razlici u njihovoj ekspresiji između kontrastnih uslova, dok njihova tačna funkcija i regulatorni mehanizmi u kojima učestvuju nisu poznati (Yu i sar., 2019b). Takva istraživanja, kada je reč o odgovoru na niske temperature su urađena kod pirinča (Wang i sar., 2024a), *Camellia sinensis* (Huang i sar., 2023) i paradajza (Yang i sar., 2020). Navedena istraživanja su pokazala da diferencijalna ekspresija circRNK nije u korelaciji sa ekspresijom prekursorskih iRNK, ukazujući na mogućnost da circRNK nisu samo sporedni produkti ekspresije roditeljskog gena, već imaju potencijalnu funkciju u odgovoru na faktore stresa, što zahteva dodatna istraživanja.

#### **1.2.5. Uticaj niskih temperatura na biljke kukuruza**

Kukuruz je biljka tropskog porekla i samim tim veoma podložna uticaju niskih temperatura (Hopkins, 1999). Optimalne temperature za uspešno rastenje i razviće biljaka kukuruza su od 28 do 35°C (Yin i sar., 1995). Temperature niže od 15°C pokazuju značajan negativan efekat na germinaciju, razviće i rastenje klijanaca, biomasu i posledično i na prinos (Silva-Neta i sar., 2015; Nikolić i sar., 2020).

Niske temperature redukuju stopu klijanja i imaju negativan uticaj na vigor klijanaca (eng. *seedling vigor*) (Zhang i sar., 2020b). Izlaganje semena kukuruza niskim temperaturama tokom imbibicije uzrokuje oštećenja koja povećavaju permeabilnost membrane i dovode do gubitka ćelijskih komponenti (Hussain i sar., 2018). Takođe oštećuju utrastrukturu embrionskog korenskog meristema i na taj način usporavaju ili onemogućavaju razvoj korena (Farooq i sar., 2009). Rastenje klijanaca je značajno usporeno na temperaturama nižim od 10°C i potpuno je

onemogućeno na temperaturama nižim od 6°C (Zhou i sar., 2022b). Dakle, izlaganje niskim temperaturama tokom germinacije dovodi do smanjene visine biljke i dužine korena, kao i do redukcije u sposobnosti apsorpcije nutrijenata, sintezi hlorofila i stopi fotosinteze. Navedene posledice rezultuju u potpunoj inhibiciji rastenja, žutenju listova, nekrozi i eventualnom uvenuću klijanaca (Zhou i sar., 2022b).

Iz svega navedenog očigledno je da je neophodno unaprediti tolerantnost kukuruza na niske temperature, ukoliko bi se primenjivala strategija ranije setve. Ipak, većina istraživanja odgovora kukuruza na niske temperature se fokusirala na kasnije faze razvića klijanaca, počevši od faze u kojoj je potpuno razvijen prvi list (V1) do faze gde su kompletno razvijena prva tri (V3) (Waititu i sar., 2021; Zhou i sar., 2023b; Gao i sar., 2024a). Podaci o odgovoru kukuruza na NT tokom VE faze su ređi (Li i sar., 2021a; Xuhui i sar., 2022). Uvođenje strategije rane setve u proizvodnju kukuruza zahteva opširnija istraživanja odgovora na niske temperature u ovom životnom stadijumu, kao i utvrđivanje mogućih puteva aklimatizacije na ovaj faktor stresa.

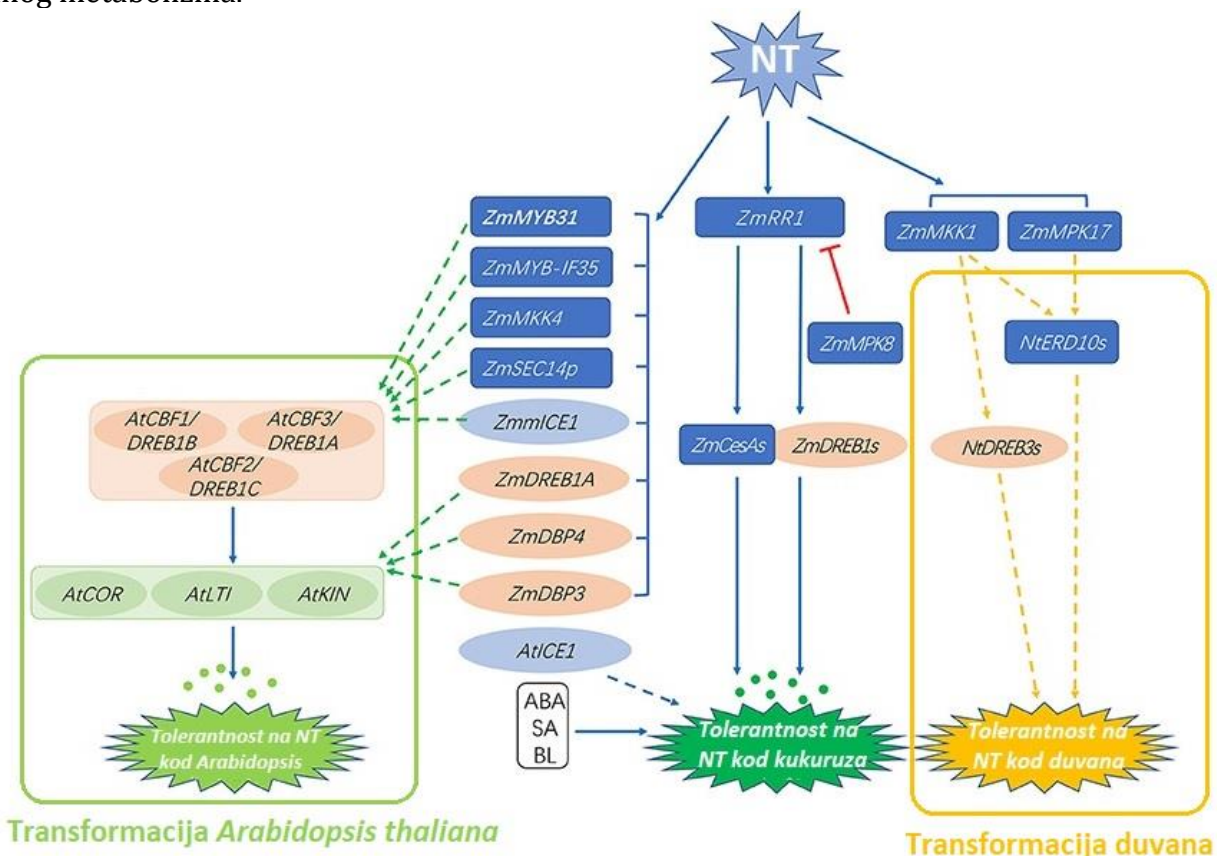
#### **1.2.5.1. Mehanizam odgovora na niske temperature kod kukuruza**

Kao i kod *Arabidopsis thaliana* i pirinča, i kod kukuruza je identifikovan ZmCOLD1, receptor na plazma membrani neophodan za inicijaciju odgovora na niske temperature. ZmCOLD1 je povezan sa influksom jona Ca<sup>2+</sup> i daljim signalnim kaskadama, kao i sa povećanjem nivoa ABA i smanjenjem nivoa giberelina i auksina tokom germinacije u uslovima niskih temperatura (Zhou i sar., 2023b). ICE-CBF-COR signalni put je takođe dugo istraživan i kod kukuruza. Funkcionalna verifikacija gena uključenih u ovaj put je urađena kroz genetsku transformaciju i overekspresiju kod model vrsta kao što je *Arabidopsis thaliana*. Mehanizam odgovora kukuruza na niske temperature i uspostavljanje tolerantnosti su prikazani na Slici 1.8.

Pronađena su četiri CBF gena koji kodiraju transkripcione faktore uključene u odgovor na niske temperature – *ZmDREB1A*, *ZmDREB2A*, *ZmDBP3* i *ZmDBP4* (Zhou i sar., 2022b). Overekspresija *ZmDREB1A*, *ZmDBP3* i *ZmDBP4* kod *Arabidopsis thaliana* je rezultovala i povećanom tolerantnošću na niske temperature (Qin i sar., 2004; Wang i sar., 2011). Gen *ZmmICE1*, izolovan iz vrste blisko srodne kukuruzu (*Zea mays ssp. mexicana* L.) je kod *ice1-2* mutanata *Arabidopsis thaliana* bio povezan sa poboljšanim odgovorom na NT (Lu i sar., 2017). Takođe, biljke kukuruza transformisane sa *AtCBF1* genom su se odlikovale redukovanom propustljivošću elektrolita i poboljšanom tolerantnošću na NT (Zhou i sar., 2022b). Pored ICE i CBF gena, kod kukuruza su otkriveni i brojni drugi geni vezani za tolerantnost na NT, uključujući brojne transkripcione faktore i proteinske kinaze (Zhou i sar., 2022b).

Važna grupa transkripcionih faktora uključenih u odgovor na niske temperature kod kukuruza su MYB transkripcioni faktori. Ova familija je jedna od najbrojnijih familija transkripcionih faktora, često uključena u odgovor na abiotički stres kod biljaka (Wu i sar., 2019). Za razliku od onih kod *Arabidopsis thaliana*, dva okarakterisana MYB transkripciona faktora su pozitivni regulatori CBF gena i odgovora na NT kod kukuruza. Ekspresija *ZmMYB31* gena je indukovana niskim temperaturama i njegova overekspresija kod *Arabidopsis thaliana* dovodi do povećane ekspresije CBF gena (Li i sar., 2019b). Još jedan gen čija je ekspresija indukovana niskim temperaturama je *ZmMYB-IF35* i biljke *Arabidopsis thaliana* u kojima je ovaj gen overeksprimiran su pokazale povećanu tolerantnost na NT, veću aktivnost antioksidativnih enzima i smanjen nivo ROS (Meng i Sui, 2019). Pored MYB transkripcionih faktora i druge grupe učestvuju u regulaciji odgovora na niske temperature kod kukuruza. Novija istraživanja su pokazala da i transkripcioni faktori signalnog puta citokinina (eng. *cytokinin response factors*, CRF) učestvuju u odgovoru na niske temperature. Yan i sar. (2024) su pokazali da se ZmCRF9 ponaša kao pozitivni regulator odgovora na stres niskim temperaturama. Gao i sar. (2024b) su

identifikovali jedan transkripcijski faktor toplotnog stresa (eng. *heat shock factor*, HSF), HSF21, koji je neophodan za uspostavljanje tolerantnosti na stres niskim temperaturama, kroz regulaciju lipidnog metabolizma.



**Slika 1.8** Mehanizam odgovora kukuruza na niske temperature i mehanizmi uspostavljanja tolerantnosti na ovaj faktor stresa. Prikazani su geni koji su overekspimirani i kod *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana tabacum* i mehanizmi kojim dovode do uspostavljanja tolerantnosti na NT i kod ovih vrsta. Preuzeto i modifikovano iz Zhou i sar., (2022b).

MAPK signalna kaskada predstavlja široko rasprostranjen modul za transdukciju signala kod eukariota, odgovoran za prenošenje bioloških signala od receptora do ciljnih molekula kroz različite intracelularne i ekstracelularne puteve (Moustafa, 2014) i bitan je aspekt odgovora na niske temperature kod kukuruza (Kong i sar., 2013). Na primer, ZmMPK5 su neophodne za oporavak biljaka kukuruza od stresa izazvanog niskim temperaturama (Berberich i sar., 1999; Xiang i sar., 2021), dok su ZmMKK4 učestvovala u povećanju tolerantnosti na niske temperature (Kong i sar., 2011). Pan i sar. (2012) su identifikovali ZmMPK17, čija je ekspresija indukovana niskim temperaturama. Overekspresija ZmMPK17 kod duvana (*Nicotiana tabacum* L.) je rezultovala i povećanom tolerantnošću na niske temperature kroz unapređenje antioksidativnog sistema. Cai i sar. (2014) su identifikovali i izolovali ZmMCKK i overekspresija navedenog gena kod duvana je takođe rezultovala boljim odgovorom na niske temperature. Dokazano je i da MAPK signalna kaskada učestvuje u regulaciji DREB gena kod kukuruza – ZmMPK8-ZmRR1-ZmDREB1.10/ZmCesA2 signalni put (Zeng i sar., 2021). ZmMPK8 vrši fosforilaciju ZmRR1 i inhibira njegovo dejstvo, ponašajući se kao negativan regulator odgovora na NT. Međutim u uslovima NT, ZmMPK8 se uklanja pomoću ZmZIP68 (Li i sar., 2022f) i povećana ekspresija ZmRR1, pozitivnog regulatora odgovora na NT, rezultuje povećanom ekspresijom gena poput ZmDREB1.10 i ZmCesA2 (eng. *cellulose synthase 2*).

Kao i kod drugih vrsta, na kraju signalne kaskade se nalaze COR geni, neophodni za stabilizaciju ćelijskih membrana, osmotsku reakciju i antioksidativne mehanizme (Ritonga i Chen,

2020). Osmotska reakcija podrazumeva akumulaciju osmoprotektanata (rastvorljivi šećeri, šećerni alkoholi, prolin) radi redukcije vodnog potencijala ćelije, sprečavanje gubitka vode i stabilizacije ćelijskih struktura (Zhou i sar., 2022b). Veliki broj istraživanja je pokazao da niske temperature dovode do povećanja sadržaja šećera i prolina kod kukuruza i da je ta akumulacija izraženija kod tolerantnih sorti (Zhou i sar., 2022b). Na primer, Han i sar. (2020a) su pokazali da utišavanje *ZmRS* gena, koji kodira rafinoza-sintazu, dovodi do smanjene tolerantnosti na NT. Pokazano je i da niske temperature dovode do aktivacije gena bitnih za sintezu trehaloze i njenu akumulaciju u ćelijama kukuruza (Raza i sar., 2024a). Prolin je takođe veoma bitan osmoprotektant. Ma i sar. (2015a) su pokazali da stres niskim temperaturama indukuje ekspresiju *ZmP5CS1*, ključnog gena u prolinskom biosintetskom putu.

Antioksidativni enzimski mehanizmi kukuruza uglavnom obuhvataju SOD, CAT, POD i APX (Nadarajah, 2020). Mnoga istraživanja su potvrdila aktivnost ovih enzima tokom odgovora na niske temperature kod kukuruza – aktivnosti SOD, POD i CAT enzima kao i ekspresija povezanih gena su u pozitivnoj korelaciji sa tolerantnošću na niske temperature (Zhou i sar., 2022b). Još u prošlom veku je pokazano da niske temperature indukuju ekspresiju *apx* gena i ova stimulacija je bila izraženija kod tolerantnijih linija kukuruza (Pinhero i sar., 1997) što je dodatno potvrđeno u novijim istraživanjima (Zhao i sar., 2022b; Lainé i sar., 2023). Indukcija gena neophodnih za akumulaciju POD takođe može biti izvršena izlaganjem niskim temperaturama (Jin i sar., 2021b; Ramazan i sar., 2021; Cheng i sar., 2022), a isto je potvrđeno i za gene uključene u akumulaciju SOD (Sun i sar., 2020; Ramazan i sar., 2021; Zhao i sar., 2022b).

#### **1.2.5.2. Uloga fitohormona u regulaciji odgovora na niske temperature kod kukuruza**

ABA je i kod kukuruza fitohormon od velikog značaja za odgovor na niske temperature. Povećan sadržaj ABA je često u pozitivnoj korelaciji sa tolerantnošću na niske temperature i tretman egzogenom ABA rezultuje povećanom toleranošću (Zhou i sar., 2022b). Povećana tolerantnost na NT je povezana i sa smanjenim nivoom giberelina i auksina kod klijanaca kukuruza (Janowiak i sar., 2002; Zhou i sar., 2022b). U uslovima navedenog stresa dolazi i do povećane biosinteze SA kod kukuruza, što je blisko povezano sa povećanjem antioksidativnih kapaciteta (Wang i sar., 2013b). Sličnu ulogu imaju i BR – nanošenje egzogenih brasinolida je rezultovalo povećanom stopom klijanja, smanjenjem oštećenja izazvanih niskim temperaturama, kao i akumulacijom antioksidativnih enzima (Sun i sar., 2020). Navedeni rezultati pokazuju da je i manipulacija fitohormonima zadovoljavajuć način za povećanje tolerantnosti na niske temperature kod kukuruza, čak iako tačni mehanizmi kojim oni vrše regulaciju nisu poznati.

#### **1.2.5.3. Uloga ncRNK u regulaciji odgovora na niske temperature kod kukuruza**

Uloga nekodirajućih RNK u odgovoru na abiotički stres je proučavana i kod kukuruza (Aydinoglu, 2020; Hu i sar., 2022b; Xu i sar., 2024) ali u mnogo manjoj meri od model vrsta poput *Arabidopsis thaliana*, duvana ili paradajza. Takođe, istraživanja su uglavnom bila fokusirana na odgovor kukuruza na sušu ili povećanu koncentraciju soli u zemljištu (Cao i sar., 2021; Das i Mondal, 2021), dok su istraživanja uloga ncRNK u odgovoru na niske temperature manje zastupljena (Aydinoglu, 2020; Xuhui i sar., 2022).

Analiza ekspresije više od 300 miRNK kod kukuruza pokazala je da su neke od miRNK sa potvrđenom ulogom u odgovoru na NT kod drugih biljnih vrsta, diferencijalno eksprimirane i kod kukuruza nakon tretmana niskim temperaturama (Aydinoglu, 2020). Ekspresija *zma-miR319* je bila snižena nakon izlaganja niskim temperaturama i potencijalni ciljni geni *TCP38* i *GAMYB* (eng. *gibberellin-and-abscisic-acid-regulated MYB*) su pokazali recipročnu ekspresiju u odnosu na navedenu miRNK. Identifikovane su i negativne korelacije između miRNK čija je ekspresija bila

indukovana NT i odgovarajućih ciljnih gena – zma-miR160-ARF17 (eng. *auxin response factor*) i zma-miR396-GRF1/5/15 (eng. *growth regulating factor*). Rezultati ukazuju na ulogu ovih miRNK u regulaciji procesa rastanja i morfogeneze kukuruza tokom stresa niskih temperatura. Novija istraživanja su pokazala da su i zma-miR408 neophodne za razvoj listova kod klijanaca kukuruza tretiranih niskim temperaturama, kroz regulaciju svojih ciljnih gena *BBP* (eng. *basic blue protein*) i *BCP* (eng. *blue copper protein*) (Akgul i Aydinoglu, 2025).

lncRNK eksprimirane u uslovima abiotičkog stresa kod kukuruza su proučavane u uslovima suše (Pang i sar., 2019), visokih temperatura (Hu i sar., 2022b), nedostatka azota (Ma i sar., 2021b), ali i niskih temperatura (Waititu i sar., 2021; Xuhui i sar., 2022). Waititu i sar. (2021) su identifikovali 337 potencijalnih lncRNK, čija je ekspresija indukovana NT. Međutim, dalje funkcionalne analize i pronalazak RNK molekula sa kojima identifikovane lncRNK interaguju nisu rađeni. Xuhui i sar. (2022) su identifikovali 106 lncRNK diferencijalno eksprimiranih između kontrolnih i uslova niskih temperatura. Među njima, 62 je pokazalo povišenu ekspresiju nakon izlaganja niskim temperaturama i njihovi ciljni geni su uglavnom bili uključeni u procese fosforilacije.

circRNK su najmanje istražene kada je u pitanju odgovor na niske temperature kukuruza. Njihova ekspresija je indukovana abiotičkim faktorima stresa kao što su suša (Zhang i sar., 2019a; Xu i sar., 2024), stres soli (Liu i sar., 2022b), ili nedostatak azota u zemljištu (Ma i sar., 2021a). Jedini podaci o njihovoj potencijalnoj ulozi u odgovoru na stres NT se nalaze u meta analizi 21 transkriptoma prikupljenih iz *Phytozome* baze podataka, u kojoj su analizirani obrasci ekspresije circRNK u različitim vegetativnim fazama ili u uslovima nekoliko abiotičkih stresora (Tang i sar., 2018). Tang i sar. (2018) su u prikupljenim podacima pronašli 149 circRNK koje su diferencijalno eksprimirane u uslovima ekstremno visokih ili niskih temperatura. Povišenom ekspresijom nakon tretmana niskim temperaturama se odlikovalo 14 circRNK, a sniženom 11.

### **1.3. Pristupi u proučavanju odgovora na stres izazvan niskim temperaturama**

#### **1.3.1. Istorija proučavanja odgovora na stres izazvan niskim temperaturama**

Stres izazvan niskim temperaturama se proučava već skoro tri veka – prvi eksperimenti zabeleženi su još u 18. veku i zasnivali su se na zamrzavanju biljaka i proveru njihovog preživljavanja. Tek su se početkom 20. veka istraživanja fokusirala na posledice izlaganja suboptimalnim temperaturama, pre svega kroz morfološke promene – povrede koje izazivaju ili razlike u preživljavanju. U isto vreme je uočeno i da postoji razlika u odgovoru i preživljavanju biljaka između postepenog i naglog izlaganja niskim temperaturama. Levitt (1956) je proučavao ovaj fenomen, danas poznat kao aklimatizacija, a za koji je on koristio termin „izdržljivost“ (eng. *hardiness*). Tokom šezdesetih godina prošlog veka rađena su istraživanja koja objašnjavaju promene koje nastaju tokom izlaganja niskim temperaturama na anatomskom (kaloze u floemu, očvršćavanje ksilema) i fiziološkom nivou (denaturacija proteina, gubitak aktivnosti enzima, narušavanje membranskih procesa, aktivacija antioksidativnih mehanizama) (Mayland i Cary, 1970). Opisane su i promene u kvalitativnom sastavu ćelijskih membrana nakon izlaganja NT (Gerloff i sar., 1966).

Tokom sedamdesetih i osamdesetih godina 20. veka proučavanje odgovora na različite abiotičke faktore stresa, uključujući niske temperature, na fiziološkom nivou se intenzivira i precizniji opisi oštećenja kao i mehanizama odgovora biljaka na faktore stresa su mnogo zastupljeniji. Na primer, Berry i Björkman (1980) i Huner i Williams (1988) su sumirali prethodna istraživanja o uticaju NT na odvijanje fotosinteze, čime su istakli veliki napredak u razumevanju tog procesa. Dokazano je da niske temperature negativno utiču na sintezu hlorofila i

inhibiraju normalno odvijanje fotohemijske faze fotosinteze – uveden je i termin „fotoinhibicija“. Zabeleženi su i začeci izučavanja detektovanja signala niske temperature, odnosno receptora i signalne transdukcije i utvrđeno je i da je influks jona  $Ca^{2+}$  povezan sa odgovorom na niske temperature (Minorsky, 1989). Pored toga, tehnike poput rendgenske kristalografije, diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i „freeze-fracture“ elektronske mikroskopije su omogućile detektovanje promena u ćelijskim membranama izazvanih niskim temperaturama. Takođe je dokazano i postojanje faznog prelaza membranskih lipida, odnosno prelazak iz fluidnog u rigidno stanje tokom izlaganja suboptimalnim temperaturama (Raison, 1974).

### **1.3.2. Uvođenje tehnologija molekularne biologije u proučavanje odgovora na stres izazvan niskim temperaturama**

Sredinom osamdesetih godina 20. veka je postalo jasno da su neophodni novi pristupi u izučavanju ovog problema. Iako je otkriven veliki broj biohemijskih i fizioloških promena tokom aklimatizacije, mnogobrojna korelativna istraživanja navedenih promena nisu uspela da razotkriju tačno na koji način postepeno izlaganje biljaka niskim temperaturama menja tolerantnost ćelija i tkiva i na ovaj stres (Steponkus, 1984). Dodatno, mehanistički pristup izučavanju ponašanja ćelijskih membrana na suboptimalnim temperaturama nije dao zadovoljavajuće rezultate, pa je bilo očigledno da je neophodno uvođenje novih strategija – molekularno-genetičko izučavanje odgovora na niske temperature (Guy, 1990).

Prvobitne genetske analize odgovora na niske temperature su se zasnivale na identifikaciji i lokalizaciji gena bitnih za aklimatizaciju, određivanje njihovog broja, heritabilnosti i dominantnosti (Thomashow, 1990). Uloga promena u ekspresiji gena u razvijanju aklimatizacije je predložena još 1970. godine (Weiser, 1970) i deceniju kasnije su razvijene odgovarajuće metode proučavanja ekspresije gena – praćenje promena u sintezi proteina kroz eksperimente sa radioaktivno obeleženim polipeptidima, primenom SDS-PAGE (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) (Thomashow, 1990). Na ovaj način su otkriveni i prvi COR proteini. Na primer, Guy i Haskell (1987) su identifikovali tri COR proteina kod *Spinacia oleracea* L., u tom istraživanju označena kao CAP (eng. *cold acclimation proteins*). Za izučavanje genske ekspresije tokom ovog perioda je često upotrebljavana metoda praćenja iRNK populacija kroz oglede analize translacije *in-vitro*, a kasnije i *in-vivo* pomoću klonova komplementarne DNK (eng. *complementary DNA*, cDNK) i EST sekvenci (eng. *expressed sequence tags*) (Thomashow i sar., 1990). Analiza varijacija u učestalosti pojedinačnih cDNK i EST-ova otkriva ekspresiju odgovarajućih gena, ali ovaj pristup identifikuje samo najzastupljenije gene sa značajno povećanom ili sniženom ekspresijom (Cushman i Bohnert, 2000).

Tokom devedesetih godina prošlog veka metode su ostale slične, ali su uvedene i značajne nove strategije, kao što je primena transgenih biljaka kojima je ekspresija određenih gena indukovana ili onemogućena (Murata i sar., 1992; Zhang i sar., 2000). Na primer, overekspresija transkripcionog aktivatora CBF1 je indukovala ekspresiju četiri *COR* gena, što je rezultovalo povećanom tolerantnošću na mraz (Jaglo-Ottosen i sar., 1998). Otkriveni su brojni *hsp* geni i brojni učesnici signalne kaskade (MAPK, MAPKK, CaM) (Thomashow, 1999). Novootkriveni geni su uglavnom kodirali proteine sa poznatim enzimskim aktivnostima, ali i značajan broj gena koji kodiraju proteine sa do tada nepoznatom funkcijom, te je veliki broj istraživanja je bio fokusiran na njihovu funkcionalnu karakterizaciju. Istraživanja ovog tipa su kroz vreme omogućila razumevanje značajnog broja mehanizama odgovora na niske temperature i formiranje šema transkripcione regulacije (Hirayama i Shinozaki, 2010). Krajem devedesetih godina, istraživanja odgovora na abiotički stres su se umesto identifikacije gena koji kodiraju pojedinačne efektorne proteine, usmerila na identifikaciju transkripcionih regulatora odgovora čijom bi se

manipulacijom postigli značajniji efekti na tolerantnost. Identifikacija takvih gena je uspešno urađena primenom inducibilnih gena kao markera. Na primer, identifikovan je *cis*-element, CRE-CRT, koji reguliše ekspresiju brojnih transkripcionih faktora, poput DREB i CBF i njihovih post-translacionih regulatornih mehanizama (Thomashow, 2001). Pored toga, genetički skrining za mutacije koje utiču na ekspresiju gena vezanih za abiotički stres je omogućio identifikaciju i novih komponenti u ovom regulatornom sistemu (Chinnusamy i sar., 2002). Takođe je razvijena i metoda serijske analize genske ekspresije (eng. *serial analysis of gene expression*, SAGE) za bržu i precizniju kvantifikaciju velikog broja transkripata (Bertelsen i Velculescu, 1998). Krajem dvadesetog veka razvijena je i NEST (eng. *nuclear expressed sequence tag*) metoda veoma značajna za analizu ekspresije gena, koja kombinuje sortiranje nukleusa uz pomoć fluorescencije i sintezu cDNK iz RNK izolovanih jedara (Macas i sar., 1998).

Podaci dobijeni primenom navedenih metoda su pružili osnovnu sliku regulatornih mreža gena neophodnih za odgovor na abiotički stres. Međutim, geni čija je ekspresija indukovana abiotičkim faktorima stresa, izolovani na ovaj način, bili su u velikoj meri ograničeni samo na one sa višim nivoima ekspresije, pa je znanje o kompletnim obrascima ekspresije gena bilo ograničeno.

### **1.3.3. Genomska era proučavanja odgovora na niske temperature**

Sekvenciranje genoma, prvo model vrste *Arabidopsis thaliana*, zatim i drugih važnih vrsta kao što su duvan i pirinač, su dramatično uticali na trendove i strategije u proučavanju odgovora na abiotički stres (Hirayama i Shinozaki, 2010). Tokom 21. veka, polje genomike se brzo razvijalo i nastale su dve grane ovog tipa analiza – strukturna i funkcionalna genomika (Mohanta i sar., 2017).

#### ***1.3.3.1. Metode strukturne genomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature***

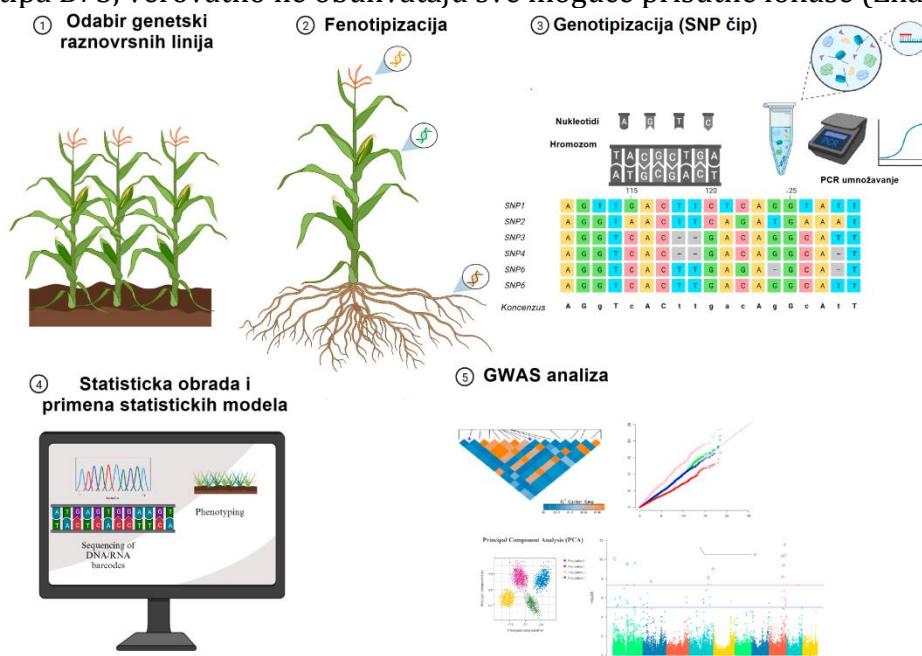
Strukturna genomika je fokusirana na identifikaciju i razumevanje fizičke strukture samog genoma kao i identifikaciju i lokalizaciju genomskih odlika hromozoma. Poznavanje navedenih karakteristika je neophodno za manipulaciju bilo kog gena od interesa, što se može dalje primeniti u poboljšanju odgovora na stres. Ubrzo nakon završetka projekta sekvenciranja genoma *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), tehnologije sekvenciranja DNK pokazuju ogromne napretke, omogućavajući generisanje izuzetno velike količine podataka za kratko vreme u poređenju sa Sangerovom metodom. Novoimplementirane tehnologije sekvenciranja su označene kao sekvenciranje nove generacije (eng. *next generation sequencing*, NGS) i njima pripadaju tehnike sekvenciranja kratkih sekvenci (eng. *short read sequencing*) kao što je Illumina (<https://www.illumina.com/>). Od 2008. godine do danas razvijaju se i metode „treće generacije“ sekvenciranja, odnosno sekvenciranje dugih sekvenci (eng. *long read sequencing*). Najzastupljeniji pristupi među ovim tehnologijama jesu *SMRT*<sup>™</sup> (eng. *single molecule real time*) (Eid i sar., 2009) i tehnologija nanopora koja podrazumeva translokaciju DNK kroz veštačke nanopore (Rusk, 2009). Napredak u razvoju NGS tehnologija je omogućio genomske analize za veliki broj biljnih vrsta – od 2000. do 2020. sekvencirani su kompletni genomi skoro 400 biljnih vrsta (Mohanta i sar., 2017). Sekvence ukupnog genoma (eng. *whole-genome sequences*, WGS) daju informacije o svim kodirajućim i nekodirajućim regionima, GC (guanin-citozin) sadržaju, repetitivnim i regulatornim sekvencama. Navedene informacije su neophodne za rasvetljavanje kompleksnih odlika kao što je tolerantnost na abiotički stres i unapređenje tih odlika kroz molekularno oplemenjivanje (eng. *molecular breeding*).

Pomoću tehnologija strukturne genomike razvijene su mnoge tehnike koje se primenjuju u molekularnom oplemenjivanju. Selekcija pomoću molekularnih markera (eng. *marker-assisted selection*, MAS) je jedan od korisnih alata koji se može primeniti za identifikaciju i selekciju važnih agronomskih osobina, kao što je tolerantnost na niske temperature. SSR markeri (eng. *simple sequence repeats*, SSR) su sekvence od 1-6 nt, nasumično raspoređene u genomu i početkom 21. veka su bili najčešće korišćeni markeri u MAS (Varshney i sar., 2005). Za njihovo razvijanje i dizajn su neophodne prethodne informacije o sekvencama, što je pre razvoja genomskih tehnologija bilo izuzetno teško dobiti. Primeri uspešne primene ovih tehnologija u razvoju SSR markera su brojni i rezultovali su identifikacijom lokusa za kvantitativne osobine (eng. *quantitative trait locus*, QTL) koji su u korelaciji sa kompleksnim osobinama, kao što je tolerantnost na NT (Mohanta i sar., 2017). Na primer, Jompuk i sar. (2005) su detektovali glavni QTL (eng. *major QTL*) vezan za tolerantnost na niske temperature lociran na hromozomu 6 kod kukuruza pomoću SSR markera.

SSR markere su zamenili markeri pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP). SNP markeri mogu biti mnogo informativniji od SSR markera - prisutni su u mnogo većem broju u genomu, što znači da pokrivaju veći broj lokusa i odlikuju se niskom stopom mutacija (Rauf i sar., 2016; Mohanta i sar., 2017). Podaci neophodni za dizajn SNP markera se takođe dobijaju iz sekvenci gena ili celog genoma i mogu biti izuzetno značajni za karakterizaciju alelnih varijacija i mapiranje celog genoma za primenu u MAS. Izuzetno veliki setovi podataka dobijenih NGS platformama su omogućili otkriće, vizuelizaciju i identifikaciju SNP-ova kroz softverske pristupe (*SNPsniffer*, *Atlas-SNP*, *NextGENe*, *PanGEA*) (Varshney i sar., 2009). Zbog navedenih superiornijih karakteristika u odnosu na SSR markere, SNP markeri su brzo postali češće korišćeni u MAS. SNP markeri su korišćeni i u asocijativnom mapiranju, metodi QTL mapiranja preko istorijske neravnoteže vezanosti gena (eng. *linkage disequilibrium*) čime se povezuju fenotipovi i genotipovi i otkrivaju genetske asocijacije. Na primer, kod kukuruza su asocijativnim mapiranjem identifikovani SNP-ovi povezani sa modifikacijom ABA tokom uslova suše i modifikacijom ekspresije *ZmMYBE1* (Assenov i sar., 2013).

Zastupljenost i učestalost SNP markera u genomu je omogućila dizajniranje takozvanih SNP čipova za ubrzavanje procesa genomske selekcije (Mohanta i sar., 2017). SNP čipovi sadrže nekoliko stotina do nekoliko stotina hiljada SNP molekularnih markera. Oni omogućuju brz pregled genomske strukture kroz proces označen kao SNP genotipizacija i primenjuju se u analizama asocijacija na nivou kompletnog genoma (eng. *genome wide association study*, GWAS). GWAS podrazumeva analizu genetičkih varijacija kod različitih individua, populacija ili sorti, radi provere njihove povezanosti, odnosno asocijacija, sa određenom osobinom od značaja – npr. tolerantnost na određeni faktor stresa. Stoga, za GWAS analizu je neophodna i karakterizacija fenotipskih osobina od značaja, odnosno fenotipizacija (Mohanta i sar., 2017). Primeri uspešne primene GWAS analize za određivanje lokusa značajnih za tolerantnost na niske temperature su brojni. Na primer, Shakiba i sar. (2017) su primenom GWAS analize i  $\approx 700\ 000$  SNP markera otkrili 42 QTL lokusa značajno vezana za tolerantnost na niske temperature kod klijanaca pirinča. GWAS je primenjivan i u analizi odgovora na niske temperature kukuruza (Zhou i sar., 2022b). Strigens i sar. (2013) su sproveli prvu GWAS analizu kod kukuruza za ispitivanje osobina važnih za tolerantnost na niske temperature. Analizirano je 375 genotipova kukuruza primenom 56K SNP čipa i identifikovano je 19 SNP-ova značajno vezanih za ovu osobinu koji objašnjavaju između 5.7 i 52,5% fenotipskih varijacija. Osnovni pristupi u GWAS analizi tokom ispitivanja kukuruza su prikazani na Slici 1.9. Ipak, pored široke primene, postoje i brojni nedostaci GWAS pristupa. Na primer, mnogi identifikovani SNP-ovi značajno vezani za važne osobine se nalaze u nekodirajućim regionima i pretpostavlja se da imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije, ali

GWAS ne daje odgovor na to koje gene regulišu. Takođe, uočene su velike strukturne varijacije u genomima različitih genotipova kukuruza i genetski lokusi najčešće korišćeni kao referentni, koji potiču iz genotipa B73, verovatno ne obuhvataju sve moguće prisutne lokuse (Zhao i sar., 2022b).



**Slika 1.9 Osnovni GWAS pristup kod kukuruza.** Preuzeto i modifikovano iz Sahito i sar., (2024).

Dakle, strukturna genomika ima širok opseg primena u unapređenju odgovora na abiotički stres i razvijanje NGS metoda je značajno doprinelo razvoju esencijalnih molekularnih markera i MAS i time unapređenju molekularnog oplemenjivanja. Ipak, primenom metoda strukturne genomike se ne dolazi do informacija o funkciji i ulozi gena, u okviru kojih je npr. identifikovan SNP, već samo do informacija o njegovoj lokaciji i vezi sa osobinom od značaja.

### 1.3.3.2. Metode funkcionalne genomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature

Funkcionalna genomika se bavi definisanjem uloge različitih gena korišćenjem velike količine podataka dobijenih sekvenciranjem – sekvence, pozicije, struktura (Mohanta i sar., 2017). Zajedno sa razumevanjem genetičkih varijacija, rasvetljavanje funkcija gena je neophodno za opisivanje kompletnih mehanizama koji leže u osnovi tolerantnosti na abiotički stres. Veći broj tehnika koje se danas svrstavaju u funkcionalnu genomiku je dugo korišćen za ispitivanje funkcija gena i njihovih interakcija – npr. SAGE i EST. Pre značajnog i ubrzanog razvoja NGS tehnologija, analize ekspresije gena su uglavnom rađene primenom cDNK *microarray* tehnologija. Navedene tehnike podrazumevaju hibridizaciju DNK sa cDNK oligonukleotidnom probom i zahtevaju prethodno poznavanje transkriptata koji se analiziraju za dizajniranje specifičnih proba. cDNK *microarray* tehnologije su široko korišćene za identifikaciju gena uključenih u odgovor na abiotički stres kod velikog broja vrsti – ječam (Close i sar., 2004), kukuruz (Luo i sar., 2010), paradajz (Zamboni i sar., 2012). Međutim, zbog prisustva „pozadinske buke“ i mogućnosti unakrsne hibridizacije, tehnike cDNK *microarray* analiza nisu idealne za istraživanja funkcionalne genomike. Sa razvojem NGS metoda, analize ekspresije gena su mogle biti primenjene na mnogo većim setovima podataka. Kompletne genomske sekvence su omogućile profilisanje obrazaca ekspresije prilikom odgovora na abiotičke faktore stresa na nivou celog genoma – omogućeno je ispitivanje obrazaca ekspresije za sve pretpostavljene gene u isto vreme (Kilian i sar., 2007).

### 1.3.3.2.1. Metode transkriptomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature

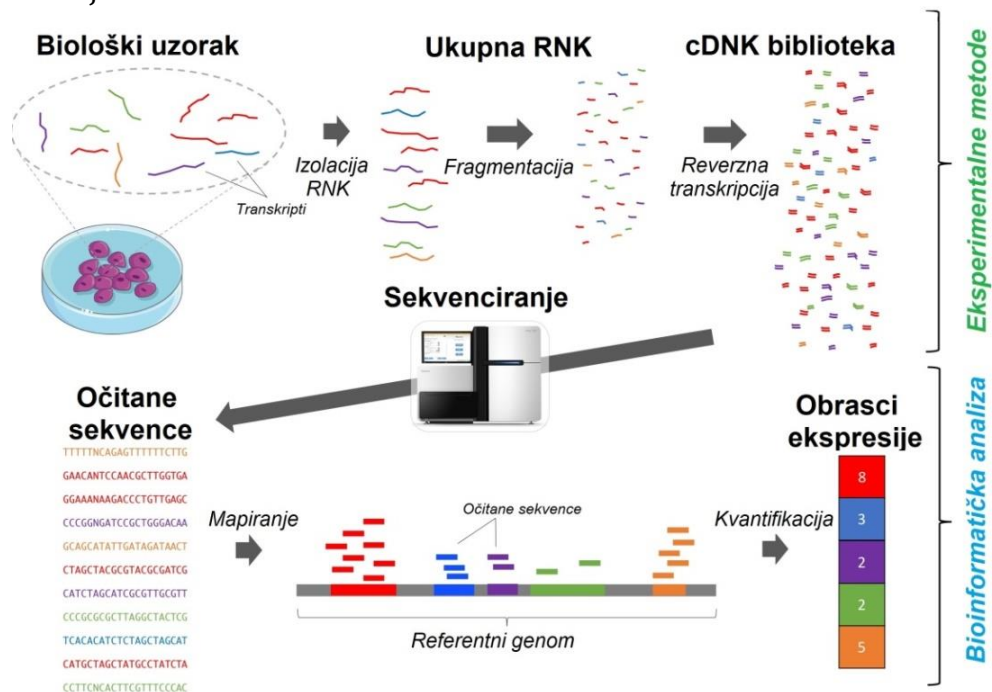
Transkriptomika je u današnje vreme istaknuto polje istraživanja kada je reč o funkcionalnoj karakterizaciji genoma različitih organizama (Sakina i sar., 2019). Zasniva se na kvantifikaciji ukupnog seta transkripata ili njegovog određenog dela prisutnog u ciljnom tipu ćelija ili tkiva u različitim fazama razvića (Imadi i sar. 2015). Jedan od glavnih ciljeva transkriptomike jeste anotacija, odnosno identifikacija, kategorizacija i sistematizacija struktura svih transkribovanih gena, uključujući 5' i 3' krajeve i sva mesta spajanja. Takođe, važan cilj je i kvantifikacija modulacija u nivoima genske ekspresije tokom tretmana različitim faktorima stresa ili tokom različitih faza razvića (Wang i sar. 2009; Simsek i sar., 2017).

Sekvenciranje populacija fragmenata cDNK metodama NGS, označeno kao *RNA-Seq*, je značajan alat u analizi transkriptoma, uz pomoć kog se dobijaju milioni očitanih cDNK sekvenci (eng. *reads*). Principi *RNA-Seq* analize i osnovni koraci su prikazani na Slici 1.10. Za *RNA-Seq* se primenjuju samo tehnologije sekvenciranja kratkih sekvenci, koji funkcionišu po principu sekvenciranja sintezom (eng. *sequencing by synthesis*) (Simsek i sar., 2017). Očitane sekvence se potom poravnavaju sa referentnim genomom ili se asembliraju *de novo*, formirajući transkripcionu mapu na nivou celog genoma koja sadrži informacije o strukturi transkripta i nivou ekspresije za različite gene ili nekodirajuće regione (Simon i sar., 2009; Simsek i sar., 2017). Svaki korak analize transkriptomskih podataka dobijenih *RNA-Seq* zahteva primenu određenih bioinformatičkih alata i baza podataka. Na primer, korak mapiranja, odnosno poravnanja sa referentnim genomom, se može uraditi pomoću nekoliko alata kao što su *Bowtie2* (Langmead i Salzberg, 2012), *BWA* (Li i Durbin, 2009) ili *STAR* (Dobin i sar., 2013). Za preuzimanje referentnog genoma su potrebne baze podataka, kao što su *Ensembl Plants* (<https://plants.ensembl.org/index.html>) i *PlantGDB* (<https://goblinp.luddy.indiana.edu/>). *RNA-Seq* metode predstavljaju rešenje za sve nedostatke *microarray* tehnologija – brzina, efikasnost, količina dobijenih podataka, kao i preciznost, zbog čega su brzo preuzele primat (Malone i Oliver, 2011) i značajno doprinele razumevanju genske ekspresije i regulacije kod velikog broja organizama (Marguerat i Bähler, 2010).

*RNA-Seq* tehnologije su primenjivane u više istraživanja sa ciljem sveobuhvatnog razumevanja molekularnih mehanizama koji su u osnovi odgovora na niske temperature i uspostavljanja tolerantnosti. Analize odgovora na bilo koji faktor stresa se uglavnom zasnivaju na analizi diferencijalne ekspresije (DE), odnosno poređenju obrazaca ekspresije tokom određenog vremenskog perioda između dva tipa uzoraka – kontrola i tretman, dok je za proučavanje tolerantnosti neophodno više genotipova ili populacija sa različitim stepenom tolerantnosti, odnosno osetljivosti, koji je određen na osnovu fenotipskih osobina. Korak analize DE takođe zahteva upotrebu specifičnih bioinformatičkih alata, kao što su *DeSEQ2* (Love i sar., 2014) ili *edgeR* (Robinson i sar., 2010). Nakon identifikacije diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) neophodna je njihova funkcionalna karakterizacija koja može biti postignuta na više načina – kroz analize funkcionalnog obogaćivanja (eng. *functional enrichment analysis*, FEA) ili identifikaciju proteina koje kodiraju kroz pretragu baza kao što je *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>). FEA analize uglavnom podrazumevaju analize genske ontologije (eng. *gene ontology*, GO) i KEGG analize (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; Kanehisa i sar., 2008).

Navedeni koraci omogućavaju identifikaciju gena koji učestvuju u odgovoru na niske temperature i određivanje njihove uloge u tom procesu. Na primer, Shen i sar. (2014) su primenom *RNA-Seq* tehnologija poredili profile ekspresije osetljive i tolerantne linije pirinča nakon izlaganja niskim temperaturama i otkrili 319 DEG-ova između kontrole i tretmana, kao i

između dve linije. Slična istraživanja su urađena za veliki broj biljnih vrsta – pšenica (Winfield i sar., 2010), grašak (Bahrman i sar., 2019), ječam (Wang i sar., 2016b) i paradajz (Chen i sar., 2015). Analize transkriptoma su takođe široko primenjene u analizi molekularnog odgovora kukuruza na stres niskih temperatura. Li i sar. (2016b) su primenili *RNA-Seq* analize da bi uporedili transkriptome dva genotipa kontrastne tolerantnosti na mraz u fazi klijanaca pre i posle tretmana niskim temperaturama. Identifikovali su 948 DEG-ova koji imaju ulogu u procesima vezivanja proteina i aktivnosti proteinskih kinaza i peptidaza. Istraživanja bazirana na navedenim principima kod tolerantnih i osetljivih linija kukuruza su brojna (Li i sar., 2019c; Frey i sar., 2020; Yu i sar., 2021; Zhao i sar., 2022b). Novija istraživanja su zasnovana na ispitivanju većeg broja linija. Na primer, Waititu i sar. (2021) su sproveli uporednu analizu transkriptoma klijanaca 24 linije tolerantne na niske temperature i 22 osetljive linije nakon izlaganja niskim temperaturama. Zhou i sar. (2022a) su ispitivali promene transkriptoma kod klijanaca više inbred linija i F1 hibrida nastalih njihovim ukrštanjem kao odgovor na stres niskim temperaturama. Identifikovali su mnogobrojne DEG-ove uključene u odgovor na NT među različitim genotipovima kukuruza i povezali te promene ekspresije sa odgovarajućim *cis*- ili *trans*-regulatornim mehanizmima koristeći podatke dobijene sekvenciranjem transkriptoma F1 hibrida. Njihovo istraživanje je rasvetlilo način na koji razlike u sekvencama i *cis*-elementima različitih genotipova utiču na ekspresiju gena uključenih u odgovor na stres i dalo smernice za buduća istraživanja.

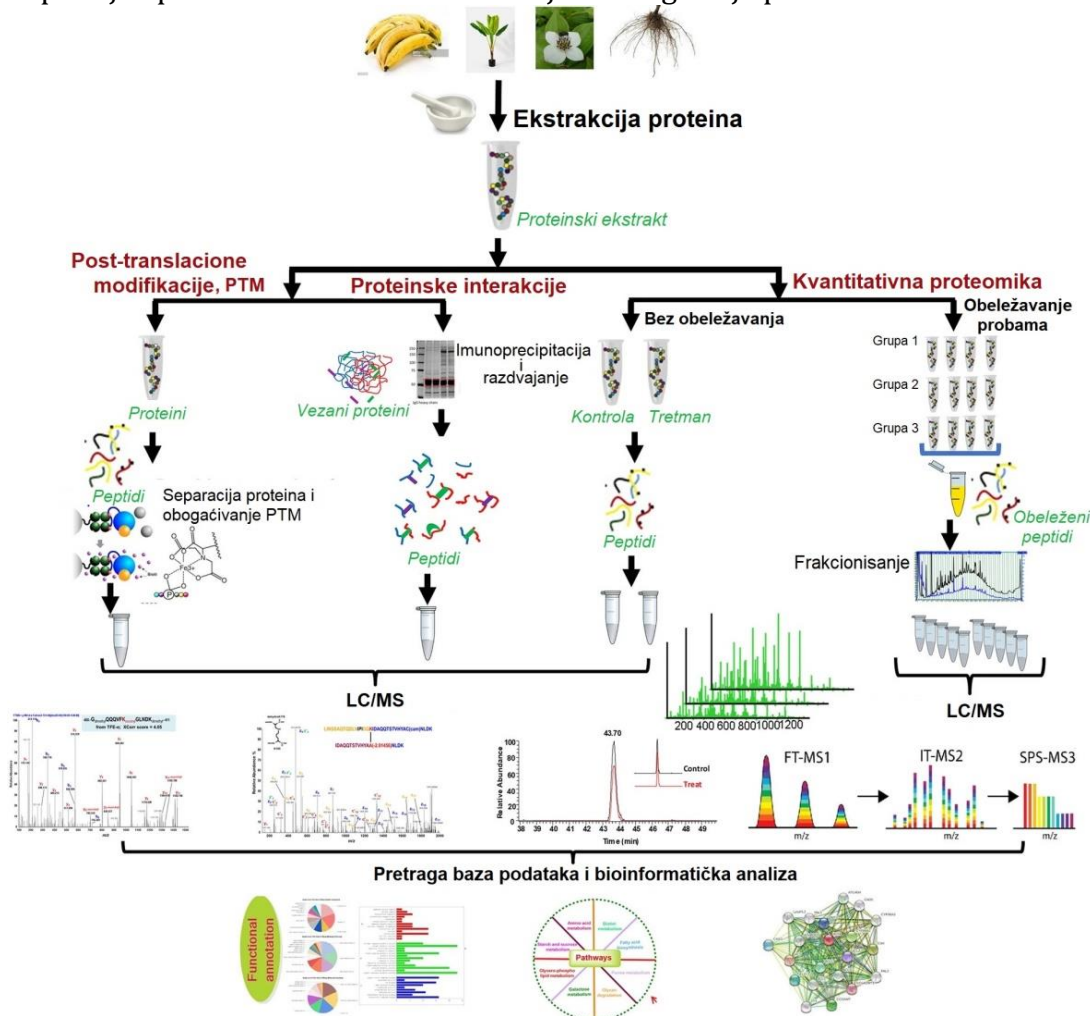


**Slika 1.10** Koraci analize transkriptoma primenom metoda sekvenciranja populacija fragmenata cDNK, odnosno *RNA-Seq* metodama. Preuzeto i modifikovano iz Bernstein (2021).

### 1.3.3.2.2. Metode proteomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature

Značajan aspekt funkcionalne genomike jeste i proučavanje načina na koji se promene u ekspresiji svih gena korelišu sa vremenski-zavisnim promenama u akumulaciji biomolekula – ukupnih proteina (proteom) i metabolita (metabolom) (Cramer i sar., 2011). Grana funkcionalne genomike fokusirana na sistemsku analizu kompleksnih promena na nivou proteoma tokom odgovora na neki faktor stresa ili između različitih faza vegetativnog razvića jeste proteomika (Sakina i sar., 2019). Promene u ekspresiji specifičnih proteina indukovanih niskim temperaturama ili drugim faktorima stresa su ranije proučavane primenom samo SDS-PAGE ili u

kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MS). Na ovaj način su identifikovani proteini povezani sa tolerantnošću na niske temperature kod velikog broja biljnih vrsta (Sakina i sar., 2019). Kao i *RNA-Seq* tehnologije u odnosu na *microarray* tehnologije, pristup proteomike je sveobuhvatniji i precizniji, omogućavajući pregled svih proteina eksprimiranih u jednom trenutku. Ovim pristupom se mnogo detaljnije ispituju uloga, struktura, lokalizacija, interakcije, obrasci ekspresije i post-translacione modifikacije velikog broja proteina.



**Slika 1.11 Osnovni koraci u proteomskoj analizi.** Prikazani su koraci za tri tipa analiza – analiza post-translacionih modifikacija, analiza proteinskih interakcija i kvantitativne proteomske analize. Korak ekstrakcije je isti za sva tri tipa analiza, nakon čega se metode frakcionisanja proteina razlikuju. Dalje, separacija i identifikacija proteina se rade primenom LC/MS za sve tipove analiza. Preuzeto i modifikovano iz Yan i sar., (2022b).

Proteomika je zasnovana na tehnologijama mapiranja visokog protoka (eng. *high-throughput mapping*) na tri osnovna tehnološka principa – metoda frakcionisanja u cilju pojednostavljanja kompleksnih struktura, MS za selektivnu akviziciju podataka neophodnih za identifikaciju i kvantifikaciju molekula i bioinformatičke analize kojima se predviđaju interakcije i ispituju korelacije sa genomskim i transkriptomskim podacima (Yan i sar., 2022b). Osnovni koraci i metode u proteomskim analizama su prikazani na Slici 1.11. Profilisanje, odnosno razdvajanje proteina, može biti postignuto različitim tehnikama – uglavnom se primenjuju tehnologije hromatografskog razdvajanja, poput LC (eng. *liquid chromatography*), UHPLC (eng. *ultra-high performance liquid chromatography*) ili MS. Kvantitativnom proteomikom se omogućava uspostavljanje proteinskog fenotipa asociiranog sa određenim biološkim stanjem (npr. optimalni uslovi ili uslovi tretmana) i identifikacija biomarkera vezanih za npr. odgovor na

abiotički stres. Do sada su se u kvantitativnim proteomskim istraživanjima primenjivale i metode zasnovane na probama i tehnike bez obeležavanja. Metode zasnovane na probama, odnosno obeležavanju proteina, u kombinaciji sa LC-MS/MS analizama su najčešće primenjivane u istraživanjima odgovora na abiotički stres (Yan i sar., 2022b).

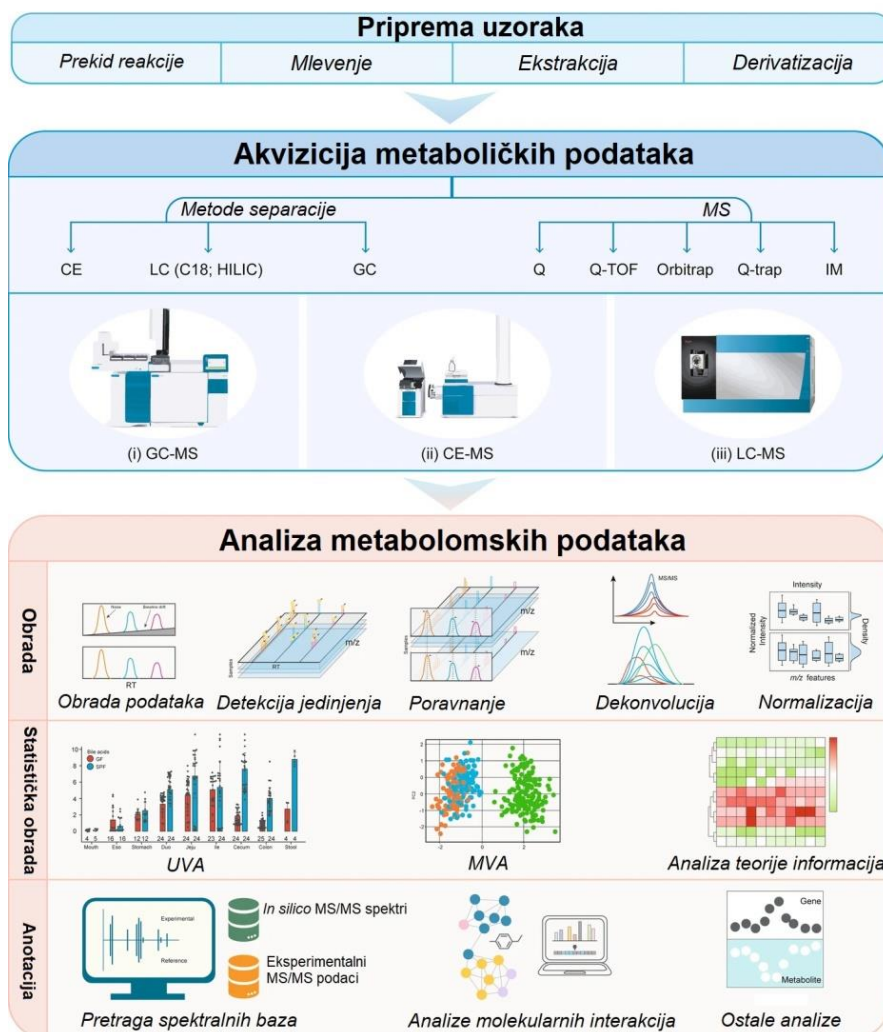
Metodama kvantitativne proteomike je pokazano da su proteini uključeni u energetske metabolizam, fotosintezu, uklanjanje ROS, skladištenje i regulaciju ćelijskog ciklusa različito zastupljeni između genotipova otpornih na stres i genotipova osetljivih na stres kod više biljnih vrsta (Grimaud i sar., 2013; Kosova i sar. 2014; Chen i sar. 2015). Proteomske metode su primenjivane i u proučavanju odgovora biljaka kukuruza na stres izazvan niskim temperaturama (Wang i sar., 2016c; Urrutia i sar., 2021; Ramazan i sar., 2023). Na primer, Urrutia i sar. (2021) su simulirali uslove rane setve kod V3 klijanaca 18 genetski različitih linija i metodama proteomike identifikovali nekoliko enzima uključenih u odgovor na suboptimalne temperature – saharozo sintaza, alen oksid sintaza, glutation transferaze i peroksidaze.

#### 1.3.3.2.3. Metode metabolomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature

Poznato je da tokom odgovora na bilo koji faktor stresa biljke sintetizuju veliki broj sekundarnih metabolita i kompatibilnih jedinjenja koja predstavljaju faktore tolerantnosti na različite tipove stresa i neophodni su za preživljavanje navedenih uslova. Metabolomika je grana funkcionalne genomike fokusirana na globalnu identifikaciju i profile akumulacije svih metabolita koji sačinjavaju metabolom (Yan i sar., 2022b). Kao i proteomika, i metabolomika je zasnovana na frakcionisanju kompleksnih metabolita, spektrometrijskoj identifikaciji i kvantifikaciji navedenih jedinjenja i sledujućim bioinformatičkim analizama.

Metaboliti su hemijski raznovrsna klasa, što znači da se metode izolacije i ekstrakcije razlikuju u zavisnosti od tipa jedinjenja (ekstrakcija uz pomoć mikrotalasa, ultra-zvuka, visokog napona, enzima ili čvrste faze) (Yan i sar., 2022b). Najčešće korišćene tehnike separacije metabolita jesu gasna hromatografija (GH), LC ili kapilarna elektroforeza (eng. *capillary electrophoresis*, CE) i kombinuju se sa metodama MS ili spektroskopije nuklearne magnetne rezonance (NMR) radi kvantifikacije i identifikacije metabolita. Identifikacija metabolita se najčešće zasniva na MS platformama visoke preciznosti i rezolucije – TOF (eng. *time of flight*), *Orbitrap* ili FT-ICR (eng. *Fourier transfer ion cyclotron resonance*). Nakon završene masene spektrometrije ili NMR, dobijeni podaci se moraju obraditi. U ovu svrhu su tokom poslednje dve decenije razvijeni mnogi softverski alati – *MET-COFEA* (Zhang i sar. 2014), *OpenMS* (Röst i sar. 2016), *NOREVA* (Fu i sar. 2022) i brojni drugi. Na kraju, obrađeni metaboliti su anotirani i njihovi maseni spektri mogu biti klasifikovani u određene baze podataka. Sve veći broj metabolomskih istraživanja omogućava priključivanje većeg broja novih jedinjenja navedenim bazama podataka što olakšava buduće identifikacije. Danas postoji veliki broj spektralnih baza podataka koje se mogu pretražiti – *NIST*, *METLIN*, *MassBank*, *mzCloud*, *GMD*, *ReSpect* (Yan i sar., 2022b). Prikaz koraka tokom metabolomske analize i metoda uključene u svaki od njih, je dat na Slici 1.12.

Prva metabolomska istraživanja aklimatizacije na niske temperature su zabeležena početkom 21. veka. Na primer, Cook i sar. (2004) su primenom GH-MS metode, ispitivali metabolomske promene tokom aklimatizacije kod dva ekotipa *Arabidopsis thaliana*, sa kontrastnom tolerantnošću na NT. Ipak, ranija istraživanja su bila manjeg opsega i rezolucije i broj identifikovanih jedinjenja je bio mali. Globalno profilisanje ukupnog metaboloma je počelo široko da se primenjuje u prethodnih petnaest godina i veliki je broj primera navedenog tipa istraživanja na različitim biljnim vrstama – pirinač (Zhang i sar., 2016a), paradajz (Barrero-Gil i sar., 2016), duvan (Song i sar., 2024). Ove metode su primenjivane i u malom broju istraživanja na kukuruzu (Urrutia i sar., 2021; Jiang i sar., 2023; Yu i sar., 2024).



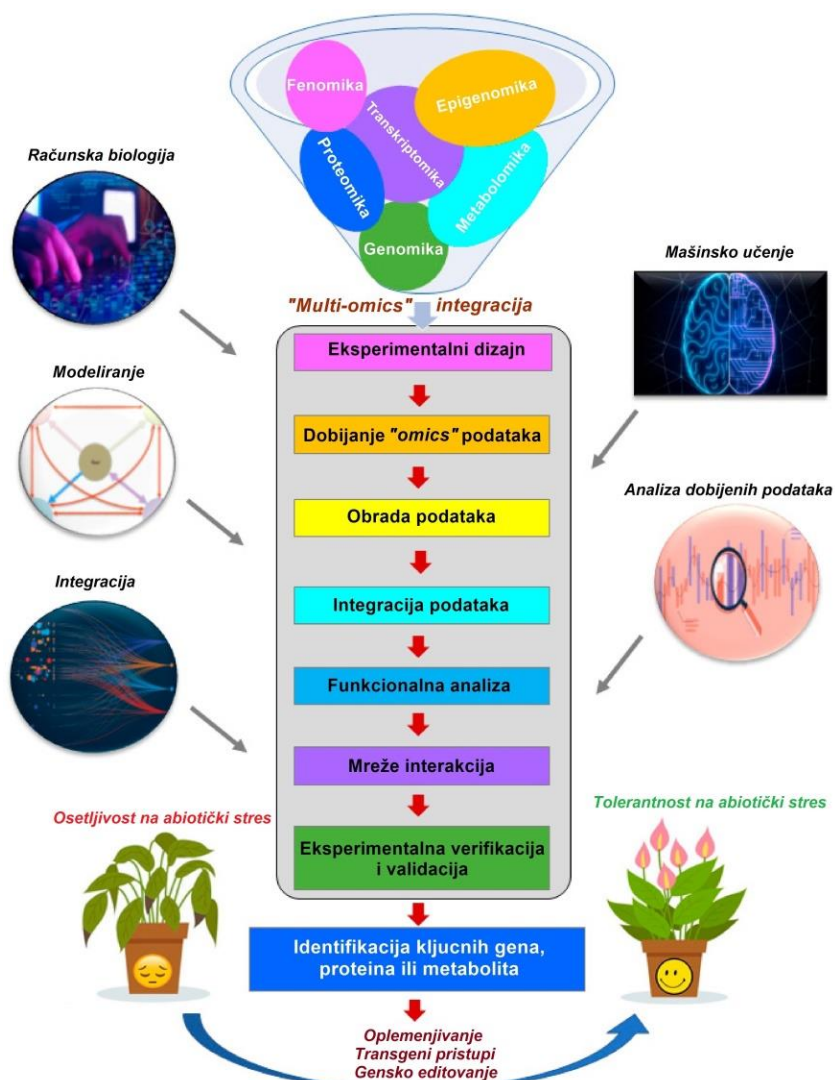
Slika 1.12 Osnovni koraci u metabolomskoj analizi. Preuzeto i modifikovano iz Yan i sar., (2022b).

#### 1.3.3.2.4. Integrativni pristupi genomike u proučavanju i unapređenju odgovora na niske temperature

Tokom protekle decenije, istraživanja zasnovana na sistemskoj biologiji su postala široko zastupljena (Sheth i Thaker, 2014), korišćenjem razvoja tehnologija „omika“ kroz integraciju i obradu podataka dobijenih metodama više grana ove oblasti (eng. *multiomics approach*) (Feussner i Polle 2015; Yan i sar., 2022b). Najčešće zastupljeni sistemski pristupi su integracija strukturne i funkcionalne genomike, kao i integrirani pristupi istraživanja celokupnog genoma-transkriptoma-proteoma-metaboloma.

Pod integracijom strukturne i funkcionalne genomike podrazumeva se primena QTL ili GWAS analiza sa tehnologijama transkriptomike, odnosno *RNA-seq*. Na primer, Goering i sar. (2021) su izabrali 97 linija kukuruza za QTL analizu osobina povezanih sa koncentracijom hlorofila, bojom listova i oštećenjem tkiva tokom tretmana niskim temperaturama. Autori su identifikovali dva QTL-a sa visokim aditivnim efektom i oni su dodatno verifikovani primenom transkriptomskih analiza, čime je identifikovano 13 kandidat gena uključenih u regulaciju odgovora na niske temperature. U poslednjih nekoliko godina česti su primeri integracije komparativne genomike i meta-QTL analize, odnosno podataka dostupnih iz literature i baza podataka. Na primer, Li i sar. (2024b) su kombinovanjem meta-QTL mapiranja tolerantnosti na niske temperature na osnovu podataka prikupljenih iz literature i komparativne transkriptomike

dve linije pirinča kontrastne tolerantnosti na NT identifikovali 75 DEG-ova unutar regiona devet MQTL-ova.



**Slika 1.13** Princip integrativnog „multi-omics“ pristupa i koraci koje obuhvata, prilikom primene u razvoju sorti tolerantnih na abiotički stres. Preuzeto i modifikovano iz Roychowdhury i sar., (2023).

Zajednička obrada genomskih, transkriptomskih, proteomskih i metabolomskih podataka različitim bioinformatičkim alatima se smatra jednom od najperspektivnijih strategija za sveobuhvatno razumevanje kompleksnih procesa kod biljaka, uključujući odgovor na stres (Zhang i sar., 2024a). „Multi-omics“ pristup se široko primenjuje kod različitih useva za ispitivanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi tolerantnosti na abiotički stres, a koji su potrebni za stvaranje tolerantnih sorti (Duruflé i Déjean, 2023). Nakon završenog eksperimenta i dobijanja ogromnog broja *WGS*, *RNA-Seq*, proteomskih i metabolomskih podataka i provere njihovog kvaliteta, moguće je uraditi njihovu integraciju različitim komputacionim metodama zasnovanim na korelaciji ili algoritmima mašinskog učenja (eng. *machine learning*, ML). Razvijen je i veliki broj alata i baza podataka koji u tome pomažu – *OMICTools* (Henry i sar., 2014), *COLOMBOS* (Shafi i Zahoor, 2019), *OmicsDI* (Perez-Riverol i sar., 2017) i drugi. Za interpretaciju integrisanih podataka u cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi bioloških procesa kao što je tolerantnost na niske temperature su neophodne funkcionalne analize. Navedeni korak može podrazumevati GO analize, funkcionalno obogaćivanje bioloških puteva, funkcionalnu anotaciju gena, proteina i metabolita (Khan i sar., 2023). Na kraju, na

osnovu svih dobijenih podataka mogu se konstruisati biološke mreže koje obuhvataju interakcije između svih analiziranih molekula, što može pomoći u identifikaciji ključnih gena uključenih u odgovor na stres (Roychowdhury i sar., 2023). Princip integrativnog „*multi-omics*“ pristupa i koraci koje obuhvata su prikazani na Slici 1.13.

Prva istraživanja integracije ovih tehnologija su uključivala samo dva tipa podataka – transkriptom i proteom ili transkriptom i metabolom. Na primer, Jiang i sar. (2021) su istraživali odgovor transkriptoma i metaboloma na niske temperature kod kukuruza i identifikovali preko 10.000 DEG-ova i 87 DEM-ova. Sa druge strane, brojni su i primeri integrisanih istraživanja proteoma i transkriptoma (Yan i sar., 2022b). Na primer, Mehmood i sar. (2021) su identifikovali 55 diferencijalno eksprimiranih proteina čija je ekspresija u vezi sa 139 DEG-ova tokom odgovora na niske temperature kod uljane repice. U skorije vreme *multi-omics* istraživanja sa primenom više od dva tipa podataka su sve zastupljenija i u najvećem broju slučajeva reč je o transkriptomskim podacima, integrisanim sa proteomskim i metabolomskim. Odgovor na stres izazvan niskim temperaturama još uvek nije proučavan ovim pristupom ni kod jedne vrste. Ipak, primenjen je u istraživanju drugih tipova abiotičkog stresa – stresa izazvanog visokim temperaturama kod *Simmondsia chinensis* (Zheng i sar., 2022), stresa izazvanog povećanom koncentracijom soli u zemljištu kod soje (Fu i sar., 2024), stresa suše kod pirinča (Dwivedi i sar., 2022). Kod kukuruza navedeni pristup je primenjivan u istraživanju odgovora lista na osmotski stres (Niu i sar., 2024).

#### **1.4. Perspektive i budući pristupi u proučavanju odgovora na abiotički stres**

Istraživanja pokazuju da se efekti klimatskih promena neće smanjiti u bliskoj budućnosti, već da će se svaki region sve češće suočavati sa istovremenim i složenim uticajima navedenih klimatskih faktora, sa povećanom učestalošću kombinovanih ekstremnih vremenskih događaja, kao što su toplotni talasi i suše (Jing i sar., 2024). Nepredvidivo preplitanje raznovrsnih faktora stresa, koji istovremeno ili sukcesivno utiču na biljke, povećavaju složenost životne sredine. Stoga će veliki udeo budućih istraživanja posledica klimatskih promena na biljke podrazumevati proučavanje kombinovanog efekta više faktora stresa. U poslednjih nekoliko godina broj istraživanja fokusiran na navedenu problematiku je povećan. Analize pojedinačnog uticaja specifičnih faktora stresa i njihovog kombinovanog delovanja su pokazale da kombinovan efekat faktora stresa inicira specifične signalne puteve, koji nisu bili aktivirani od strane pojedinačnih stresora (Jing i sar., 2024). Dakle, očekuje se da će istraživanja multifaktorskih kombinacija stresora, odnosno delovanja tri ili više faktora stresa, biti značajno zastupljenija u budućnosti (Jing i sar., 2024).

Kada je reč o metodama proučavanja odgovora i tolerantnosti na bilo koji abiotički faktor stresa, smatra se da će dodatna proširenja u „*omics*“ istraživanjima značajno doprineti još sveobuhvatnijem razumevanju ovog fenomena. Na primer, u poslednjih par godina je došlo do velikog napretka u razvoju jonomike, koji omogućavaju primenjivanje podataka dobijenih i ovom metodom u GWAS analizama (Varadharajan i sar., 2025). Jonomika se bavi proučavanjem jonoma, odnosno ukupnog sadržaja mineralnih elemenata u organizmu, i najčešće je integrisana sa transkriptomskim ili genomskim podacima (Varadharajan i sar., 2025). Navedenim analizama se dobijaju podaci o jonskim profilima, čijim ispitivanjem se mogu pratiti varijacije u apsorpciji nutrijenata, npr. u uslovima stresa (Roychowdhury i sar., 2023; Raza i sar., 2024b). Do sada nisu objavljeni rezultati velikog broja istraživanja primenom ove metode kada je u pitanju stres kod biljnih organizama. Na primer, Bahraminia i sar. (2020) su primenom jonomike integrisane sa metabolomikom pratili odgovor biljaka kukuruza inokuliranih sa *Funneliformis mosseae* tokom vodnog deficita. Nije pronađeno nijedno istraživanje primene ove metode u cilju proučavanja

odgovora na niske temperature, što pokazuje da oblast jonomike još uvek nije dovoljno istražena. Veliki napredak je postignut i u oblastima epigenomike, lipidomike i mikrobiomike, a istraživanja abiotičkog stresa primenom ovih metoda nisu još uvek značajno zastupljena. Na primer, prvo istraživanje praćenja epigenetičkih promena kroz generacije biljaka *Arabidopsis thaliana* izloženih niskim temperaturama primenom epigenomskih metoda su objavili Rahman i sar. 2024. godine. S obzirom na značaj promena u lipidnom sastavu membrana tokom aklimatizacije na niske temperature, razvoj metoda lipidomike bi značajno doprineo razumevanju tog procesa, na čemu se radi poslednjih nekoliko godina (Zhang i sar., 2020a; Gao i sar., 2024a). Proučavanje mikrobioma u zemljištu i njihove interakcije sa različitim vrstama useva se takođe intenzivno sprovodi poslednjih godina radi povećanja produktivnosti i prinosa, kao i odgovora na abiotički stres. Rizobakterije koje promovišu rastenje biljaka (eng. *plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR) pomažu u apsorpciji različitih nutrijenata iz podloge, proizvodeju metabolite koji potpomažu rastenje biljaka, a takođe mogu biti značajni za smanjenje negativnih posledica abiotičkog stresa (Kumar i sar., 2021). Na primer, Jha i sar. (2021) su izučavali značaj inokulacije korena kukuruza sa nekoliko vrsta psihrotrofnih PGPR, odnosno bakterija adaptiranih na temperature od -20 do 0°C, u poboljšanju odgovora na niske temperature. Zaključili su da psihrotrofne PGPR pozitivno utiču na efikasan odgovor na niske temperature. Ovakvi primeri su brojni kod više biljnih vrsta izloženih različitim abiotičkim faktorima stresa, što ukazuje na to da ovakav pristup može značajno povećati tolerantnost na abiotički stres, pa su neophodna i opširnija istraživanja, koja se polako razvijaju. Pod mikrobiomikom se podrazumevaju genomska, transkriptomaska, metabolomska i proteomska istraživanja i biljne vrste i mikrobioma sa kojim je u simbiozi i proučavanje interakcija koje se formiraju i funkcija kojima doprinose (Kumar i sar., 2021).

Sa razvojem metoda veštačke inteligencije (eng. *artificial intelligence*, AI) i mašinskog učenja, očekuje se i njihova sve veća primena u proučavanju abiotičkog stresa kod biljaka. Ove tehnologije su već primenjene u nekim bioinformatičkim alatima. Na primer, DL (eng. *deep learning*) modeli poput ESM-2, DNABERT-2, i MSA Transformer mogu ekstrahovati nove informacije o protein/DNK strukturi, funkciji i evoluciji (Zhang i sar., 2024b). *AlphaFold2* pruža strukturni uvid u interakcije proteina stresa (del Alamo i sar., 2022) i *ab initio* 3D određivanje strukture liganda u proteinima za *de novo* molekularni dizajn (Krishna i sar., 2024). AI i ML mogu biti primenjeni u različitim koracima proučavanja abiotičkog stresa kod biljaka – u detekciji stresa tokom fenotipizacije, obradi podataka dobijenih „omics“ tehnologijama, predikciji interakcija. Napredak u AI i ML je omogućio razvoj visokopropusnih aparata kao što su „imaging“ senzori visoke rezolucije, sateliti i bespilotne letelice. Primena AI i ML u obradi podataka dobijenih ovim aparatima bi bila značajno unapređenje u odnosu na pojedinačne vizuelne inspekcije (Gou i sar., 2024; Walsh i sar., 2024). Ipak, AI i ML se i dalje suočavaju sa određenim izazovima. Na primer, varirajući uslovi životne sredine i varirajući odgovori biljaka su otežavajući faktori za obučavanje modela koji bi precizno i efikasno detektovao i kategorizovao promene izazvane abiotičkim stresom. Još jedan ključni problem je primetan nedostatak raznovrsnih setova podataka visokog kvaliteta potrebnih za obuku i procenu modela veštačke inteligencije (Walsh i sar., 2024). Najveći efekat AI i ML potencijalno imaju u obradi veoma velikih setova podataka koji se generišu kroz „omics“ tehnologije (Zhang i sar., 2024b). ML algoritmi precizno analiziraju osobine biljaka na koje utiču interakcije genotip-sredina bez potrebe za obeleženim setovima podataka. Algoritmi poput stabla odlučivanja (eng. *decision tree*) se ističu u genomskom predviđanju i integrativnoj „omics“ analizi. U transkriptomici, mašinsko učenje unapređuje identifikaciju DEG-ova. Efikasnost ML u multivarijantnoj analizi omogućava otkrivanje biomarkera i prediktivno modeliranje. Probabilistički grafički modeli, poput GENIST i JRmGRN,

značajno olakšavaju konstrukcije mreža interakcije. AI i ML modeli mogu pomoći u identifikaciji ključnih gena tolerantnosti na neki stres i optimizaciji programa oplemenjivanja (Zhang i sar., 2024b). S obzirom na sve navedeno, „omics“ tehnologije potpomognute AI tehnikama imaju potencijal da naprave revoluciju u istraživanju različitih fenomena kod biljaka, kao i poljoprivredi. Integracija „multi-omics“ podataka, tehnologije velikih podataka (eng. *big data technology*), AI i robusne bioinformatičke analize kroz pristupe kao što je integrisano predviđanje genomskog okruženja (eng. *integrated genomic-environs prediction*) može ubrzati programe oplemenjivanja biljaka i poboljšati genetičke dobitke. Međutim, praktična primena AI zahteva robusne algoritme, eksperimentalnu validaciju i saradnju između istraživača, poljoprivrednih stručnjaka i inženjera odgovornih za podatke.

Potencijalno veliki doprinos ubrzanom razvoju poljoprivrede, pre svega razvijanju sorti i genotipova tolerantnih na različite faktore stresa, ima i precizno gensko editovanje (eng. *gene editing*). Preciznost i efikasnost ove metode omogućavaju ubrzavanje ciklusa oplemenjivanja, što obezbeđuje brže adaptacije na promenljive klimatske uslove. Takođe, mogu pozitivno uticati na prinos i kvalitet proizvodnje, a smatraju se i održivim (Varadharajan i sar., 2025). Najveća prepreka je zakonska regulativa koja se odnosi na genetički inženjering. Smatra se da bi se metode genskog editovanja lakše legalizovale na globalnom nivou, u poređenju sa tradicionalnim tehnikama genetičkog inženjeringa, jer njihovi ishodi nalikuju prirodnim mutacijama (Varadharajan i sar., 2025). Integracija genskog editovanja sa drugim tehnologijama kao što su precizna poljoprivreda i MAS, može dodatno amplifikovati njegov uticaj stvarajući sistemske strategije za poboljšanje učinka useva i održivosti. Najveći potencijal pokazuju CRISPR/Cas tehnologije, zbog mogućnosti izvođenja multipleksnog editovanja genoma, koje nudi mogućnost za poboljšanje složenih osobina i pojednostavljivanje programa oplemenjivanja. Razvoj unapređenih alata i metodologija će poboljšati pouzdanost i bezbednost ovog pristupa kada je u pitanju primena u poljoprivredi što će potencijalno uticati na njihovu legalizaciju i širu primenu.

## **2. Cilj rada**

Cilj doktorske disertacije je rasvetljavanje mehanizama tolerantnosti genotipova kukuruza na stres niskim temperaturama u ranim fazama razvika – faza nicanja (VE). Da bi se ostvario postavljeni opšti cilj, definisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

1. Utvrđivanje nivoa osetljivosti, odnosno tolerantnosti, na niske temperature u ranim vegetativnim fazama samooplodnih linija kukuruza, roditeljskih komponenti komercijalnih hibrida Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ na osnovu morfoloških (masa, dužina, stopa preživljavanja), fizioloških (sadržaj pigmenata, aktivnost antioksidativnih enzima, efikasnost fotosinteze) i biohemijskih parametara (sadržaj fenolnih jedinjenja, šećera i šećernih alkohola);
2. Sekvenciranje celokupnog transkriptoma klijanaca starih pet dana izabrane dve linije kukuruza kontrastne osetljivosti na niske temperature ( $L_s$  i  $L_T$ );
3. Identifikacija diferencijalno eksprimiranih poznatih ili novootkrivenih gena uključenih u odgovor na stres niskih temperatura;
4. Identifikacija, kvantifikacija i analiza ekspresije dugih nekodirajućih RNK, uz predikciju ciljnih gena;
5. Identifikacija, kvantifikacija i analiza ekspresije cirkularnih RNK, uz predikciju ciljnih gena;
6. Identifikacija, kvantifikacija i analiza ekspresije već poznatih ili potencijalno novih mikroRNK, uz predikciju ciljnih gena i drugih klasa RNK;
7. Konstrukcija mreža interakcija između gena i navedenih klasa RNK.

### **3. Materijal i metode**

#### **3.1. Biljni materijal**

Ispitivanje tolerantnosti većeg broja genotipova kukuruza na stres izazvan niskim temperaturama je izvršeno radi odabira dva kontrastne tolerantnosti na niske temperature: genotipa koji se pokazao kao najosetljiviji, i genotipa koji se pokazao kao najtolerantniji. Za eksperiment je izabrano šest linija kukuruza (L1-L6), komponenti komercijalnih hibrida Instituta za kukuruz „Zemun Polje“. Linije L1-L3 pripadaju Lankaster heterotičnoj grupi, dok se linije L4-L6 razlikuju po poreklu: L4 pripada *Iowa dent*, L5 *Iowa Stiff Stalk Synthetic* (BSSS)/*Iowa dent*, i L6 *Iowa Stiff Stalk Synthetic* (BSSS) heterotičnoj grupi. Na osnovu tipa zrna, linije su klasifikovane na zubane (eng. *dent*) (L1 - L4) i poluzubane (eng. *semi-dent*) (L5, L6). Takođe, ovih šest linija je na osnovu iskustva stečenog postavkom ogleđa u polju, podeljeno na visoko-tolerantne (L1, L6), umereno-tolerantne (L4, L5) i osetljive na abiotički stres – suša i niske temperature (L2, L3). Karakteristike izabranih linija su prikazane u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Opis linija (L1-L6) korišćenih u određivanju tolerantnosti na niske temperature.

Oznaka linije	Heterotična grupa	Tip zrna	Tolerantnost na abiotički stres
L1	Lankaster	Zuban	Visoko tolerantna
L3	Lankaster	Zuban	Osetljiva
L3	Lankaster	Zuban	Osetljiva
L4	<i>Iowa dent</i>	Zuban	Umereno-tolerantna
L5	<i>Iowa Stiff Stalk Synthetic</i> (BSSS)/ <i>Iowa dent</i>	Polu-zuban	Umereno-tolerantna
L6	<i>Iowa Stiff Stalk Synthetic</i> (BSSS)	Polu-zuban	Visoko tolerantna

#### **3.2. Određivanje tolerantnosti na niske temperature i odabir genotipova kukuruza za analizu transkriptoma**

##### **3.2.1. Germinacija i tretman niskim temperaturama odabranih genotipova kukuruza**

Provera tolerantnosti na niske temperature kukuruza u ranim fazama razvića je urađena na klijancima starim pet dana. Semena odabranih šest linija kukuruza (L1-L6) su sterilisana potapanjem u 10% rastvor natrijum-hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina). Proces sterilizacije je trajao deset minuta, nakon čega su semena ispirana destilovanom vodom pet puta. Isključavanje se odvijalo u plastičnim kutijama za naklijavanje. Na dno svake kutije je postavljen filter papir, natopljen vodom do zasićenja. Na filter papir je ravnomerno raspoređeno po 30 zrna od svakog ispitivanog genotipa po kutiji. Semena su pokrivena još jednim slojem filter papira, natopljenog vodom do zasićenja, i kutije su zatvorene poklopcem. Germinacione kutije sa semenima su zatim postavljene u klijalište (*MLR-352H-PE Climate Chamber, PHC Europe B.V.*, Holandija) i germinacija je trajala pet dana, u mraku, pri optimalnim temperaturama – 25/20°C (12/12h) i relativnoj vlažnosti vazduha (RV) 75%.

Eksperiment u kome je ispitavana tolerantnost na niske temperature odabranih šest genotipova je izveden u tri ponavljanja sa 30 klijanaca po ponavljanju. Nakon završene germinacije, klijanci stari pet dana su tretirani niskim temperaturama (T) u trajanju od 24 sata. Eksperiment je postavljen uz primenu sledećih parametara: temperatura 10/8°C (dan/noć), fotoperiod u trajanju od 12 sati (12/12h svetlo/mrak), intenzitet svetlosti (IS) 700  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  i RV 75%. Nakon završenog tretmana izračunata je stopa preživljavanja, SP, kao odnos broja klijanaca koji su preživeli tretman i ukupnog broja klijanaca i izražen je u procentima (%).

Od svakog genotipa je izdvojeno deset klijanaca po ponavljanju za merenje morfoloških parametara. Ostatak klijanaca je zasađen u saksije, koje su sadržale smešu zemlje (*Floragard® TKS1 substrat*, Nemačka) i peska u odnosu 3:1, i postavljene u klijaliste na period oporavka u optimalnim uslovima (25/20°C, 12/12h svetlo/mrak, IS 700  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , RV 75%), u trajanju od sedam dana. Nakon oporavka je izdvojeno deset klijanaca po ponavljanju od svakog genotipa za merenje morfoloških parametara. Fiziološki parametri su izmereni na preostalim biljkama svakog genotipa (deset biljaka po ponavljanju).

Kontrolne biljke (C) svih šest linija su uzgajane u optimalnim uslovima (25/20 °C, 12/12h svetlo/mrak, IS 700  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , RV 75%) u istom vremenskom periodu kao i tretirane, i uzorkovane su u istim vremenskim tačkama.

### **3.2.2. Ispitivanje parametara tolerantnosti na niske temperature**

#### ***3.2.2.1. Analiza morfoloških parametara***

Nakon završenog tretmana, deset biljaka po ponavljanju je izdvojeno za ispitivanje morfoloških parametara klijanaca starih pet dana, koji su obuhvatili: svežu masu klijanca (SM), dužinu radikule ( $D_{\text{rad}}$ ) i dužinu koleoptila ( $D_{\text{kol}}$ ). Pre merenja je izvršeno odstranjivanje ostataka kariopsisa, odnosno zrna klijanaca. SM je izmerena na analitičkoj vagi (*AS 220 R.2, Radwag*, Poljska), dok su  $D_{\text{rad}}$  i  $D_{\text{kol}}$  izmereni lenjirom.  $D_{\text{rad}}$  je izmeren i izračunat kao dužina od mezokotila do vrha radikule, začetka osnovnog korena, a  $D_{\text{kol}}$  kao dužina od mezokotila do vrha koleoptila.

Ostatak biljaka je postavljen na oporavak, i nakon sedam dana izmereni su sledeći morfološki parametri: sveža masa korena (MK) i izdanka (MI), dužina korena (DK) i izdanka (DI), suva masa korena (SMK) i izdanka (SMI). Klijaneci su izvađeni iz supstrata i presečeni na dva dela: koren (primarni i adventivni korenovi) i izdanak (mezokotil, ostaci koleoptila i listovi). Koren svake biljke je dobro opran vodom pre daljeg merenja. Dužine korena i izdanka su izmerene lenjirom: DK je obuhvatila samo osnovni koren (od kraja mezokotila do vrha osnovnog korena), a DI dužinu od osnove hipokotila do vrha poslednjeg razvijenog lista. Za merenje MK i SMK je iskorišćen ceo koren, a za MI i SMI ceo izdanak. Sveže mase su izmerene odmah nakon uzorkovanja, a suve nakon što su koren i izdanak držani u sušnici u 24h na 110°C (*DRYSC225, coloLabExperts*, Slovenija). Za sve izmerene parametre izračunate su srednje vrednosti. Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

#### ***3.2.2.2. Analiza fizioloških parametara***

Analize fizioloških parametara za tolerantnost na niske temperature su obuhvatile merenje indeksa sadržaja hlorofila (*chl*), antocijanina (*anth*), i flavonola (*flav*), za šta je korišćen aparat *Dualox Scientific (Force-A, Francuska)*. *Dualox* je ručni, optički senzor za nedestruktivnu kvantifikaciju relativnog sadržaja biljnih pigmenta u listovima. Sadržaji navedenih metabolita su prikazani kao indeksi apsorpcije, izmereni i izračunati kao razlika u optičkoj transmisiji na dve talasne dužine u infra-crvenom delu spektra (780-2500 nm). Merenja su obavljena na srednjem položaju poslednjeg potpuno razvijenog lista. Za sve izmerene parametre izračunate su srednje vrednosti. Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### **3.2.3. Izbor genotipova kukuruza za dalje eksperimentalne analize**

Tolerantnost šest linija kukuruza na niske temperature je ispitana na tri nivoa: stopa preživljavanja, parametri izmereni odmah nakon završenog tretmana niskim temperaturama i parametri izmereni nakon oporavka. Veća važnost za procenu tolerantnosti je data parametrima

izmerenim odmah nakon završenog tretmana niskim temperaturama (prva dva nivoa potvrde), jer se u tom trenutku klijanci nalaze u životnoj fazi u kojoj bi bili izloženi ovom faktoru stresa tokom rane setve. Parametri izmereni nakon oporavka su smatrani dodatnom potvrdom zaključaka donetih na osnovu prva dva nivoa procene.

Linija izabrana kao osetljiva će nadalje biti obeležena kao  $L_S$ , dok će ona izabrana kao tolerantna biti obeležena sa  $L_T$ .

### **3.3. Biohemijska i fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature tolerantnog ( $L_T$ ) i osetljivog ( $L_S$ ) genotipa kukuruza**

Izabrani genotipovi,  $L_T$  i  $L_S$ , su dodatno biohemijski i fiziološki okarakterisani, radi potvrde njihove kontrastne tolerantosti, odnosno osetljivosti na niske temperature. Biohemijska karakterizacija je obuhvatila određivanje ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida, određivanje sadržaja pojedinačnih šećera i šećernih alkohola, kao i pojedinačnih fenola i fenolnih kiselina. Sa druge strane, fiziološka karakterizacija je obuhvatala ispitivanje nivoa oštećenja membranskih sistema preko merenja nivoa lipidne peroksidacije, ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima (POD, APX, GPX, SOD i CAT) i merenje fotosintetske efikasnosti.

Eksperiment tretmana niskim temperaturama izabranih genotipova je postavljen na isti način kao i prvobitni eksperiment (3.2.1. *Germinacija i tretman niskim temperaturama odabranih genotipova kukuruza*). Biohemijske analize i deo fizioloških analiza (nivo lipidne peroksidacije, aktivnost antioksidativnih enzima) su urađene na uzorcima klijanaca starih pet dana odmah nakon završenog tretmana niskim temperaturama, dok je ispitivanje fotosintetske efikasnosti urađeno nakon sedam dana oporavka. Eksperiment je izveden u šest ponavljanja sa po 30 klijanaca po ponavljanju, za oba genotipa – tri ponavljanja su odvojena za uzorkovanje odmah nakon završetka tretmana, a tri su prvo postavljena na oporavak. Svi klijanci uzorkovani odmah nakon završetka tretmana, koji pripadaju jednom ponavljanju, su grupisani u jedan grupni uzorak (eng. *bulk*): tri uzorka po genotipu i tretmanu. Pojedinačni uzorak je bio ceo klijanac (radikula, hipokotil i koleoptil), bez kariopsisa. Svaki uzorak je zamrznut i sprasjen u tečnom azotu, korišćenjem tučka i avana i zatim odložen u zamrzivač na  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalje upotrebe.

Kontrolne biljke oba genotipa su gajene u optimalnim uslovima u istom periodu kao i tretirane, i uzorkovane u istim vremenskim tačkama (odmah nakon tretmana i nakon perioda oporavka).

#### **3.3.1. Biohemijska karakterizacija**

##### **3.3.1.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola**

Ukupan sadržaj fenola je određen sprektrofotometrijski, prema metodi razvijenoj od strane Waterhouse (2002) i Burgos i sar. (2013). Ovaj tip metode je zasnovan na redukciji Folin–Ciocalteu reagensa (FCR) fenolnim jedinjenjima u baznoj sredini, u kojoj dolazi do bojenja rastvora plavom bojom, sa maksimumom apsorpcije na 765 nm.

Izmeren je 1 g samlevenog biljnog tkiva i rastvoren u 10 mL 80% metanola. Fenolna jedinjenja su ekstrahovana procesom sonifikacije u metanolu u trajanju od deset minuta (*Branson, CT, SAD*). Tube sa uzorcima su centrifugirane 5 min na  $2000 \times G$  (*5804/ 5804 R, Eppendorf, Nemačka*) i gornja faza je odvojena. Proces ekstrakcije je ponovljen korišćenjem istog rastvarača uz dodatno zagrevanje na  $80^{\circ}\text{C}$  u trajanju od pet minuta. Nakon centrifugiranja, gornja faza je odvojena i pomešana sa prethodno odvojenom gornjom fazom, čime je formiran ukupan metanolski ekstrakt. Metanolski ekstrakt je profiltriran kroz filter-papir i dodavanjem 80% metanola zapremina je dopunjena do 25 mL. Zapremina od 400  $\mu\text{L}$  metanolskog ekstrakta je

odvojena i razblažena duplo destilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O), tako da je konačan odnos bio 1:20. Nakon toga, razblaženom uzorku je dodato 500 µL FCR (2N) i inicirana reakcija se odvijala u trajanju od šest minuta u odustvu svetlosti, na sobnoj temperaturi. Zatim je dodato 1500 µL zasićenog natrijum karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) i uzorak je inkubiran na 40°C u trajanju od 30 minuta, takođe u mraku. Apsorbanca (A) ovog rastvora je izmerena na talasnoj dužini od 765 nm korišćenjem UV-1800 UV-VIS spektrofotometra (*Shimadzu USA Manufacturing Inc, SAD*). Kao slepa proba (blank) je korišćena ultra čista, odnosno *milliQ* voda (*milli-Q® IQ 7003, Merck, Nemačka*) umesto alikvote uzorka. Ukupan sadržaj fenola je izračunat korišćenjem standardne (kalibracione) krive galne kiseline, sa opsegom koncentracija (Konc.) od 100 to 1500 mg/mL, po sledećoj formuli:

$$A = 0,011 \times \text{Konc.} - 0,056$$

Koeficijent linearnosti standardne krive (R<sup>2</sup>) je iznosio 0,999. Ukupan sadržaj fenola je izražen kao miligrami (mg) ekvivalenta galne kiseline (eng. *gallic acid equivalents, GAE*) po gramu (g) uzorka. Analiza je urađena u tri ponavljanja i izračunate su srednje vrednosti ovih ponavljanja. Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti p < 0,05.

### **3.3.1.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida**

Za analizu ukupnog sadržaja flavonoida primenjena je metoda razvijena od strane Meyers i sar. (2003) i Kostić i sar. (2021). Metoda se zasniva na formiranju žuto obojenog kompleksa između flavonoida i jona aluminijuma (Al<sup>3+</sup>) sa maksimumom apsorpcije na 510 nm.

Kao i pri određivanju ukupnog sadržaja fenola, 1 g samlevenog biljnog tkiva je rastvoren u 10 mL 80% metanola i ukupni flavonoidi su ekstrahovani na isti način: prvobitna sonifikacija u trajanju od deset minuta i dodatna sonifikacija uz zagrevanje na 80°C u trajanju od pet minuta. Gornje faze su sjedinjene, profiltrirane i prilagođene zapremini od 25 mL dodavanjem 80% metanola. Metanolski ekstrakt je potom razblažen: u 125 µL metanolskog ekstrakta dodato je 625 µL ddH<sub>2</sub>O i 37,5 µL 5% natrijum nitrita, (NaNO<sub>2</sub>). Nakon šest minuta, dodato je 75 µL 10% aluminijum hlorida (AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) i uzorci su ostavljeni u mraku dodatnih pet minuta za odvijanje reakcije. U uzorke je potom dodato po 250 µL natrijum hidroksida (NaOH) i 138 µL ddH<sub>2</sub>O i uzorci su dobro promešani. Intenzitet dobijene boje je meren na talasnoj dužini 510 nm korišćenjem UV-1800 UV-VIS spektrofotometra (*Shimadzu USA Manufacturing Inc, SAD*). Kao slepa proba (blank) je korišćena *milliQ* voda, u istoj zapremini kao i uzorak. Ukupan sadržaj flavonoida je izračunat korišćenjem standardne (kalibracione) krive kvercetina, u opsegu Konc. od 50 to 1000 mg/mL, po sledećoj formuli:

$$A = 0,01069 \times \text{Konc.} - 0,001163$$

Koeficijent linearnosti standardne krive (R<sup>2</sup>) je iznosio 0,999. Rezultati su prikazani kao miligrami kvercetina (QE) po gramu uzorka (mg QE/g). Analiza je urađena u tri ponavljanja i izračunate su srednje vrednosti ovih ponavljanja. Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti p < 0,05.

### **3.3.1.3. Određivanje sadržaja pojedinačnih šećera i šećernih alkohola**

Sadržaj pojedinačnih šećera je određen i kvantifikovan korišćenjem visoko-efikasne anjonske hromatografije sa elektrohemijomskom detekcijom, HPAEC-PAD (eng. *High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*), kalibrisane standardnim rastvorima različitih šećera i šećernih alkohola.

Ekstrakcija šećernih jedinjenja je izvršena primenom metode razvijene za analizu semena breskve (Stanojević i sar., 2015) dodatno modifikovanim za klijance kukuruza po Waisi i sar. (2018). Samleveni uzorci klijanaca kukuruza su osušeni u laboratorijskoj rerni (*Carbolite Gero, GmbH & Co. KG*, Nemačka) na 130°C. Nakon toga, 0,25 g uzorka kukuruza je suspendovano u 5 ml ddH<sub>2</sub>O. Ekstrakcija je izvršena ultra-sonifikacijom u trajanju od 30 minuta, nakon čega su uzorci centrifugirani pri brzini 6000 × G deset minuta (5804/ 5804 R, *Eppendorf*, Nemačka). Gornja faza je odvojena i prebačena u novu epruvetu, a proces ekstrakcije je ponovljen još jednom. Gornje faze su zatim objedinjene i profiltrirane kroz filter sa 0,45 µm poli-tetra-fluoro-etilenskom membranom (*Supelco, Bellefonte, SAD*). Odeok od 1 mL ovog rastvora je prebačen u vijale za automatsko uzorkovanje aparata.

Kalibracija aparata i formiranje standardnih kriva različitih šećera i šećernih alkohola su urađene korišćenjem standardnih rastvora glukoze, saharoze, fruktoze, rafinoze, stahioze, trehaloze, galaktoze, sorbitola, inozitola, eritritola i manitola (*Tokyo Chemical Industry, TCI, Europe*, Belgija). Svaki pojedinačni standard je rastvoren u *milliQ* H<sub>2</sub>O i osnovni rastvori su pripremljeni u koncentracijama 1000 ng/mL. Osnovni rastvor svakog šećera i šećernog alkohola je zatim razblažen sa *milliQ* H<sub>2</sub>O u opsezima koncentracija specifičnim za svako jedinjenje (opseg od 0,9 do 100 ng/mL u zavisnosti od koncentracije u uzorku) čime se dobijaju kalibracioni standardi koji su iskorišćeni za formiranje kalibracione krive.

Hromatografsko razdvajanje šećera i šećernih alkohola je obavljeno na ICS 3000 DP hromatografskom sistemu (*Dionex, SAD*), opremljenom kvaternarnom gradijentnom pumpom (*Dionex, SAD*). Jedinjenja su razdvojena na *Carbo Pac<sup>®</sup>PA 100* sfernoj anjon-izmenjivačkoj koloni (4 × 250 mm, veličina čestica: 8,5 µm, veličina pora: mikropore, < 10 Å) na 30°C. Mobilne faze u HPAEC-PAD analizi su sadržale sledeća jedinjenja: A (600 mM natrijum-hidroksid, NaOH), B (500 mM natrijum-acetat, Na(CH<sub>3</sub>COO) • 3 H<sub>2</sub>O) i C (*milliQ* H<sub>2</sub>O). Procenat mobilnih faza A, B i C je linearno, postepeno menjan tokom analize, sa protokom 0,7 mL/min:

- 0–5 min. – 15% A, 85% C;
- 5,0–5,1 min. – 15% A, 2% B, 83% C;
- 5,1–12,0 min. – 15% A, 2% B, 83% C;
- 12,0–12,1 min. – 15% A, 4% B, 81% C;
- 12,1–20,0 min. – 15% A, 4% B, 81% C;
- 20,0–20,1 min. – 20% A, 20% B 60% C;
- 20,1–30,0 min. – 20% A, 20% B 60% C.

Pre analize, sistem je pripremljen sa 15% A, 85% C, tokom 15 minuta. Svaki uzorak je u zapremini od 25 µL injektovan u hromatografski sistem pomoću ICS AS-DV 50 (*Dionex, SAD*), dela sistema koji vrši automatsko uzorkovanje. Pulsno-amperometrijski, elektrometrijski detektor činile su radna, zlatna elektroda, i referentna, Ag/AgCl elektroda (Stanojević i sar., 2015). Rezultati su prikazani kao masa šećera ili šećernog alkohola (g) prisutna u 100 g biljnog uzorka. Analiza je urađena u tri ponavljanja i izračunate su srednje vrednosti. Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti p < 0,05.

#### **3.3.1.4. Određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina**

Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina je određen i kvantifikovan primenom ultra-visokoefikasne tečne hromatografije spregnute sa detektorom umreženih fotodioda i hibridnim masenim spektrometrom (UHPLC–DAD MS/MS) kalibrisanim standardnim rastvorima fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina od interesa.

Ekstrakcija svih fenolnih jedinjenja je urađena prethodno opisanim metodama prema Radović i sar. (2020) i Pantelić i sar., (2016). Samleveni klijanci (8 g) su rastvoreni u 50 mL metanola sa 0,1% hlorovodoničnom kiselinom (HCl) i tokom jednog sata mešani na magnetnoj mešalici (*AMTAST Basic, TLEAD, NRK*), na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su ostavljeni na 4°C, u mraku u trajanju od 24 časa, a zatim su filtrirani i providna gornja faza je odvojena. Ekstrakcioni proces je ponovljen još dva puta i sve gornje faze su sjedinjene i uparene do suvog ostatka pod smanjenim pritiskom na 40°C pomoću vakuum uparivača (*IKA RV 10 Basic, NRK*). Suvi ostatak je rastvoren u smeši metanola i vode (60:40) do zapremine od 50 mL. Sve ekstrakcije su obavljene u tri ponavljanja i ekstrakti su profiltrirani kroz filter sa 0,45 µm poli-tetra-fluoro-etilenskom membranom (*Supelco, Bellefonte, SAD*).

Osnovni rastvori korišćenih standarda fenolnih jedinjenja, koncentracije 1000 mg/L, su pripremljeni rastvaranjem standardnih jedinjenja u metanolu. Kao standardi fenolnih jedinjenja su korišćeni: p-kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, rutin, katehin, kvercetin, naringenin, viteksin (*Sigma-Aldrich, Nemačka*). Osnovni rastvori su najpre razblaženi do koncentracije 10 mg/L, a zatim dalje razblaživani do koncentracija radnih rastvora od 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, i 0,025 mg/L. Osnovni i radni rastvori su čuvani u mraku na 4°C do analize. Kalibracija aparata i formiranje standardnih kriva je urađeno korelisanjem površine pikova sa koncentracijom standardnih rastvora.

Odvajanje, određivanje i kvantifikacija fenolnih jedinjenja od interesa UHPLC–DAD MS/MS metodom su urađeni korišćenjem *Ultimate 3000* UHPLC sistema (*Dionex, SAD*), povezanog sa DAD detektorom i *TSQ Quantum Access Max tandem* kvadrupolnim masenim spektrometrom (*ThermoFisher Scientific, Švajcarska*). Elucija uzoraka je urađena na 40°C pomoću Synchronis C18 kolone (100 × 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica). Mobilne faze u ovoj analizi su bile voda sa 0,1% mravljom kiselinom, HCOOH (A) i 100% acetonitril (B). Procenat mobilnih faza A i B je postepeno linearno menjan tokom analize, sa protokom 0,3 mL/min:

- 0–2 min. – 95% A, 5% B;
- 2,0–14,0 min. – 95-5% A, 5-95% B;
- 14,0–14,2 min. – 5-95%, 95-5% B;
- 14,2–20,0 min. – 95% A, 5% B.

Talasne dužine na kojima se vršila detekcija fenolnih jedinjenja bile su 254 nm i 280 nm. Zapremina svakog uzorka koja je injektovana u sistem je bila 5 µL. Tandem kvadrupolni maseni spektrometar sa jonskim izvorom zasnovanim na elektrosprej jonizaciji (*HESI-II; ThermoFisher Scientific, Nemačka*) povezan je za hromatografski sistem. Jonizacija je izvršena u sledećim uslovima: temperature isparivača 200°C, napon jonskog izvora 5000 V, glavni protok gasa (N<sub>2</sub>) 40 proizvodnih jedinica, pomoćni protok gasa (N<sub>2</sub>) 8 proizvodnih jedinica, temperatura kapilare 300°C i napon kapilara 0 V. Podaci masene spektrometrije su dobijeni u negativnom režimu rada, u opsegu oblasti masenog spektra od 100 do 1000 m/z. Za kvalitativnu analizu ciljanih jedinjenja primenjeno je više režima masene spektrometrije, uključujući potpuno skeniranje (eng. *full scanning*, FS) i skeniranje jonskih proizvoda (eng. *product ion scanning*, PIS). Eksperimenti fragmentacije kolizionom indukovanom disocijacijom (eng. *collision-induced*, CID) su izvedeni korišćenjem argona kao kolizionog gasa, a energija kolizije je varirala u zavisnosti od jedinjenja.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja je urađena prema spektralnim karakteristikama, poput masenog spektra, tačne mase, svojstvene MS fragmentacije i retencionog vremena (tR). Softver *Xcalibur* (verzija 2.2) je korišćen za kontrolu instrumenta, pribavljanje i analizu podataka. Program za uređivanje molekula, *ChemDraw* (verzija 12), je korišćen kao

referentna biblioteka i za izračunavanje tačnih masa identifikovanih jedinjenja. Strukture jedinjenja čiji standardi nisu dostupni poređene su sa MS fragmentima datim u literaturi. Kvantifikacija je rađena poređenjem retencionog vremena, tačnih masa i fragmenata jedinjenja sa odgovarajućim standardima. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i kiselina je izražen u miligramima (mg) po kilogramu uzorka (g/kg). Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### **3.3.2. Fiziološka karakterizacija**

#### **3.3.2.1. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije**

Nivo lipidne peroksidacije je izmeren indirektno prema protokolu po Heath i Packer (1968), na osnovu koncentracije malonil dialdehida (MDA), jedinjenja koje nastaje kao posledica lipidne peroksidacije i razlaganja ćelijskih membrana. MDA reaguje sa tiobarbituratnom kiselinom (eng. *thiobarbituric acid*, TBA) u prisustvu trihlorosirćetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*, TCA) pri čemu nastaje jedinjenje crveno-roze boje sa maksimumom apsorpcije na 532 nm. Koncentracija MDA u uzorcima je određena pomoću komercijalnog kita, *Malondialdehyde (MDA) Colorimetric Assay Kit (Elabscience®)*, NRK). Komercijalni kit je sadržao sledeće reagense:

- Rastvor za prečišćavanje (eng. *clarificant solution*);
- Kiselinški reagens (eng. *acid reagent*);
- Hromogeni agens (eng. *chromogenic agent*);
- 200 nmol/mL MDA standard;
- 10x koncentrovani ekstrakcioni pufer (eng. *extraction solution*).

Pre početka analize, pripremljeni su svi potrebni rastvori. Radni rastvor za svaki uzorak je sadržao 15  $\mu$ L rastvora za prečišćavanje, 450  $\mu$ L kiselinškog reagensa i 150  $\mu$ L hromogenškog agensa. Razblaženi ekstrakcioni rastvor je pripremljen rastvaranjem 18  $\mu$ L 10x koncentrovanog ekstrakcionog rastvora u 162  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (po uzorku). Za formiranje kalibracione krive korišćen je 200 nmol/mL MDA standard razblažen 96% etanolom do koncentracija 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nmol/mL. Kao negativna kontrola korišćen je samo 96% etanol.

Sprašeno biljno tkivo (0,1g) je rastvoreno u 180  $\mu$ L razblaženog ekstrakcionog rastvora i promešano na tresilici u trajanju od 30 sekundi (*Vortex V1 Plus, Biosan, Letonija*). Mikrotube sa uzorcima su zatim centrifugirane na 9000  $\times$  G 15 min na 4°C (*5417R, Eppendorf, Nemačka*). Nakon toga je odvojena gornja faza, prenetu u nove mikrotube (1,5 mL) koje su držane na ledu. Takođe, odvojeno je po 100  $\mu$ L od svakog standardnog razblaženja i prebačeno u nove mikrotube (1,5 mL). Zatim je u sve mikrotube, i sa uzorcima i sa standardnim razblaženjima, dodato po 600  $\mu$ L radnog rastvora i reakcione smeše su promešane kratkotrajnim mešanjem na tresilici. Plastični poklopci mikrotuba su zatim odstranjeni, a vrh svake mikrotube je zatvoren parafilmom (*PARAFILM® sealing film, Amcor Flexibles North, SAD*), na kom je naknadno probušena rupa za ispuštanje pare. Uzorci su inkubirani na temperaturi od 95°C u trajanju od 40 minuta (*ALEMADR-MS, coloLabExperts, Slovenija*). Nakon toga su ostavljeni na ledu nekoliko minuta radi spuštanja temperature i centrifugirani na 1000  $\times$  G 10 minuta (*5417R, Eppendorf, Nemačka*). U kivete za spektrofotometar je preneto 250  $\mu$ L gornje faze i A je izmerena na 532 nm za slepu probu (ddH<sub>2</sub>O), standardna razblaženja i sve uzorke (*BioSpectrophotometer, Eppendorf, Nemačka*). Analiza je urađena u dva ponavljanja i prosečna vrednost je uzeta kao konačna. Kalibraciona kriva je izračunata kao odnos koncentracije standarda (x-osa) i izmerene A za svaku koncentraciju (y-osa), kao  $y = ax + b$ , gde je  $a$  nagib krive, a  $b$  tačka presecanja y-ose. Koncentracija MDA (nmol/g) u uzorku je izračunata po sledećoj formuli:

$$MDA = \frac{(\Delta A_{532} - b) \cdot f \cdot m_{uz}}{a \cdot V}$$

Gde su:  $\Delta A_{532} = |A_{532}^{uzorak} - A_{532}^{blank}|$ ;  $f$  - faktor razblaženja ( $f=1$ ),  $m_{uz}$  - masa uzorka,  $V$  - zapremina radnog rastvora.

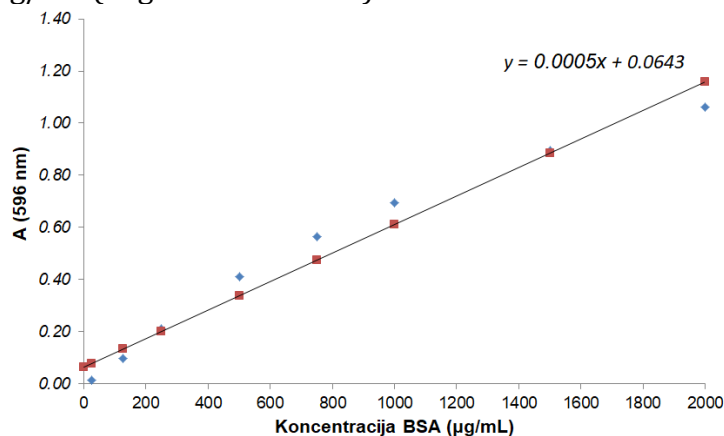
Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.2. Određivanje koncentracije proteina primenom Bradfordovog testa

Za određivanje aktivnosti enzima neophodno je poznavanje koncentracije proteina u uzorcima. Za tu svrhu je primenjen Bradfordov test (Kruger, 2009) i formirana je kalibraciona kriva merenjem apsorbanci osam razblaženja kalibracionog rastvora poznate koncentracije. Kalibracioni rastvor je napravljen korišćenjem 1X Bradfordovog rastvora i BSA (eng. *bovine serum albumin*, BSA). Kao negativna kontrola korišćen je 1X Bradfordov rastvor bez BSA.

Proteini iz uzoraka su izolovani ekstrakcionim puferom za proteine (10mM Tris HCl, pH 8,1; 10mM EDTA, pH 8,0; 5mM  $\beta$ -merkaptetanol; 0,1 mg/mL PMSF): 1g sprasenog biljnog tkiva je rastvoren u 1 mL ekstrakcionog pufera. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 20 minuta 20000  $\times$  G na 4°C i gornja faza je prenetu u nove mikrotube. Proteinski ekstrakti su ostavljeni na ledu do upotrebe.

Koncentrovani 5X Bradfordov rastvor je napravljen rastvaranjem 100 mg komasi plave boje (*Coomassie Brilliant Blue G-250*, Merck) u 50 mL apsolutnog etanola, nakon čega je postepeno dodato 100 mL 85% fosforne kiseline ( $H_3PO_4$ ), i ddH<sub>2</sub>O do finalne zapremine (1L). Rastvor je inkubiran na sobnoj temperaturi u periodu od 10 minuta i profiltriran kroz filter papir. Koncentrovani Bradfordov rastvor je razblažen pet puta i napravljen je 1X Bradfordov rastvor za dalje korišćenje. Rastvori BSA su napravljeni razblaživanjem standarda BSA sa ddH<sub>2</sub>O do odgovarajućih koncentracija: 1000  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 400  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL i 0  $\mu$ g/mL (negativna kontrola).



**Slika 3.1 Standardna kalibraciona kriva BSA.** Na x-osi su prikazane koncentracije BSA ( $\mu$ g/ml), a na y-osi izmerene apsorbance (A) na 596 nm. Na osnovu tih tačaka, primenom analize linearne regresije formirana je standardna kalibraciona kriva BSA ( $y = 0,0005x + 0,0643$ ).

Za formiranje kalibracionih rastvora uzeto je po 2 mL 1X Bradfordovog rastvora i po 20  $\mu$ L rastvora standardnih razblaženja BSA, uz negativnu kontrolu. Isto je urađeno i za same uzorke: 20  $\mu$ L proteinskog ekstrakta je rastvoreno u 2 mL 1X Bradfordovog rastvora. Apsorbance svakog rastvora je izmerena na talasnoj dužini od 596 nm i standardna kriva je formirana na prethodno opisan način. Formirana standardna kriva:  $y = 0,0005x + 0,0643$  (Slika 3.1) je korišćena za

određivanje koncentracije proteina u uzorku, na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanci (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2 Koncentracije proteina u uzorcima.** Koncentracije proteina su određene na osnovu prosečnih vrednosti apsorbanci (A). Predviđena y-vrednost za svaki uzorak je određena kao razlika između A i apsorbance negativne kontrole ( $A_{NK}$ ), i koncentracija proteina,  $C_{prot}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) je izračunata na osnovu funkcije linearne regresije ( $y = 0,0005x + 0,0643$ ).

Uzorak	A	y	$C_{prot}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$C_{prot}$ (mg/ml)
L <sub>S</sub> , Kontrola	2,054	1,326	2523,4	2,5234
L <sub>S</sub> , Tretman	2,008	1,280	2430,4	2,4304
L <sub>T</sub> , Kontrola	2,052	1,324	2519,4	2,5194
L <sub>T</sub> , Tretman	1,972	1,244	2358,4	2,3584

### 3.3.2.3. Određivanje aktivnosti peroksidaze (POD)

Merenje aktivnosti enzima peroksidaze (POD) se zasniva na reakciji razlaganja vodonikperoksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na vodu ( $\text{H}_2\text{O}$ ) i kiseonik ( $\text{O}_2$ ), katalizovanoj navedenim enzimom. Ukoliko se reakcija odvija u prisustvu pirogalne kiseline ( $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$ ) dolazi do njene oksidacije i sinteze pirogalol-hinona, jedinjenja žuto-braon boje sa maksimumom apsorpcije na 420 nm. Stoga, POD aktivnost se može izmeriti merenjem apsorbancije pirogalol-hinona na navedenoj talasnoj dužini. U ovu svrhu, korišćen je komercijalni kit *Peroxidase (POD) Activity Assay Kit* (Elabscience®, NRK). Komercijalni kit je sadržao sledeće reagense:

- Reakcioni pufer (eng. *buffer solution*);
- Hromogeni agens (eng. *chromogenic agent*);
- Rastvor supstrata (eng. *substrate solution*);
- Rastvor za zaustavljanje reakcije (eng. *stop solution*).

Rastvori potrebni za analizu aktivnosti POD su pripremljeni pre početka analize. Za ekstrakciju POD je korišćen 0,01M PBS pufer, pH 7,4 (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS). Prvo je napravljen 1L 10X (0,1M) koncentrovani PBS pufer korišćenjem: 80g natrijum hlorida ( $\text{NaCl}$ ), 2 g kalijum hlorida ( $\text{KCl}$ ), 14,4 g dibazičnog natrijum fosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), i 2,59 g monobazičnog kalijum fosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Zatim je pH vrednost rastvora podešena na 7,4 i dodata je ddH<sub>2</sub>O do zapremine od 1L. Koncentrovani PBS pufer je zatim razblažen duplo destilovanom vodom do radne koncentracije (1X, 0,01M). Radni hromogeni rastvor je dobijen rastvaranjem hromogenog agensa iz kita u 17,5 mL ddH<sub>2</sub>O i držan u frižideru u mraku (2-8°C) do početka analize. Radni rastvor supstrata je napravljen razblaživanjem 8  $\mu\text{L}$  rastvora supstrata u 192  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O – 200  $\mu\text{L}$  po uzorku. Radni rastvor za zaustavljanje reakcije je napravljen rastvaranjem 500  $\mu\text{L}$  koncentrovanog rastvora za zaustavljanje reakcije u 500  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O – 1000  $\mu\text{L}$  po uzorku.

Uzorci sprašenog biljnog tkiva su pripremljeni rastvaranjem 0,1 g biljnog tkiva u 1,8 mL 1X PBS pufera na temperaturi od 4 °C. Uzorak je promešan i centrifugiran 10 min pri brzini od 16000 × G, nakon čega je gornja faza prebačena u nove tube i ostavljena na ledu. Koncentracija proteina u svakom uzorku je izmerena i uzorci su razblaženi ukoliko je koncentracija proteina bila van opsega detekcije za ovu metodu (0,5 – 40 U/mL).

U nove tube (5 mL) je dodato 2,4 mL pufera, 0,3 mL radnog hromogenog rastvora, 0,2 mL radnog rastvora supstrata i 0,1 mL uzorka. Kontrolne tube su sadržale sve rastvore u istim zapreminama, izuzev što je umesto radnog rastvora supstrata, dodato samo 0,2 mL ddH<sub>2</sub>O. Uzorci i negativne kontrole su promešani na tresilici i inkubirani u vodenom kupatilu na 37°C u trajanju od 30 min (*GD120 Water Bath*, Grant, UK). Nakon toga je u svaku tubu dodato po 1 mL radnog rastvora za zaustavljanje reakcije. Potom su uzorci promešani i centrifugirani (10 min, 2300 × G), i gornja faza je odvojena za merenje apsorbancije. Spektrofotometar je podešen korišćenjem

slepe probe (ddH<sub>2</sub>O) i vrednosti apsorbance za svaki uzorak su izmerene na 420 nm. Aktivnost POD je izračunata kao količina enzima potrebna za katalizovanje reakcije sa 1 µg supstrata u 1 mg proteina po minutu na 37°C (U/mg<sub>prot</sub>), korišćenjem formule:

$$POD(U/mg_{prot}) = \frac{\frac{A_{uzorak} - A_{kontrola}}{12 \times OP} \times \frac{V_1}{V_2}}{1000 \times t \times \frac{c_{prot}}{f}}$$

$$POD(U/mg_{prot}) = \frac{\frac{A_{uzorak} - A_{kontrola}}{12 \times 1} \times \frac{4}{0,1}}{1000 \times 30 \times \frac{c_{prot}}{1}}$$

Gde su: OP – optički put svetlosti, odnosno širina kivete (cm), V<sub>1</sub> - ukupna zapremina reakcione smeše (mL), V<sub>2</sub> – zapremina uzorka u reakcionoj smeši (mL), t – vreme reakcije (min), c<sub>prot</sub> – koncentracija proteina u uzorku (mg<sub>prot</sub>/mL), f – faktor razblaženja uzorka.

Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti p < 0,05.

#### 3.3.2.4. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (APX)

Aktivnost enzima askorbat peroksidaze (APX) može biti praćena određivanjem koncentracije monodehidroaskorbinske kiseline (MDASA), proizvoda reakcije askorbinske kiseline (ASA) i vodonik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), katalizovane od strane APX. ASA je jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 290 nm i aktivnost APX je izmerena indirektno, na osnovu smanjenja vrednosti apsorbancije tokom trajanja reakcije na ovoj talasnoj dužini. U ovu svrhu korišćen je komercijalni kit *Ascorbate Peroxidase (APX) Activity Assay (Elabscience®)*, (NRK), koji je sadržao sledeće reagense:

- Ekstrakcioni pufer (eng. *extraction solution*);
- Reakcioni pufer (eng. *buffer solution*), zagrejan na 37° C;
- Supstrat (jedna doza, dobijena u kitu, rastvorena u 6 mL ddH<sub>2</sub>O);
- Rastvor za supstrat (eng. *substrate solution*).

Sprašeno biljno tkivo (0,1 g) je rastvoreno u ekstrakcionom puferu (1,8 mL) i promešano na tresilici. Smeša je zatim centrifugirana 10 min pri brzini od 16000 × G, na temperaturi od 4°C Gornja faza je prebačena u nove tube i uzorci su držani na ledu do dalje upotrebe. Kao pri određivanju aktivnosti POD, i za APX je bilo neophodno izmeriti koncentraciju proteina u uzorku i razblažiti uzorke tako da je koncentracija unutar opsega detekcije za ovu metodu (0,071 – 47 U/g). Spektrofotometar je kalibrisan merenjem apsorbance ddH<sub>2</sub>O na talasnoj dužini od 290 nm.

Kao slepa proba je korišćena smeša 0,1 mL ekstrakcionog reagensa, 0,7 mL reakcionog pufera i 0,1 mL rastvora za supstrat. U mikrotube (2 mL) sa uzorcima je dodato 0,1 mL pripremljenog uzorka, 0,7 mL reakcionog pufera i 0,1 mL rastvora za supstrat. U svaku tubu je zatim dodato 0,1 ml rastvorenog supstrata i reakciona smeša je dobro promešana. Nakon 15 sekundi, izmerena je apsorbance na talasnoj dužini od 290 nm (A<sub>1</sub>). Tube su odmah inkubirane na 37°Cu trajanju od 120 sekundi. Apsorbance je ponovo izmerena nakon 135 sekundi na istoj talasnoj dužini (A<sub>2</sub>). Aktivnost APX je izračunata kao količina enzima potrebna za katalizovanje reakcije 1 µmol ASA u 1 mg proteina u 1 mL reakcionog sistema, po minuti (U/mg<sub>prot</sub>), korišćenjem formule:

$$APX (U/mg_{prot}) = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times OP} \times \frac{V_1}{V_2 \times c_{prot}} \times f$$

$$APX (U/mg_{prot}) = \frac{\Delta A}{2,8 \times 1} \times \frac{1}{0,1 \times c_{prot}} \times f$$

Gde su:  $\Delta A = A_1 - A_2$ , OP – optički put svetlosti (cm),  $\varepsilon$  – molarni koeficijent ekstinkcije ASA na 290 nm talasne dužine sa OP=1cm (mL/ $\mu$ mol $\times$ cm), t – vreme reakcije (min),  $V_1$  – ukupna zapremina reakcione smeše (mL),  $V_2$  – zapremina pripremljenog uzorka u reakcionoj smeši (mL),  $c_{prot}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg<sub>prot</sub>/mg), f – faktor razblaženja uzorka pre korišćenja.

Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.5. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPX)

Glutation peroksidaza (GPX) je enzim koji katalizuje reakciju između redukovanog glutationa (GSH) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u kojoj dolazi do formiranja molekula vode (H<sub>2</sub>O) i oksidovanog glutationa (GSSG). Aktivnost GPX može biti praćena indirektno, preko odvijanja ove enzimske reakcije, odnosno merenjem opadanja nivoa GSH. Bitno je naglasiti da se ova reakcija odvija i bez prisustva GPX, pa se deo oksidacije GSH ne-enzimskom reakcijom mora uzeti u obzir. GSH reaguje sa 3,5-dinitrobenzojevom kiselinom, pri čemu nastaje kiselinski anjon 5-tiodinitrobenzojeve kiseline (DNTB) – jedinjenje žute boje, sa maksimumom apsorpcije na 412 nm. Merenjem apsorbanace ovog jedinjenja se može preračunati koncentracija GSH a time i aktivnost GPX. Analiza je urađena korišćenjem komercijalnog kita *Glutathione Peroxidase (GPX) Activity Assay* (Elabscience®, NRK), koji je sadržao sledeće reagense:

- Osnovni rastvor (eng. *stock solution*);
- Kiselinski reagens (eng. *acid reagent*);
- Fosfat [PO<sub>4</sub>]<sup>3-</sup>;
- Rastvor DNTB;
- Soni reagens (eng. *salt reagent*);
- GSH standard;
- Rastvarač standarda GSH (eng. *GSH standard stock diluent*).

Radni rastvor je napravljen razblaživanjem osnovnog rastvora tako što je za svaki uzorak uzeto po 1  $\mu$ L osnovnog rastvora i 99  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, nakon čega je usledilo zagrevanje do 37°C. Fosfatni rastvor je pripremljen rastvaranjem jedne bočice fosfata iz kita u 60 mL ddH<sub>2</sub>O. Soni rastvor je dobijen rastvaranjem jedne bočice sonog reagensa iz kita u 10 mL ddH<sub>2</sub>O. Rastvarač standarda GSH je razblažen do koncentracije 10%, i korišćen za rastvaranje GSH standarda: jedna bočica GSH standarda iz kita je rastvorena sa 10 mL 10% rastvarača GSH. Rastvoreni GSH standard (1 mmol/L) je potom razblažen do koncentracije od 20  $\mu$ mol/L.

Kao ekstrakcioni rastvor za GSH je korišćen 0,01M PBS pufer – 0,1 g sprasnenog biljnog tkiva je rastvoreno u 270  $\mu$ L 1X PBS (4°C i dobro promešano na tresilici. Uzorci su zatim centrifugirani na 10000  $\times$  G, 10 minuta na 4°C Gornja faza je prebaćena u nove mikrotube i izmerena je koncentracija proteina.

Kao što je prethodno navedeno, analiza aktivnosti GPX zahteva praćenje dva tipa reakcije oksidacije GSH – neenzimske i enzimske, stoga su i tube (5 mL) sa uzorcima podeljene u dva seta: set tuba za praćenje neenzimskih i set tuba za praćenje enzimskih reakcija. U oba seta tuba je

najpre sipano po 0,2 mL 1 mmol/L rastvorenog GSH standarda, a 0,2 mL uzorka je dodato samo u set tuba predviđenih za praćenje enzimske reakcije. Sve tube su zatim zagrejane u vodenom kupatilu (*GD120 Water Bath, Grant, UK*) na 37°Cu trajanju od 5 minuta. Zatim je u sve tube dodato po 0,1 mL radnog rastvora i započeta reakcija je ostavljena da se odvija na 37°Cu trajanju od 5 minuta. Nakon toga, u set tuba za praćenje neenzimske reakcije je dodato po 0,2 mL uzorka i 2 mL kiselinskog reagensa, dok je u tube za praćenje enzimske reakcije dodat samo kiselinski reagens u istoj zapremini. Sadržaji svih tuba su dobro promešani na tresilici i centrifugirani na  $3100 \times G$  u trajanju od 10 min. Nakon toga, 1 mL gornje faze je odvojen i prebačen u nove tube za hromogenu reakciju. Kao slepa proba je korišćen 1 mL 10% rastvarača GSH, dok je kao standard korišćen 1 mL 20  $\mu\text{mol/L}$  standardnog rastvora GSH. Potom je u sve tube dodato po 1 mL fosfatnog rastvora, 0,25 mL DTNB rastvora i 50  $\mu\text{L}$  sonog rastvora. Sadržaji svih tuba su dobro promešani i reakcija se odvijala na sobnoj temperaturi 15 minuta, nakon čega su na spektrofotometru izmerene vrednosti apsorbance svih uzoraka na 412 nm. Jedinica aktivnosti GPX je izračunata kao količina GPX u 1 mg proteina, koja katalizuje oksidaciju 1  $\mu\text{mol/L}$  GSH u trajanju od 5 minuta na 37°C ( $\text{U/mg}_{\text{prot}}$ ), oduzimajući neenzimski deo reakcije, po sledećoj formuli:

$$GPX (\text{U/mg}_{\text{prot}}) = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f_2 \times \frac{f}{V \times c_{\text{prot}}}$$

$$GPX (\text{U/mg}_{\text{prot}}) = \frac{A_{NE} - A_E}{A_{\text{stand}} - A_{SP}} \times 20 \times f_2 \times \frac{f}{0,2 \times c_{\text{prot}}}$$

Gde su:  $A_{NE}$  – izmerena apsorbance neenzimske reakcije;  $A_E$  – izmerena apsorbance enzimske reakcije;  $A_{\text{stand}}$  – izmerena apsorbance standarda GSH;  $A_{SP}$  – izmerena apsorbance slepe probe;  $c$  – koncentracija standarda GSH ( $\mu\text{mol/L}$ ),  $f$  – faktor razblaženja;  $f_2$  – faktor razblaženja biljnog tkiva u enzimskoj reakciji;  $V$  – zapremina dodatog uzorka (mL);  $c_{\text{prot}}$  – koncentracija proteina u uzorku ( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{mg}$ ).

Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.6. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid anjon radikali ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), produkti aerobne respiracije, nastaju tokom elektronskog transporta u odsustvu primarnog akceptora – elektroni se prenose na molekulski kiseonik, umesto na nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP). Superoksid dismutaza je enzim koji katalizuje dismutaciju i odvajanje superoksid anjon radikala, pri čemu nastaju molekul kiseonika ( $\text{O}_2$ ) i vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Superoksid anjon radikali oksiduju hidroksilamin do nitrita, jedinjenja ljubičaste boje sa maksimum apsorpcije na 550nm, pa se aktivnost SOD može pratiti preko inhibicije ove reakcije. Praćenje aktivnosti SOD je urađeno uz pomoć komercijalnog kita *Total Superoxide Dismutase (T-SOD) Activity Assay Kit (Hydroxylamine Method)* (*Elabscience®*, NRK), koji je sadržao sledeće reagens:

- Pufer (eng. *buffer solution*);
- Nitrozogeni agens (eng. *nitrosogenic agent*);
- Rastvor supstrata, hidroksilamina;
- Osnovni rastvor enzima (eng. *enzyme stock solution*);
- Rastvarač enzima (eng. *enzyme diluent*);
- Hromogeni agens A;
- Hromogeni agens B;

- Hromogeni agens C.

Pufer je razblažen do koncentracije 10% - za svaki uzorak je potreban 1 mL 10% pufera. Osnovni rastvor enzima je razblažen do koncentracije 5% - za svaki uzorak bilo je potrebno 100  $\mu$ L 5% rastvora enzima. Hromogeni agens A je pripremljen rastvaranjem sadržaja jedne bočice u 90 mL zagrejane ddH<sub>2</sub>O (70-80°C). Hromogeni agens B je pripremljen na isti način, samo korišćenjem ddH<sub>2</sub>O na sobnoj temperaturi. Hromogeni agens C je korišćen u nerazblaženom obliku, dobijenom u kitu. Finalni hromogeni agens koji je korišćen u analizi je pripremljen sjedinjavanjem hromogenih agenasa A, B i C - za svaki uzorak bilo je potrebno 2 mL hromogenog agenasa, koji je sadržao 750  $\mu$ L hromogenog agenasa A, 750  $\mu$ L hromogenog agenasa B i 500  $\mu$ L hromogenog agenasa C.

Sprašeno biljno tkivo (0,1 g) je rastvoreno u 180  $\mu$ L 1X PBS (0,01 M, pH 7,4), dobro promešano i centrifugirano 10 minuta, pri brzini od 10000  $\times$  G na 4°C. Gornja faza je odvojena i prebačena u nove mikrotube, a potom je izmerena koncentracija proteina pre daljeg korišćenja. U nove mikrotube je dodato po 20  $\mu$ L proteinskog uzorka i 1 mL 10% pufera. Kao kontrola je korišćena ddH<sub>2</sub>O, tako da je u kontrolnu tubu dodato 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O i 1 mL 10% pufera. Nakon toga je u sve tube postepeno dodavano po 0,1 mL nitrozogenog agenasa, 0,1 mL rastvora supstrata, i 0,1 mL 5% enzimskog rastvora. Nakon što su uzorci i kontrola dobro promešani na tresilici, stavljeni su na inkubaciju na 37°C u trajanju od 40 min. Kada je inkubacioni period završen, u tube je dodato po 2 mL hromogenog agenasa, i nakon mešanja tube su ostavljene na sobnoj temperaturi 10 minuta. Apsorbance su merene na 550 nm, pri OP=1 cm, i aktivnost SOD je izračunata kao količina enzima prisutna kada se dostigne 50% stope inhibicije (SI) u 1 mg proteina, u 1 mL reakcionog sistema (U/mg<sub>prot</sub>), po sledećoj formuli:

$$SOD (U/mg_{prot}) = \frac{SI}{50\%} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{f}{c_{prot}}$$

$$SOD (U/mg_{prot}) = \frac{\frac{A_c - A_{uzorak}}{A_c} \times 100\%}{50\%} \times \frac{3,32}{0,02} \times \frac{f}{c_{prot}}$$

Gde su:  $A_c$  - apsorbanca kontrolnog uzorka;  $A_{uzorak}$  - izmerena apsorbanca uzorka;  $V_1$  - ukupna zapremina reakcione smeše (mL),  $V_2$  - zapremina pripremljenog uzorka u reakcionoj smeši (mL),  $c_{prot}$  - koncentracija proteina u uzorku (mg<sub>prot</sub>/mg),  $f$  - faktor razblaženja uzorka pre korišćenja.

Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalaza je široko rasprostranjen antioksidativni enzim, sa ulogom u razgradnji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na molekul kiseonika (O<sub>2</sub>) i vode (H<sub>2</sub>O). Ova reakcija se brzo zaustavlja u prisustvu amonijum molibdata ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>), pri čemu nastaje jedinjenje žute boje, peroksomolibdat, sa maksimumom apsorpcije na 405 nm. Utvrđivanje aktivnosti CAT se zasniva na osnovu produkcije i merenja apsorbanacije peroksomolibdata, za šta je korišćen komercijalni kit *Catalase (CAT) Activity Assay Kit (Elabscience®)*, NRK), koji je sadržao sledeće komponente:

- Pufer (eng. *buffer solution*);
- Supstrat, amonijum molibdat (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>;
- Hromogeni agens;
- Rastvor za prečišćavanje (eng. *clarificant*).

Najpre su pufer, supstrat i rastvor za prečišćavanje inkubirani na 37°C u trajanju od 10 min. Radni hromogeni rastvor je napravljen rastvaranjem sadržaja bočice hromogenog agensa iz kita sa 60 mL ddH<sub>2</sub>O.

Ekstrakcija enzima iz uzoraka je vršena 1X PBS puferom: 0,1 g sprasnenog biljnog tkiva je rastvoreno u 180 µL PBS pufera na 4°C. Nakon što su uzorci dobro promešani, centrifugirani su pri brzini od 10000 × G 10 min na 4°C i gornja faza je odvojena za dalje analize. Za merenje apsorbance uzoraka korišćeno je po 50 µL ekstrahovanog uzorka. U tube sa uzorcima je dodato po 1000 µL pufera i one su ostavljene na inkubaciju na 37°C u trajanju od 5 min. Kao kontrola je korišćeno samo 1000 µL pufera. Nakon toga, u svaku tubu je dodato po 100 µL supstrata, i uzorci i kontrole su inkubirani na 37°C u trajanju od 1 min. U tube za kontrole je zatim dodato 1000 µL radnog hromogenog agensa, 100 µL rastvora za prečišćavanje i 50 µL ekstrahovanog uzorka. U tube sa uzorcima je dodato samo 1000 µL radnog hromogenog agensa i 100 µL rastvora za prečišćavanje. Nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, uzorci i kontrole su prebačeni u kivete za spektrofotometar i apsorbancu im je izmerena na 405 nm. Aktivnost CAT je izračunata kao količina enzima prisutna u 1 mg proteina koja katalizuje razgradnju 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti na 37°C ( $U/mg_{prot}$ ), po sledećoj formuli:

$$CAT (U/mg_{prot}) = \frac{\Delta A \times m}{t \times V} \times \frac{f}{c_{prot}}$$

$$CAT (U/mg_{prot}) = \frac{(A_C - A_{uzorak}) \times 32,5}{1 \times 0,05} \times \frac{f}{c_{prot}}$$

Gde su:  $A_C$  – apsorbancu kontrolnog uzorka;  $A_{uzorak}$  – izmerena apsorbancu uzorka;  $m$  – recipročna vrednost nagiba standardne krive CAT;  $t$  – vreme trajanja reakcije (min);  $V$  – ukupna zapremina uzorka (mL),  $c_{prot}$  – koncentracija proteina u uzorku ( $mg_{prot}/mg$ ),  $f$  – faktor razblaženja uzorka pre korišćenja.

Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.8. Određivanje fotosintetske efikasnosti

Fotosintetska efikasnost je procenjena analizom parametara fluorescencije hlorofila uz pomoć prenosnog fluorimetra *Mini-PAM Photosynthesis Yield Analyzer* (Walz, Nemačka). Ispitivani parametri su obuhvatili maksimalni kvantni prinos fotosistema II (eng. *maximum quantum yield of photosystem II*,  $F_v/F_m$ ), fotohemijsku efikasnost fotosistema II (eng. *photochemical efficiency of photosystem II*,  $\Phi_{PSII}$ ), kvantnu efikasnost neregulisanog oslobađanja energije u PSII (eng. *quantum efficiency of unregulated energy dissipation in PSII*,  $Y(NO)$ ), kvantnu efikasnost regulisanog oslobađanja energije u PSII (eng. *quantum efficiency of regulated dissipation of energy in the PSII*,  $Y(NPQ)$ ) i brzinu prenosa elektrona (eng. *electron transfer rate*, ETR). Računanje vrednosti ovih parametara je rađeno prema Kitajima i Butler (1975) i Genty i sar. (1989).

Ispitivanje fotosintetske efikasnosti je urađeno na tretiranim i kontrolnim biljkama posle perioda oporavka od sedam dana. Većina biljaka kukuruza je posle 13 dana od postavljanja na germinaciju bila u fazi V2 (potpuno razvijena dva lista i treći list prisutan u različitom stepenu razvoja, bez formiranog lisnog rukavca). Merenja parametara efikasnosti fotosinteze su vršena na svakoj biljci na zdravom drugom i trećem listu, i merenje za svaku biljku u pojedinačnom ponavljanju je računato kao srednja vrednost dva očitavanja. Takođe, u zavisnosti od ispitivanog parametra, određena merenja su urađena na listovima nakon adaptacije na mrak u trajanju od 30

minuta ( $F_v/F_m$ ) i na svetlosti ( $\Phi_{PSII}$ ,  $Y(NO)$ ,  $Y(NPQ)$ ,  $ETR$ ). Adaptacija na mrak se odvijala pomoću specifičnih *Mini-PAM* dodataka koji obezbeđuju potpuno odsustvo svetlosti na izabranom delu lista (*Dark Leaf Clip DLC-8*, Walz, Nemačka). Nakon adaptacije na mrak, prvo je izmeren minimalni fluorescentni signal ( $F_0$ ), nakon izvršenog fotonskog pulsa fluorometrom ( $0,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , frekvencija 600 Hz). Takođe, primenjen je i puls zasićenja fotonima ( $6000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) u trajanju od 0,8 s, radi dobijanja maksimalnog signala fluorescencije ( $F_M$ ). Minimalni i maksimalni signali fluorescencije su korišćeni za računanje maksimalnog kvantnog prinosa fotosistema II, primenom formule:

$$F_v/F_M = \frac{F_M - F_0}{F_M}$$

Na biljkama adaptiranim na svetlost (višesatno izložene svetlosti bez perioda mraka) je posebnim *Leaf Clip Holder 2035-B* dodatkom (Walz, Nemačka) izmerena stabilna fluorescencija adaptirana na svetlost ( $F$ ) i maksimalna fluorescencija adaptirana na svetlost ( $F_M'$ ). Ove vrednosti su zatim korišćene za računanje  $\Phi_{PSII}$ ,  $Y(NO)$ ,  $Y(NPQ)$ , i  $ETR$  primenom formula:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_M' - F}{F_M'}$$

$$Y(NO) = \frac{F}{F_M}$$

$$Y(NPQ) = \frac{F}{F_M'} - \frac{F}{F_M}$$

$$ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times \alpha \times \beta$$

Gde su:  $\alpha$  – udeo svetlosti apsorbovan od strane ploče aparata ( $\alpha = 0,84$ );  $\beta$  – udeo svetlosti apsorbovan od strane PSII ( $\beta = 0,5$ ), PAR – fotosintetski aktivno zračenje (eng. *photosynthetically active radiation*).

Dobijeni podaci su sakupljeni i obrađeni u softveru dobijenom uz aparat, *WinControl-3* (verzija 3.23, Walz, Nemačka). Statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

### **3.4. Sekvenciranje ukupnog transkriptoma**

Sekvenciranje transkriptoma je urađeno metodom NGS i obuhvatilo je dva tipa sekvenciranja: PE (eng. *paired end*), potrebno za sekvenciranje iRNK, lncRNK, i circRNK; i SE (eng. *single end*), neophodno za sekvenciranje sRNK. Pre samog sekvenciranja bilo je potrebno pripremiti uzorke (ponovna postavka eksperimenta i uzorkovanje u predviđenim vremenskim tačkama), izolovati i prečistiti ukupnu RNK, i formirati biblioteke komplementarne cDNK, cDNK-biblioteke (eng. *complementary DNA, cDNA libraries*).

#### **3.4.1. Dizajn eksperimenta**

Eksperiment izlaganja niskim temperaturama klijanaca kukuruza starih pet dana izabranih genotipova je ponovljen pod istim uslovima kao i prvobitni eksperiment (3.2.1. *Germinacija i tretman niskim temperaturama odabranih genotipova kukuruza*). Nakon isključavanja, 100 klijanaca je postavljeno na tretman niskim temperaturama, i 100 je izloženo kontrolnim optimalnim uslovima. Polovina tretiranih i kontrolnih klijanaca je uzorkovana nakon 6h tretmana, a druga polovina nakon 24h. Uzorkovani klijanci su sjedinjeni u jedan grupni

uzorak, odmah zamrznuti i sprášeni u tečnom azotu, korišćenjem avana i tučka, i odloženi u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalje upotrebe (*CryoCube® F440 ULT Freezer, Eppendorf, Nemačka*).

### **3.4.2. Priprema uzoraka za formiranje biblioteka komplementarne DNK**

Priprema uzoraka za NGS je obuhvatala izolaciju ukupne RNK, prečišćavanje, i proveru kvaliteta izolovane RNK.

#### **3.4.2.1. Izolacija ukupne RNK**

Izolacija RNK je izvršena iz  $\approx 100$  mg sprášenog biljnog tkiva korišćenjem komercijalnog kita, *GeneJET™ RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)*, prema uputstvima proizvođača. Kit je sadržao sledeće komponente:

- Rastvor za liziranje (eng. *RNA Lysis Solution*);
- Proteinaza K;
- Pufer za ispiranje 1, WB1 (eng. *wash buffer 1*);
- Pufer za ispiranje 2, WB2 (eng. *wash buffer 2*).

Prvo je pripremljen radni rastvor za liziranje, dodavanjem  $14,3$  M  $\beta$ -merkaptetanola u rastvor za liziranje: na svakih  $500$   $\mu\text{L}$  rastvora za liziranje biljnog tkiva dodato je po  $10$   $\mu\text{L}$   $14,3$  M  $\beta$ -merkaptetanola. Takođe je pripremljen i radni rastvor proteinaze K: po  $10$   $\mu\text{L}$  proteinaze K je rastvoreno u  $590$   $\mu\text{L}$  1X TE pufera ( $10$  mM Tris,  $1$  mM EDTA, pH  $8,0$ ). Nakon toga je u mikrotube ( $1,5$  mL) dodato po  $300$   $\mu\text{L}$  radnog rastvora za liziranje i u svaku tubu je dodato odvojeno sprášeno biljno tkivo. Sadržaj mikrotuba je dobro promešan na tresilici  $10$ - $20$  sekundi i u svaku mikrotubu je potom dodato po  $600$   $\mu\text{L}$  radnog rastvora proteinaze K. Sadržaj mikrotuba je ponovo promešan i inkubiran na sobnoj temperaturi  $10$  minuta. Po završetku inkubacije mikrotube su centrifugirane  $10$  minuta pri brzini od  $20000 \times G$ .

Nakon toga,  $500$   $\mu\text{L}$  gornje faze je odvojeno i prebačeno u nove mikrotube ( $1,5$  mL) i u svaki uzorak je dodato  $450$   $\mu\text{L}$   $96\%$  etanola. Sadržaj mikrotuba je promešan pipetiranjem i deo (do  $700$   $\mu\text{L}$ ) je prebačen u kolone za prečišćavanje RNK sa tubama za prikupljanje tečnosti (eng. *RNA Purification Columns pre-assembled with Collection Tubes*). Tube sa kolonama za prečišćavanje RNK su centrifugirane ( $1$  minut,  $20000 \times G$ ) i tečnost nakupljena u tubama za prikupljanje je odbačena. Ovaj korak je ponavljan nekoliko puta, sve dok nije iskorišćena ukupna zapremina smeše etanola i ekstrakta uzorka. Nakon toga je u kolone za prečišćavanje dodato po  $700$   $\mu\text{L}$  WB1 i tube su ponovno centrifugirane ( $1$  minut,  $20000 \times G$ ). Tube za prikupljanje tečnosti su pre sledećeg koraka odbačene i zamenjene novima, a zatim je u kolone za prečišćavanje dodato po  $600$   $\mu\text{L}$  WB2. Nakon centrifugiranja ( $1$  minut,  $20000 \times G$ ) i odbacivanja tečnosti iz tuba za prikupljanje, prethodni korak je ponovljen sa  $250$   $\mu\text{L}$  WB2 i uzorci su centrifugirani  $2$  min pri maksimalnog brzini od  $30000 \times G$ . Kolone za prečišćavanje RNK su potom postavljene u nove mikrotube ( $1,5$  mL) i u svaku je dodato po  $100$   $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza. Mikrotube su centrifugirane  $1$  minut, pri brzini od  $20000 \times G$ . Na kraju, kolone za prečišćavanje RNK su odbačene, a izolovana RNK se nalazila u mikrotubama.

Koncentracija izolovane RNK je izmerena na *NanoPhotometer®* spektrofotometru (*IMPLEN, SAD*). Apsorbanca svakog uzorka je izmerena na talasnim dužinama od  $260$  nm i  $280$  nm, sa optičkom distancom  $1$  cm i koncentracija RNK u svakom uzorku je automatski izračunata na spektrofotometru. Svi uzorci sa koncentracijom većom od  $200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , su razblaženi dodavanjem ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza, do dobijanja vrednosti koncentracija RNK manjih od navedene.

### 3.4.2.2. Prečišćavanje ukupne RNK

Prečišćavanje izolovane RNK podrazumeva uklanjanje kontaminacije molekulima DNK, što je učinjeno pomoću komercijalnog kita, *DNA-free™* (Ambion®, Invitrogen, SAD), koji je uključivao sledeće komponente:

- 10X pufer za DNazu I (eng. *10X DNase I buffer*);
- Enzim DNaza I (eng. *DNase I*);
- Inaktivacioni reagens za DNazu I (eng. *DNase Inactivation Reagent*).

Optimalna koncentracija RNK za nesmetano uklanjanje preostalih molekula DNK je 200 µg/mL, zbog čega su svi uzorci razblaženi do navedene koncentracije nakon izolacije RNK. Po protokolu, potrebno je dodati 10X pufer za DNazu u deset puta manjoj zapremini od zapremine RNK: u ovom slučaju, u mikrotube (1,5 mL) sa 50 µL izolovane RNK, dodato je 5 µL 10X pufera. Nakon što je dodat pufer, u reakcionu smešu je dodato 1 µL DNaze I po uzorku. Uzorci su zatim inkubirani 30 min na 37°C (*ALEMADR-MSK, coloLabExperts, Slovenija*). Nakon završene inkubacije, u svaki uzorak je dodat inaktivacioni reagens u istoj količini kao i 10X pufer (0,1 zapremine RNK): u ovom slučaju, 5 µL inaktivacionog reagensa. Prekidanje reakcije se odvijalo u trajanju od 2 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno mešanje, nakon čega su uzorci centrifugirani 1,5 min na 20000 × G. Uklonjena DNK, svi tragovi DNaze i divalentnih katjona poreklom iz pufera (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) su staloženi na dnu tube, dok se rastvorena RNK nalazila u gornjoj fazi, koja je odvojena i prebačena u nove mikrotube. Prečišćena RNK je odložena na -80°C do daljeg korišćenja.

### 3.4.2.3. Provera kvaliteta ukupne RNK

Kvalitet i integritet izolovane RNK su provereni spektrofotometrijski i primenom elektroforeze, korišćenjem nekoliko različitih metoda.

Prvo su koncentracija prečišćene RNK i moguća zagađenja utvrđena spektrofotometrijski, preko vrednosti A na talasnim dužinama 230, 260 i 280 nm. Odnos apsorbanci na talasnim dužinama 260 i 280 nm ( $A_{260/280}$ ) je uzet kao parametar zagađenja proteinima i fenolnim jedinjenjima. Odnos apsorbanci na talasnim dužinama 260 i 230 nm ( $A_{260/230}$ ) je uzet kao parametar zagađenja RNK izolata drugim nukleinskim kiselinama. Vrednosti  $A_{260/280}$  i  $A_{260/230}$  približno jednake 2 su smatrane znakom čistog, nezagađenog uzorka.

Integritet RNK je zatim proveren agaroznom elektroforezom, metodom niske rezolucije. Na 1% agarozni gel (1g agaroze, 100 mL 1X TE pufera) je naneto po 2 µL izolovane RNK pomešane sa 1 µL boje za nanošenje (*Orange Loading Dye (6X), Thermo Scientific™*) i 5 µL ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza. Elektroforetsko razdvajanje se odvijalo u trajanju od 45 min, pri naponu od 80V (*Enduro™ Gel XL Electrophoresis System, Labnet, SAD*). Gel je zatim obojen etidijum-bromidom (0,5 µg/mL EtBr, 20 min) i osvetljen na UV transiluminatoru (*Biometra BioDocAnalyze BDA Live, Analytik Jena GmbH+Co, Nemačka*). Ukoliko su se na gelu jasno uočavale dve trake, odnosno dva fragmenta 28S i 18S ribozomalne RNK (rRNK), uz slabije izdvojen fragment 5S rRNK, smatrano je da je izolovana RNK visokog kvaliteta i da nije došlo do degradacije.

Nakon preliminarne provere izolovane RNK, kvantitet i integritet su dodatno provereni na višem nivou, elektroforetskim razdvajanjem visoke rezolucije i osetljivosti: pomoću aparata *2100 Bioanalyzer* i komercijalnog kita *RNA Nano 6000 Assay Kit* (Agilent®, SAD), koji je sadržao:

- RNK lestvicu (eng. *Agilent RNA 6000 Ladder*);
- Gel matriks (eng. *Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix*);

- Koncentrovano boju za gel matriks (eng. *RNA Nano Dye Concentrate*);
- RNK marker (eng. *Agilent RNA 6000 Nano Marker*).

Pakovanje gel matriksa zapremine 550  $\mu\text{L}$  je otopljeno i centrifugirano u trajanju od 10 min pri brzini od  $24000 \times G$ , i ukupna zapremina je podeljena u pojedinačne mikrotube, tako da se u svakoj nalazilo 65  $\mu\text{L}$  za pojedinačnu upotrebu. Alikvoti su držani na  $4^\circ\text{C}$  do daljeg korišćenja. Pojedinačni alikvot je pred analizu dobro promešan i kratko centrifugiran pri maksimalnoj brzini od  $30000 \times G$ . Isto je učinjeno i za koncentrovano boju za gel, nakon čega je 1  $\mu\text{L}$  boje dodat u gel matriks. Gel je opet dobro promešan i centrifugiran 10 min na brzini od  $24000 \times G$ . Zatim je 9  $\mu\text{L}$  gela sa bojom naneto u bunarčić označen slovom G, na *RNA Nano* čipu. Klip šprica aparata je potom izvučen do oznake za 1 ml i podešen na odgovarajuću poziciju za analizu, a čip je učvršćen ispod šprica. Nakon 30 sekundi, klip je oslobođen i vraćen do podeoka od 1 ml. U sledećem koraku, 5  $\mu\text{L}$  RNK markera je naneto u bunarčiće za uzorak i jedan bunarčić za RNK lestvicu. Zatim je u bunarčiće za uzorke dodato po 1  $\mu\text{L}$  pojedinačnih uzoraka, a u bunarčić za lestvicu 1  $\mu\text{L}$  pripremljene RNK lestvice. Čip je postavljen na mešalicu priključenu aparatu i promešan 1 min pri brzini od  $1000 \times G$ , nakon čega je postavljen u aparat i pokrenuta je analiza u trajanju od 30 min. Po završetku analize, grafici kvaliteta i integriteta za svaki uzorak su preuzeti sa aparata i proučeni. Za NGS sekvenciranje su izabrani samo uzorci sa RIN (eng. *RNA integrity number*) većim od šest za PE sekvenciranje, odnosno osam za SE.

### **3.4.3. Priprema biblioteka komplementarne DNK**

Priprema cDNK biblioteka je uključivala pripremu biblioteka za PE (PE biblioteke) i SE sekvenciranje (SE biblioteke). Proces za oba tipa je obuhvatio sledeće osnovne korake: uklanjanje rRNK, reverznu transkripciju i sintezu komplementarne DNK, ligaciju adaptera i amplifikaciju DNK fragmenata, odnosno obogaćivanje cDNK biblioteka. Prečišćavanje uzoraka od ribozomalne RNK je zajednički prvi korak za oba tipa biblioteka, nakon čega se procesi razdvajaju: preostali koraci pripreme cDNK biblioteka se odigravaju različitim redosledom kod PE i SE biblioteka.

#### **3.4.3.1. Uklanjanje ribozomalne RNK**

Prvi korak pripreme oba tipa cDNK biblioteka (PE i SE) je uklanjanje ribozomalne RNK iz uzoraka prečišćene RNK, zasnovano na korišćenju DNK proba koje se vezuju za molekule rRNK i odvajaju ih od ciljnih molekula RNK, koje se potom magnetnim kuglicama izoluju i dodatno prečišćavaju. Ovaj proces se odvija u na PCR aparatu (*Biometra Thermocycler T-Professional, Analytik Jena GmbH+Co*, Nemačka), specifično podešenom za svaki korak procesa, uz pomoć *Ribo-Zero Plus* kita (*Illumina*<sup>®</sup>, SAD). Kit se sastoji od sledećih komponenti:

- Pufer za DNK probe za uklanjanje rRNK, DB1 (eng. *depletion probe buffer*);
- DNK probe za uklanjanje rRNK, DP1 (eng. *depletion probe pool*);
- Pufer za eluiranje uzoraka, ELB (eng. *elution buffer*);
- Pufer za uklanjanje DNK proba, PRB (eng. *probe removal buffer*);
- Enzim za uklanjanje DNK proba, PRE (eng. *probe removal enzyme*);
- Pufer za uklanjanje RNK, RDB (eng. *RNA depletion buffer*);
- Enzim za uklanjanje RNK, RDE (eng. *RNA depletion enzyme*);
- Rastvor magnetnih kuglica za prečišćavanje RNK (eng. *Agencourt RNAClean XP*).

Radni rastvor za hibridizaciju DNK proba je napravljen rastvaranjem DP1 u DB1: po uzorku, 1,2  $\mu\text{L}$  DP1 je rastvoreno u 3,6  $\mu\text{L}$  DB1. Radni rastvor za uklanjanje rRNK je dobijen rastvaranjem RDE u RDB: po uzorku, 1,2  $\mu\text{L}$  RDE je rastvoreno u 4,8  $\mu\text{L}$  RDB. Rastvaranjem PRE u

PRB se dobija radni rastvor za uklanjanje DNK proba i sastoji se od 3,3  $\mu\text{L}$  PRE i 7,7  $\mu\text{L}$  PRB po uzorku.

Uzorci RNK su pre početka procesa razblaženi korišćenjem ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza, tako da svaki uzorak bude zapremine 11  $\mu\text{L}$  i sadrži 1000 ng ukupne RNK. Svi uzorci su zatim naneti u pojedinačne bunarčice ploče za PCR. U svaki bunarčić je naneto i po 4  $\mu\text{L}$  radnog rastvora za hibridizaciju proba. PCR-ploča je postavljena u PCR aparat, podešen na sledeći program: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 95°C u trajanju od 2 min, postepeno smanjenje temperature (0,1°C po sekundi) do 37°C. Nakon toga, u bunarčice je dodato po 5  $\mu\text{L}$  radnog rastvora za uklanjanje rRNK i promešano pipetiranjem. PCR-ploča je potom centrifugirana (10s, 280  $\times$  G; *UNIVERSAL 320 R, Hettich Lab, Nemačka*) i postavljena u PCR aparat, podešen na program koji se sastoji od sledećih koraka: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 37°C u trajanju od 15 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. Potom je u svaki bunarčić dodato po 10  $\mu\text{L}$  radnog rastvora za uklanjanje DNK proba. Nakon mešanja pipetiranjem, PCR-ploča je centrifugirana (10s, 280  $\times$  G) i postavljena u PCR aparat na sledeći termalni ciklus: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 37°C u trajanju od 15 min; 70°C u trajanju od 15 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C.

U svaki bunarčić je zatim dodato po 60  $\mu\text{L}$  radnog rastvora magnetnih kuglica za prečišćavanje RNK i sadržaj svakog bunarčića je promešan pipetiranjem dok ne dođe do resuspendovanja kuglica. PCR-ploča sa uzorcima je ostavljena na inkubaciju na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min, nakon čega su kuglice magnetnom pločom povučene na dno bunarčića. Tečna faza ( $\approx$ 80  $\mu\text{L}$ ) je uklonjena pipetiranjem i magnetne kuglice su isprane sa 175  $\mu\text{L}$  80% etanola u trajanju od 30 sekundi. Etanol je uklonjen pipetiranjem i korak ispiranja je ponovljen. Usledilo je uklanjanje korišćenog etanola i sušenje magnetnih kuglica u trajanju od 2 min. Ukupna RNK je ponovo rastvorena dodavanjem 10,5  $\mu\text{L}$  ELB u svaki bunarčić i odvajanjem PCR-ploče od magneta. Nakon mešanja pipetiranjem, uzorci su inkubirani 2 min na sobnoj temperaturi i centrifugirani (10s, 280  $\times$  G). Potom je PCR-ploča ponovo postavljena na magnetnu ploču i nakon 2 min, gornja faza (8,5  $\mu\text{L}$ ) je prebačena na novu ploču za PCR.

#### **3.4.3.2. Priprema PE biblioteka za sekvenciranje**

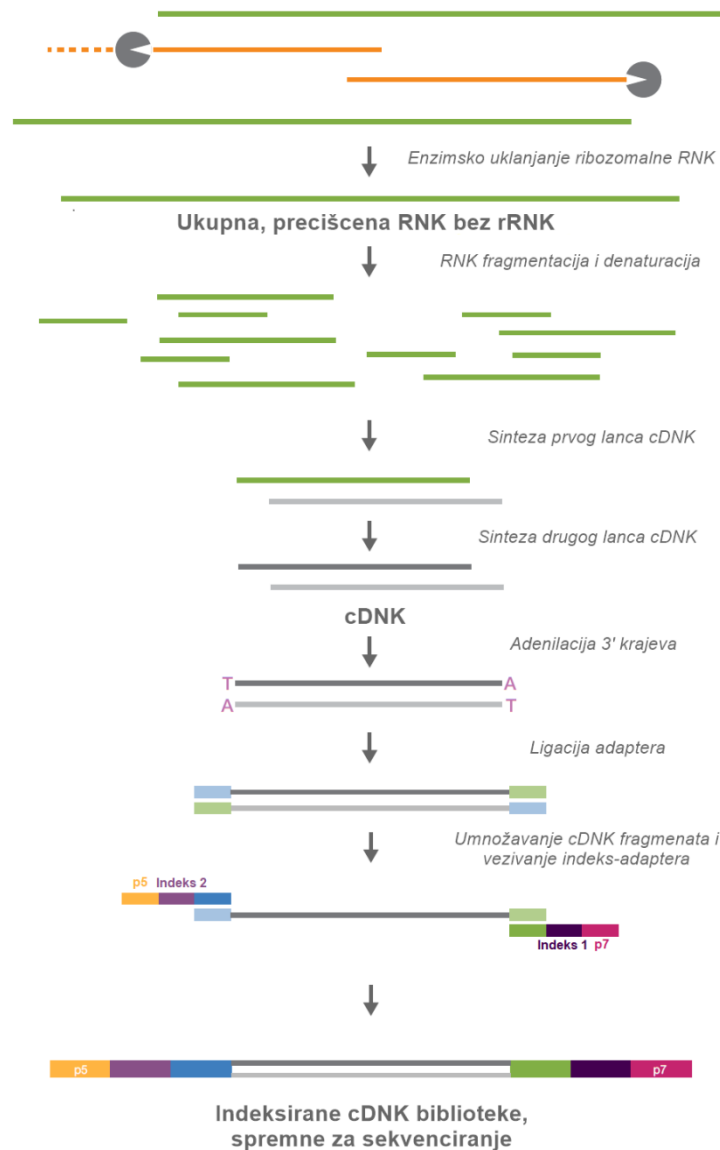
Priprema PE biblioteka za sekvenciranje NGS metodom je urađena pomoću komercijalnog kita *Stranded Total RNA Prep, Ligation kit (Illumina®, SAD)*, prema instrukcijama proizvođača: ukupna, prečišćena RNK bez rRNK dobijena is prethodnog koraka je fragmentisana i denaturisana, nakon čega je izvršena sinteza oba lanca cDNK, adenilacija 3' krajeva i ligacija adaptera, umnožavanje cDNK fragmenata i formiranje PE-cDNK biblioteka (Slika 3.2).

##### **3.4.3.2.1. Sinteza komplementarne DNK**

U prvom koraku, ukupna, prečišćena RNK je fragmentovana i prajmeri nasumičnih heksamera (eng. *random hexamers*) su vezani za fragmente, čime je svaki uzorak pripremljen za sintezu prvog lanca cDNK. U svaki bunarčić je dodato po 8,5  $\mu\text{L}$  rastvora EPH3 iz kita (eng. *Elute, Prime, Fragment 3HC Mix*) i uzorak je promešan pipetiranjem. PCR-ploča je potom postavljena u PCR aparat i zagrevana prema sledećem programu: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 94°C u trajanju od 2 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. Nakon toga se započinje proces sinteze prvog lanca cDNK – heksamer-vezani fragmenti RNK se reverzno transkribuju i formira se prvi lanac cDNK.

Radni rastvor za sintezu prvog lanca cDNK je pripremljen rastvaranjem 1  $\mu\text{L}$  reverzne transkriptaze (RVT) u 9  $\mu\text{L}$  pufera za sintezu prvog lanca cDNK (eng. *first strand synthesis mix*), za svaki uzorak. U svaki bunarčić PCR-ploče je dodato po 8  $\mu\text{L}$  radnog rastvora za sintezu prvog

lanca cDNK i sadržaj je promešan pipetiranjem. Nakon što je PCR-ploča centrifugirana (10s, 280 × G), postavljena je u PCR aparat podešen na sledeći program: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 25°C u trajanju od 10 min; 42°C u trajanju od 15 min; 70°C u trajanju od 15 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. U sledećem koraku je sintetisan drugi lanac cDNK i dobijeni su dvolančani fragmenti cDNK. Proces je iniciran dodavanjem 25 µL rastvora za označavanje drugog lanca (eng. *Second Strand Marking Master Mix*, SMM) u svaki bunarčić. Nakon mešanja pipetiranjem i centrifugiranja (10s, 280 × G), PCR-ploča je postavljena u PCR aparat podešen na sledeći program: inicijalno zagrevanje poklopca na 40°C; 16°C u trajanju od 60 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C.



**Slika 3.2 Priprema PE (eng. *paired end*, PE) biblioteka za sekvenciranje.** Koraci neophodni za konstrukciju biblioteka komplementarne DNK (cDNK) uključivali su: enzimsko uklanjanje ribozomalne RNK (rRNK); fragmentaciju i denaturaciju prečišćene RNK bez rRNK; sintezu prvog i drugog lanca cDNK; adenilaciju 3' krajeva; ligaciju adaptera; selektivno umnožavanje cDNK fragmenata vezanih za adaptore i dodavanje indeks-adapteta. Slika preuzeta iz *Illumina® Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero™ Plus Data Sheet* (M-GL-02148 v1.0, © 2023 Illumina, Inc., SAD).

Konačno, iz uzoraka je uklonjena sva RNK dodavanjem po 90 µL *AMPure XP* rastvora magnetnih kuglica. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min, a zatim postavljeni na magnetnu ploču. Nakon 5 min, uklonjeno je 130 µL gornje faze iz svakog bunarčića i dodato 175

$\mu\text{L}$  80% etanola za ispiranje. Kuglice su ispirane 30s, i nakon što je gornja faza odvojena i odbačena, korak ispiranja je ponovljen. Sav etanol je zatim uklonjen pipetiranjem i magnetne kuglice su osušene (2 min). PCR-ploča je udaljena od magnetne ploče i u svaki bunarčić je dodato po 19,5  $\mu\text{L}$  pufera za resuspenziju (eng. *Resuspension Buffer*, RSB). Uzorci su inkubirani 2 min na sobnoj temperaturi, centrifugirani (10s, 280  $\times$  G) i ponovo postavljeni na magnetnu ploču. U poslednjem koraku, po 17,5  $\mu\text{L}$  gornje faze bez kuglica svakog uzorka je preneto u bunarčiće nove ploče za PCR.

#### 3.4.3.2.2. Adenilacija 3' krajeva i ligacija adaptera

Adenilacijom 3' krajeva se adenin-nukleotidi vezuju za 3' krajeve cDNK, u cilju sprečavanja vezivanja cDNK jedne za drugu tokom procesa ligacije adaptera. U svaki bunarčić PCR-ploče je dodato po 12,5  $\mu\text{L}$  rastvora ATL4 (eng. *A-Tailing Mix*) i sadržaj je promešan pipetiranjem. PCR-ploče su postavljene u PCR aparat, podešen na sledeći program: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 37°C u trajanju od 30 min; 70°C u trajanju od 5 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C.

U sledećem koraku je izvršena ligacija pre-indeksnih adaptera na krajeve dvolančanih cDNK molekula, u cilju pripreme za dvojno indeksiranje, koje podrazumeva vezivanje indeks adaptera za oba kraja jednog cDNK lanca. Indeksni adapteri služe za obeležavanje cDNK iz različitih cDNK biblioteka, čime je omogućeno sekvenciranje većeg broja cDNK biblioteka zajedno u isto vreme. PCR-ploča je prvo centrifugirana (10s, 280  $\times$  G), a potom je u svaki bunarčić dodato po 2,5  $\mu\text{L}$  RSB pufera. Nakon toga je otvorena ploča sa pre-indeksnim adapterima (eng. *Anchor plate, RNA Index Anchors*), i po 2,5  $\mu\text{L}$  je prebačeno u bunarčiće PCR-ploče. Na kraju je dodato po 2,5  $\mu\text{L}$  rastvora za ligaciju (LIGX) i uzorci su dobro promešani i centrifugirani (10s, 280  $\times$  G). PCR-ploča je postavljena u PCR aparat, podešen na program koji je uključivao sledeće korake: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 30°C u trajanju od 10 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. Nakon završene reakcije, u svaki bunarčić je dodato po 5  $\mu\text{L}$  pufera za prekid ligacije (eng. *Stop Ligation Buffer*, STL).

Na kraju, uzorci su prečišćeni dodavanjem 34  $\mu\text{L}$  *AMPure XP* rastvora magnetnih kuglica i 175  $\mu\text{L}$  80% etanola, prema protokolu opisanom u prethodnom poglavlju (3.4.3.2.1 *Sinteza komplementarne DNK, cDNK*). Posle prečišćavanja, uzorci su opet rastvoreni i resuspendovani dodavanjem po 22  $\mu\text{L}$  RSB pufera u svaki bunarčić. Uzorci su inkubirani 2 min na sobnoj temperaturi, centrifugirani (10s, 280  $\times$  G) i ponovo postavljeni na magnetnu ploču. Odvojeno je po 20  $\mu\text{L}$  gornje faze svakog uzorka bez kuglica i prebačeno u bunarčiće nove ploče za PCR.

#### 3.4.3.2.3. Umnožavanje cDNK fragmenata i formiranje cDNK biblioteka

U ovom koraku dolazi do selektivnog umnožavanja cDNK fragmenata vezanih za adaptere i dodavanja indeks-adaptera i prajmer sekvenci za stvaranje klastera za sekvenciranje (eng. *sequencing clusters*). Ovim se dobija dvojno indeksirana cDNK biblioteka, odnosno umnoženi DNK fragmenti sa adapterima i na 3' i 5' kraju.

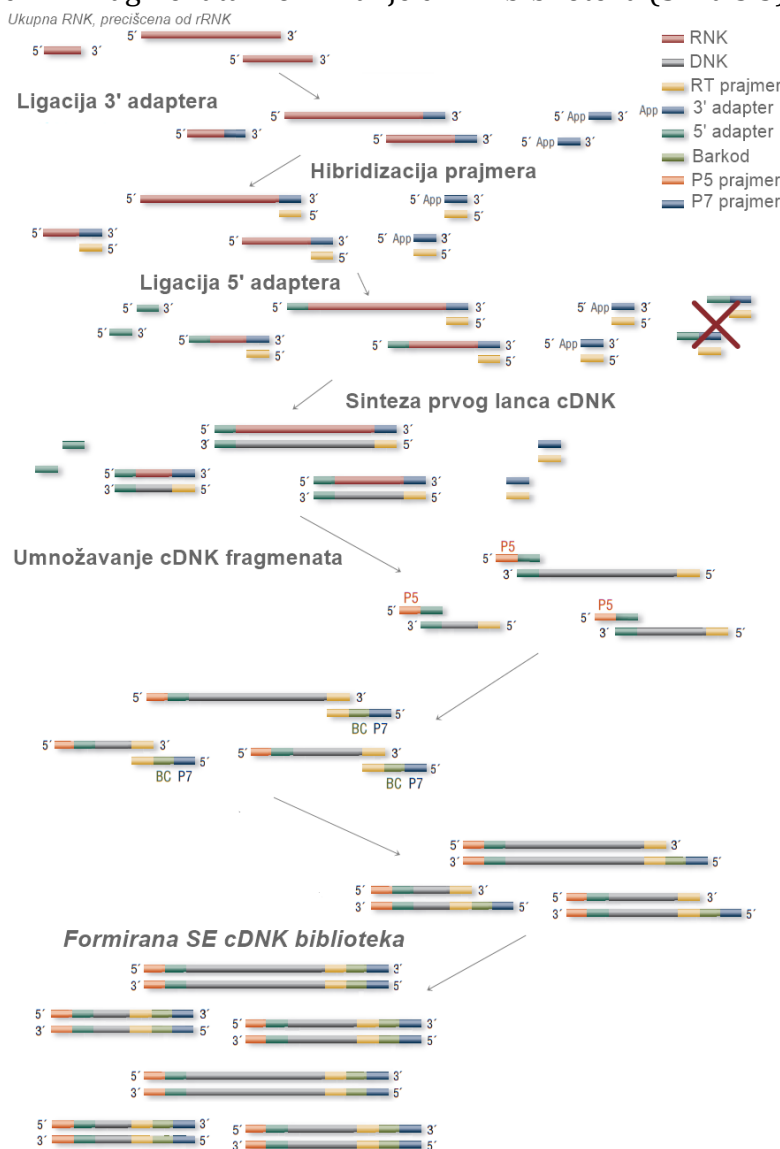
Pre početka amplifikacije, pripremljena je ploča sa indeks-adapterima (eng. *Index adapter plate, containing UDPOXXX*), tako što je zaštitna folija na ploči probušena na broju bunarčića jednakom broju uzoraka koji će biti sekvencirani, korišćenjem novog nastavka za mikropipetu za svaki bunarčić. Iz svakog bunarčića u ploči sa indeks-adapterima je preneto po 10  $\mu\text{L}$  UDPOXXX rastvora u odvojene bunarčiće sa uzorcima na PCR-ploči. UDPOXXX predstavlja fabričku smešu indeks 1 (i7) i indeks 2 (i5) adaptera. Nakon toga u svaki bunarčić je dodato i po 20  $\mu\text{L}$  reakcionog pufera za PCR poboljšane procesivnosti (eng. *Enhanced PCR Mix*, EPM) i reakciona smeša je promešana pipetiranjem. Posle centrifugiranja (10 s, 280  $\times$  G), PCR ploča je postavljena

u PCR aparat podešen na program koji je uključivao sledeće korake: inicijalna denaturacija (98°C, 30s); 10 ciklusa denaturacije (98°C, 10s), vezivanja adaptera (60°C, 30s) i elongacije DNK (72°C, 30s); finalna elongacija (72°C, 5 min) i snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C.

Posle amplifikacije, ponovljen je korak prečišćavanja uzorka magnetnim kuglicama (50 µL *AMPure XP* rastvora po bunarčiću) i 80% etanolom (175 µL), opisan u poglavlju 3.4.3.2.1 *Sinteza komplementarne DNK, cDNK*. Na kraju je dobijeno 15 µL prečišćenih cDNK biblioteka sa vezanim adapterima po uzorku. Kvalitet dobijenih biblioteka proveren je na aparatu *2100 Bioanalyzer* i uz pomoć komercijalnog kita *DNA Nano 10000 Assay Kit (Agilent®)*, na prethodno opisan način (3.4.2.3 *Provera kvaliteta ukupne RNK*).

### 3.4.3.3. Priprema SE biblioteka za sekvenciranje

Priprema SE biblioteka za sekvenciranje NGS metodom je urađena pomoću komercijalnog kita *NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (NEB®, SAD)*, prema uputstvu proizvođača: izvršena je ligacija 3' adaptera, hibridizacija prajmera, ligacija 5' adaptera, sinteza cDNK, amplifikacija cDNK fragmenata i formiranje cDNK biblioteka (Slika 3.3).



**Slika 3.3 Priprema SE (eng. *single end*, SE) biblioteka za sekvenciranje.** Koraci neophodni za konstrukciju biblioteka komplementarne DNK, cDNK uključivali su: ligaciju 3' adaptera; hibridizaciju prajmera; ligaciju 5' adaptera; sintezu cDNK, i

umnožavanje cDNK fragmenata i formiranje cDNK biblioteka. Slika preuzeta iz *NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® Set 1, Set 2, Index Primers 1–48 and Multiplex Compatible (NEB #E7300S/L, © Copyright 2020, New England Biolabs, Inc., SAD)*.

Na PCR-ploču su naneti uzorci (6 µl) ukupne, prečišćene RNK bez rRNK, nakon čega je u svaki bunarčić dodato po 1 µl rastvora 3' SR adaptera iz kita. Sadržaj bunarčića je promešan pipetiranjem. Nakon centrifugiranja (10s, 280 × G), PCR-ploča je postavljena u PCR aparat podešen na sledeći program: inicijalno zagrevanje poklopca na 100°C; 70°C u trajanju od 2 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. U sledećem koraku je u svaki bunarčić naneto po 10 µl pufera za ligaciju 3' adaptera (eng. *3' Ligation Reaction Buffer*) i 3 µl rastvora 3' ligacionih enzima (eng. *3' Ligation Enzyme Mix*) i promešano pipetiranjem. Ploča je inkubirana na 25°C u trajanju od 60 min, u PCR aparatu.

Hibridizacija prajmera je korak važan za sprečavanje formiranja adapter-dimera. SR-RT prajmer, korišćen u ovom koraku, hibridizuje sa viškom 3' adaptera i transformiše ga u dvolančani molekul, koji više nije supstrat za enzim potreban za ligaciju 5' adaptera, T4 RNK ligazu 1. U svaki bunarčić PCR-ploče je dodato po 4,5 µl ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza i 1 µl rastvora SR-RT prajmera, nakon čega je PCR-ploča postavljena u PCR-aparat podešen na sledeći program: inicijalno zagrevanje poklopca na 85°C; 75°C u trajanju od 5 min; 37°C u trajanju od 15 min; 25°C u trajanju od 15 min; snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. U sledećem koraku izvršena je ligacija 5' SR adaptera: u svaki bunarčić je dodato po 1 µl rastvora 5' adaptera, 1 µl 10X pufera za ligaciju 5' adaptera i 2,5 µl rastvora 5' ligacionih enzima (eng. *5' Ligation Enzyme Mix*). Uzorci su potom inkubirani na 25°C u trajanju od 60 min.

Kada su 3' i 5' adapteri bili vezani za RNK molekule u uzorcima, bilo je moguće započeti proces reverzne transkripcije i sinteze cDNK. U bunarčiće sa RNK molekulima sa vezanim adapterima dodato je 8 µl pufera za sintezu prvog cDNK lanca (eng. *First Strand Synthesis Reaction Buffer*), 1 µl rastvora inhibitora RNaze i 1 µl rastvora *ProtoScript II* reverzne transkriptaze. Uzorci su potom inkubirani na 50°C u trajanju od 60 min.

Usledilo je umnožavanje cDNK fragmenata i uspostavljanje SE cDNK biblioteka. U svaki uzorak je dodato po 50 µl *LongAmp Taq 2X* reakcionog pufera za PCR, 2,5 µl rastvora SR prajmera, 2,5 µl rastvora indeks-prajmera, i 5 µl ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza. Nakon toga ploča za PCR je postavljena u PCR-aparat, podešen na sledeći program: inicijalna denaturacija (94°C, 30s); 15 ciklusa denaturacije (94°C, 15s), vezivanja adaptera (62°C, 30s) i elongacije DNK (70°C, 15s); finalna elongacija (70°C, 5 min) i snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C. Kvalitet dobijenih biblioteka proveren je na aparatu 2100 Bioanalyzer i uz pomoć komercijalnog kita *DNA Nano 10000 Assay Kit (Agilent®, SAD)*, na prethodno opisan način (*3.4.2.3 Provera kvaliteta ukupne RNK*).

#### **3.4.4. Sekvenciranje ukupnog transkriptoma**

Sekvenciranje metodoma nove generacije je urađeno na *NovaSeq 6000* sekvenceru (*Illumina®, SAD*), u laboratorijama centra *Novogene Bioinformatics Technology Co. Ltd.*, u Pekingu (NRK). I u slučaju PE i SE sekvenciranja, nakon formiranja PE i SE biblioteka, usledilo je razblaživanje do jednakih koncentracija, formiranje klastera, odnosno specifičnih grupa cDNK fragmenata (eng. *cluster generation*) i sekvenciranje. Formiranje klastera cDNK fragmenata i sekvenciranje su koraci koji su izvršeni u sekvenceru, nakon postavljanja uzoraka, protočne ćelije (eng. *flow cells*) i kertridža sa *NovaSeq 6000 S2* reagensima u aparat.

Kertridž sa reagensima je pripremljen pre početka sekvenciranja, postavljanjem kertridža na 4°C 24h pre sekvenciranja, tako da su svi reagensi otopljeni ravnomerno. Kertridž je obeležen jedinstvenim identifikacionim brojem i postavljen u sekvencer. cDNK biblioteke pojedinačnih

uzoraka su nanešene na protočne ćelije specifične za *NovaSeq 6000* aparat, koje su takođe postavljene u sekvencer. Proces sekvenciranja je započet nakon toga: za PE sekvenciranje program je uključivao 2×150 bp sekvenciranje sa dvojnim indeksima (i7 i i5), a za SE, 1×50 bp sekvenciranje.

### **3.5. Bioinformatička obrada podataka dobijenih sekvenciranjem**

Sirovi podaci (eng. *raw reads*) dobijeni PE sekvenciranjem sadržali su informacije o iRNK, lncRNK i circRNK, dok su podaci dobijeni SE sekvenciranjem obuhvatali samo sRNK. Sirovi podaci su dobijeni u *FASTQ* formatu, ali s obzirom da *FASTQ* datoteke zauzimaju veliki deo memorije računara, one su sabijene, odnosno komprimovane (eng. *compressed*) u *FASTQZ* tip datoteka (*FASTQ zipped*). Početni koraci obrade sirovih podataka su bili zajednički za sve tipove RNK i uključuju proveru kvaliteta i prečišćavanje sirovih podataka, ponovnu proveru kvaliteta i poravnanje prečišćenih sekvenci (eng. *clean reads*) sa referentnim genomom, odnosno mapiranje. Sledeći koraci su specifični za svaku klasu RNK, i detaljno su opisani u pojedinačnim poglavljima. Ceo protokol za analizu svih klasa RNK je prikazan na Slici 3.4.

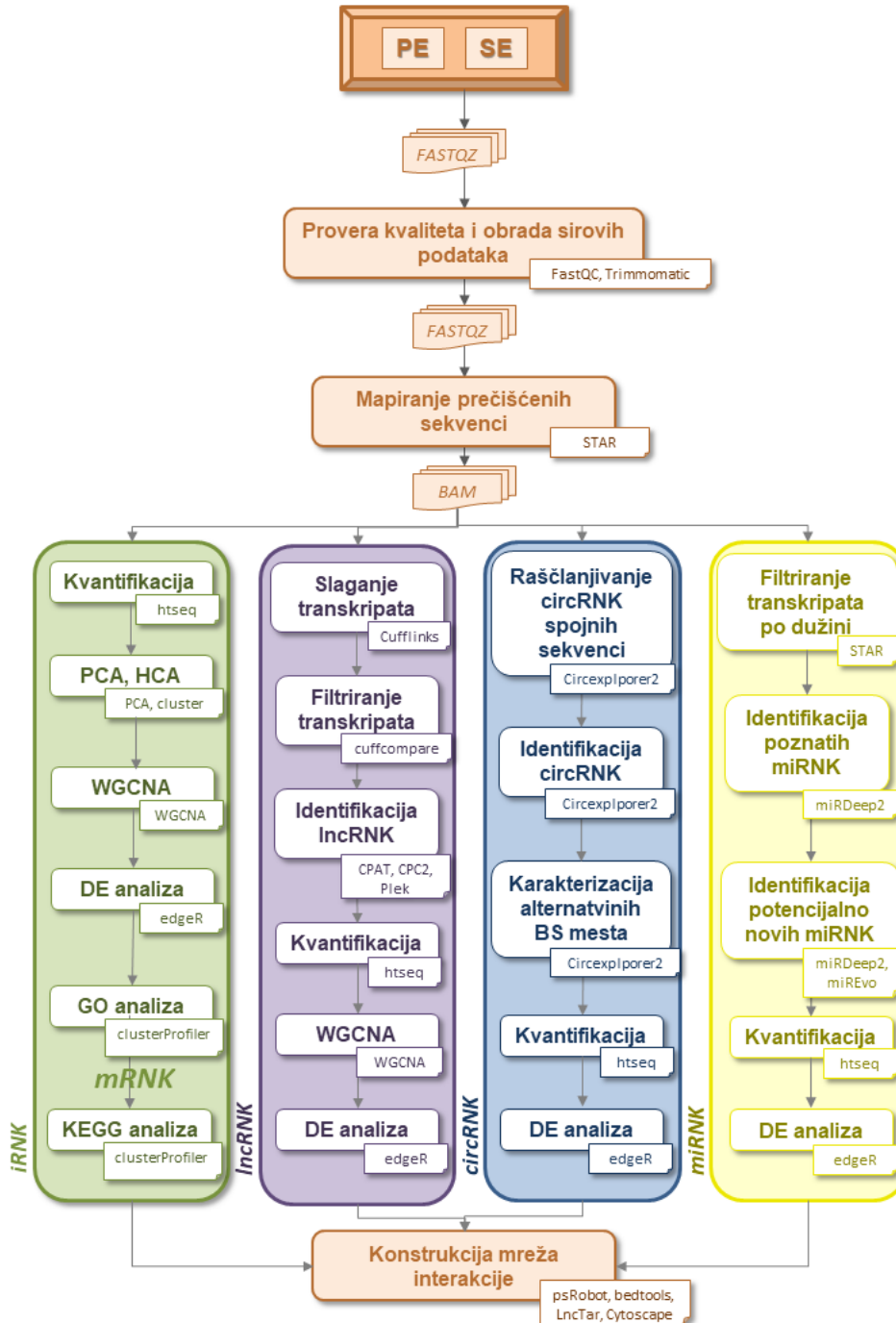
#### **3.5.1. Obrada sirovih podataka i poravnanje sa referentnim genomom**

Provera kvaliteta sirovih *FASTQZ* podataka je urađena primenom bioinformatičkog alata *FastQC* (verzija 0.12.1, Andrews, 2010), u terminalu *Ubuntu* operativnog sistema. Rezultati provere kvaliteta sekvenciranja *FastQC* alatom su pojedinačni izveštaji za svaki uzorak koji sadrže: osnovnu statistiku sekvenciranja (tip sekvenciranja, ukupan broj sekvenci, ukupan broj nukleotidnih baza, dužinu sekvenci, procenat GC parova), kvalitet sekvenciranja po nukleotidnoj bazi (eng. *per base sequence quality*) i ocenu kvaliteta, QC (eng. *quality score*, QC), procentualni sadržaj azotnih baza po poziciji u sekvenci (eng. *per base sequence content*), GC sadržaj po poziciji u sekvenci (eng. *per sequence GC content*), raspodelu sekvenci po dužini (eng. *sequence length distribution*), sadržaj neidentifikovanih baza (eng. *per Base N content*, N%) i prezastupljene sekvence (eng. *overrepresented sequences*). Radi lakšeg sagledavanja podataka, ovi pojedinačni izveštaji su kombinovani u zajednički izveštaj primenom *MultiQC* alata (verzija 1.25.1, Ewels i sar., 2016).

Sirove sekvence su potom obrađene u bioinformatičkom alatu *Trimmomatic* (verzija 0.39-2, Bolger i sar., 2014), tako da su sekvence niskog kvaliteta (QC < 30), sekvence sa visokim udelom neidentifikovanih baza (N% > 10%), kao i sekvence koje su sadržale adaptore korišćene tokom sekvenciranja, odbačene. Takođe, u slučaju SE biblioteka urađeno je dodatno filtriranje po dužini sekvenci: sve sekvence kraće od 18, a duže od 31 nukleotida su odbačene. Nakon što je obrada sekvenci završena, ponovljen je korak provere kvaliteta, da bi se kvalitet prečišćenih sekvenci potvrdio.

Prečišćene sekvence su zatim poređene sa već poznatim sekvencama, korišćenjem referentnog genoma kukuruza, da bi se utvrdila tačna pozicija prečišćenih sekvenci u genomu, odnosno da bi se sekvence mapirale. Kao referentni genom korišćen je *Zea mays* B73 NAM v5.0 ([https://plants.ensembl.org/Zea\\_mays/Info/Index](https://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index)). Poravnanje prečišćenih sekvenci sa sekvencama referentnog genoma je urađeno primenom *STAR* bioinformatičkog alata (verzija 2.7.11, Dobin i sar., 2013). Prvi korak je bio indeksiranje referentnog genoma koji će *STAR* alat koristiti za mapiranje: ovo je urađeno u specifičnom režimu rada (eng. *runMode*) u *STAR* alatu, označenom kao „*genomeGenerate*“. Indeksiranje je omogućilo brži pronalazak potencijalnih mesta poravnanja za sekvence upita u genomu. Nakon što je referentni genom indeksiran, urađeno je poravnanje prečišćenih sekvenci sa referentnim genomom (*--runMode alignReads*). Za PE sekvence korišćeni su sledeći parametri: maksimalni broj pogrešnih poravnanja – 15 (*--*

*outFilterMismatchNmax* 15) i maksimalni dozvoljen broj poravnanja - 50 (--*outFilterMultimapNmax* 50). Takođe, odabran je tip izlazne datoteke kao BAM (eng. *binary alignment map*), sortiran prema koordinatama, odnosno hromozomalnoj poziciji i dodate su XS oznake za sva poravnanja koja sadrže mesta spajanja ili splajsovanja, SJ (eng. *splicing junctions*, SJ). Za SE sekvence su većinom korišćeni isti parametri, izuzev maksimalnog broja pogrešnih poravnanja na 0 (--*outFilterMismatchNmax* 0). Nakon što su prečišćene sekvence mapirane, odnosno poravnane sa sekvencama referentnog genoma, pojedinačne analize ekspresije za svaku klasu RNK molekula su mogle biti urađene.



**Slika 3.4 Protokol bioinformatičkih analiza za sve četiri klase RNK molekula.** Analize zajedničke za sve klase su obeležene narandžastom bojom; iRNK zelenom, lncRNK ljubičastom, circRNK plavom i miRNK žutom bojom. Bioinformatički alati primenjeni u svakom koraku su prikazani pored naziva koraka.

## **3.5.2. Analiza ekspresije iRNK**

### **3.5.2.1. Kvantifikacija iRNK**

Proučavanje obrazaca ekspresije iRNK zahtevalo je prvo njihovu kvantifikaciju, odnosno određivanje tačnog broja sekvenci poreklom sa određenih genomskih svojstava (eng. *genomic features*). Genomsko svojstvo je bilo koji interval, odnosno opseg hromozomalnih pozicija, ili zajednica tih intervala. U slučaju sekvenciranja transkriptoma, genomsko svojstvo je gen, odnosno skup svih egzona određenog gena. Ovaj korak je urađen pomoću bioinformatičkog alata *htseq* (verzija 2.0.5, Putri i sar., 2022). Za kvantifikaciju je takođe bila neophodna lista okarakterisanih genomskih svojstava koji se mogu kvantifikovati: u slučaju gena, to je genomski anotacija u *GTF/GFF3* formatu. Ona uključuje strukturnu i funkcionalnu anotaciju. Pod strukturnom se podrazumevaju ORF, lokalizacija, odnosno hromozomske pozicije egzona, identifikacioni broj gena (eng. *gene ID*). Funkcionalna anotacija obuhvata biološku funkciju, biohemijske karakteristike, interakcije sa drugim molekulima. Genomska anotacija za kukuruz je fomirana zajedno sa referentnim genomom i dostupna je na istoj veb-stranici (*Zea\_mays\_B73\_RefGen\_v5.exon.gtf*; [https://plants.ensembl.org/Zea\\_mays/Info/Index](https://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index)). Kao parametri analiza postavljeni su i sledeći uslovi: poreklo lanca je nepoznato, odnosno podaci nisu vezani za određeni lanac (*--stranded=no*); podaci su sortirani prema hromozomskoj poziciji (*-r pos*); podrazumevani režim rada (eng. *default*; *-m union*). Rezultati dobijeni ovom metodom su se nalazili u tabeli koja je sadržala broj sekvenci koji odgovaraju svakom genu (eng. *read counts*, RC). Ovaj format odgovara alatima za računanje diferencijalne ekspresije, ali je za statističku analizu obrazaca ekspresije među uzorcima neophodno da oni budu normalizovani. Normalizacija je urađena transformacijom RC u FPKM vrednosti, odnosno broja fragmenata po kilobazi transkripata za svakih milion mapiranih sekvenci (eng. *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*). Programski paket *DESeq2* (verzija 3.2, Love i sar., 2014), koji funkcioniše u R sredini (verzija 4.3.3, R Core Team, 2024) je korišćen za navedeno preračunavanje.

### **3.5.2.2. Analiza glavnih komponenti (PCA)**

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) je urađena korišćenjem dobijenih FPKM vrednosti, pomoću *factoextra* paketa (Kassambara i Mundt, 2020) u R programu. Tabele sa FPKM vrednostima za svaki gen i svaki uzorak su unete u R programsku sredinu i PCA analiza je urađena primenom *PCA()* funkcije *factoextra* paketa. Prvo su izračunate Eigen-vrednosti, da bi se odredila količina varijacije koju zadržava svaka varijabla, odnosno glavna komponenta, PC (eng. *principal component*). Nakon toga su izračunate koordinate svake PC (*coord*), korelacije između PC i dimenzija analize (*cor*),  $\cos^2$  vrednosti PC (*cos2*) i individualni doprinosi svake PC (*contrib*). Dobijeni podaci su korišćeni za vizuelizaciju i fomiranje grafika individua, odnosno doprinosa PC razlici između individua, koje su u ovom slučaju bile pojedinačni uzorci.

### **3.5.2.3. Hijerarhijska analiza grupisanja (HCA)**

Hijerarhijska analiza grupisanja, odnosno hijerarhijska klaster analiza (eng. *hierarchical cluster analysis*, HCA) je takođe urađena korišćenjem FPKM vrednosti, pomoću *cluster R* paketa (Maechler i sar., 2023). Sklonost ka grupisanju (eng. *clustering tendency*) je prvo potvrđena na dva načina: Hopkinsovom statističkom metodom (*hopkins* R paket; Wright, 2023) i vizuelno (*fvizdist()* funkcija *factoextra* paketa). Matrice distanci (eng. *distance matrix*) su dobijene primenom metode za izračunavanje Euklidskih distanci. Aglomerativna hijerarhijska klaster analiza, AGNES (eng. *agglomerative clustering/nesting*) je zatim urađena korišćenjem matrice distanci i izabrane metode vezanosti (eng. *linkage method*), Vordove metode minimalne varijanse

(eng. *Ward's minimum variance method*). AGNES analiza je urađena korišćenjem *hclust()* funkcije *cluster* paketa. Hit-mapa (eng. *heat map*) i dendrogram, dobijeni na osnovu AGNES analize, su dizajnirani u *Heatmap* R paketu.

#### **3.5.2.4. Analiza diferencijalne ekspresije (DE analiza)**

Analiza diferencijalne ekspresije, DE analiza, je urađena u *edgeR* (Robinson i sar., 2010) R paketu, radi identifikacije DE gena između kontrolnih i tretiranih uzoraka oba genotipa nakon 6 i 24h tretmana. Sirovi RC podaci su korišćeni za sintezu *DGEList* objekata koje *edgeR* paket prihvata, pomoću funkcije *DGEList()*. Nakon toga je izvršeno filtriranje na osnovu nivoa ekspresije i minimalan broj sekvenci po uzorku je bio 15. Takođe, *DGEList* objekti kontrolnih i tretiranih uzoraka oba genotipa, u obe vremenske tačke ( $L_T$  C-T 6h,  $L_T$  C-T 24h,  $L_S$  C-T 6h,  $L_S$  C-T 24h) su normalizovani primenom funkcije *normLibSizes()*. Za DE analizu je primenjena qCML metoda (eng. *quantile-adjusted conditional maximum likelihood*), sa procenjenim koeficijentom biološke varijabilnosti (eng. *biological coefficient of variation*, BCV): BCV=0,3.

Statistička značajnost dobijenih rezultata je određena primenom testa negativne binomne distribucije (eng. *negative binomial distribution test*; Anders i Huber, 2010; Roberts i sar., 2011). Dobijene p-vrednosti su prilagođene u skladu sa Bajesovom interpretacijom (Storey, 2003). Prilagođena p-vrednost je označena kao q-vrednost, i dalje korišćena za određivanje statističke značajnosti rezultata. Geni sa promenom ekspresije (eng. *fold change*, FC) između kontrole i tretmana, koja je zadovoljavala sledeći uslov:  $\log_2(FC) \geq 1$  ili  $\leq -1$  (q-vrednost < 0,01), su smatrani značajno diferencijalno ekspimiranim.

#### **3.5.2.5. Analiza funkcionalnog obogaćivanja**

Analiza funkcionalnog obogaćivanja (FEA) omogućava sagledavanje gena čija diferencijalna ekspresija značajno utiče na određeni proces ili deo ćelije. Diferencijalno ekspimirani geni moraju biti funkcionalno anotirani u određenim bazama podataka, kao što su *Entrezid* ili *Uniprot*, nakon čega mogu biti urađene GO i KEGG analiza (Kanehisa i sar., 2008).

GO i KEGG analize su urađene primenom analize prezastupljenosti (eng. *Over-Representation Analysis*, ORA) pomoću *clusterProfiler* (Wu i sar., 2021) i *biomartr* R-paketa (Drost i Paszkowski, 2017). R-paket *biomartr* je korišćen za preuzimanje podataka za kukuruz iz *Entrezid* baze podataka; dok su same analize urađene funkcijama *enrichGO()* i *enrichKEGG()* u *clusterProfiler* paketu. Statistički značajnim GO i KEGG terminima su smatrani oni koji su prema Fišerovom testu tačne verovatnoće, korigovanom prema Bonferoniju, imali vrednosti  $p < 0,05$ .

#### **3.5.2.6. Analiza obrazaca koekspresije**

Obrasci koekspresije i genski moduli su identifikovani na osnovu WGCNA analize (eng. *weighted gene co-expression network analysis*), pomoću *WGCNA* R paketa (Langfelder i Horvath, 2008).

Ukratko, prvo je postavljen osnovni parametar analize, STP vrednost (eng. *soft threshold power*). Kada je STP vrednost izračunata, sledeći korak je bio identifikacija genskih modula – napravljena je matrica povezanosti, koja je primenom STP vrednosti kao praga analize, transformisana u ponderisanu matricu korelacija (eng. *weighted correlation matrix*). Iz matrice je bilo moguće identifikovati module i gene koji im pripadaju pomoću *blockwiseModules()* funkcije *WGCNA* paketa. Potom su formirane asocijacije modul-osobina – u ovom slučaju osetljivost/tolerantnost na niske temperature. Pirsonove korelacije između genskih modula i osobine su izračunate pomoću *cor()* funkcije, dok je statistička značajnost tih korelacija izračunata Studentovim testom, pomoću *corPvalueStudent()* funkcije.

### **3.5.3. Analiza ekspresije lncRNK**

Pre početka analize ekspresije lncRNK tokom stresa izazvanog niskim temperaturama, bilo je neophodno identifikovati same lncRNK molekule i odvojiti ih od kodirajućih delova genoma. Ovo je zahtevalo sklapanje (eng. *assembly*) i funkcionalnu anotaciju mapiranih transkripata iz prethodnog koraka (3.5.1 *Obrada sirovih podataka i poravnanje sa referentnim genomom*). Ovaj korak je urađen pomoću bioinformatičkog alata *Cufflinks* (verzija 2.2.1, Trapnell i sar., 2010), primenom pristupa zasnovanog na korišćenju referentne datoteke (eng. *reference annotation based transcript*, RABT) – i u ovom slučaju su primenjene genomske anotacije korišćene i za kvantifikaciju informacionih RNK (*Zea\_mays\_B73\_RefGen\_v5.exon.gtf*; [https://plants.ensembl.org/Zea\\_mays/Info/Index](https://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index)).

Anotirani transkripti su potom profiltrirani na osnovu njihove dužine (> 200 nt), broja egzona ( $\geq 2$ ) i nivoa ekspresije (FPKM > 0,1) – ovaj korak je urađen pomoću skripte, specifično kreirane za ovu namenu. Zatim je komanda *cuffcompare* u *Cufflinks* alatu, korišćena za filtriranje transkripata koji odgovaraju poznatim protein-kodirajućim regionima. Ova komanda takođe obeležava sve transkripte određenim klasnim oznakama, sa specifičnim značenjem, npr. klasna oznaka „e“ obeležava transkripte koji se potpuno poklapaju sa referentnim egzonom i delom referentnog introna, ukazujući na to da je transkript moguć pre-iRNK fragment. Nakon što su svi transkripti obeleženi klasnim oznakama, oni su profiltrirani i zadržani su samo oni koji ukazuju na mogući nedostatak sposobnosti kodiranja proteina:

- “u” – nepoznat, intergenski transkript
- “i” – transkript čija cela sekvenca pripada referentnom intronu
- “o” – egzonsko poklapanje sa referentnim transkriptom
- “x” – egzonsko poklapanje sa referentnim transkriptom na suprotnom lancu

Potencijal za kodiranje proteina preostalih transkripata je dodatno ispitivan sa tri različite metode, odnosno bioinformatička alata: *CPC2* (Kang i sar., 2017), *CPAT* (Wang i sar., 2013a), i *PLEK* (Li, 2014). Transkripti koji su ocenjeni kao nekodirajući primenom sve tri metode su smatrani za lncRNK molekule.

Kvantifikacija lncRNK fragmenata, kao i analiza diferencijalne ekspresije i WGCNA analiza su urađene na isti način kao i za iRNK (3.5.2 *Analiza ekspresije iRNK*). Ukratko, kvantifikacija je urađena pomoću *htseq* alata, DE analiza pomoću *edgeR* R-paketa, a WGCNA analiza pomoću *WGCNA* R-paketa, prema istim parametrima kao i u analizi iRNK.

### **3.5.4. Analiza ekspresije circRNK**

Detekcija circRNK, i identifikacija alternativnih BS mesta, odnosno alternativnih mesta spajanja reverzne orijentacije, su urađeni pomoću protokola specifično napravljenog u ovu svrhu i bioinformatičkog alata *CIRCexplorer2* (verzija 2.0.5, Zhang i sar., 2016b). Prvo je urađeno poravnanje i raščlanjivanje specifičnih circRNK spojnih sekvenci (eng. *circRNA fusion junction reads*). *CIRCexplorer2* ima ugrađene alate za poravnanje sekvenci, poput *STAR*, i specifičan režim rada (*CIRCexplorer2 align module*) je korišćen za pronalazak specifičnih *fusion-junction* mesta, karakterističnih za circRNK, i njihovo raščlanjivanje od ostatka RNK sekvenci. Nakon toga je urađeno *de novo* sklapanje (eng. *de novo assembly*) circRNK transkripata, zasnovano na RABT metodi, i potencijalno novi circRNK transkripti su kombinovani sa poznatim genskim anotacijama za dalju upotrebu. U poslednjem koraku je izvršena karakterizacija alternativnih BS mesta, i to oba tipa (alternativna 5' i alternativna 3' BS mesta), takođe pomoću *CIRCexplorer2* alata. Kvantifikacija circRNK fragmenata, kao i analiza diferencijalne ekspresije su urađene na isti

način kao i za iRNK (3.5.2 Analiza ekspresije iRNK). Ukratko kvantifikacija je urađena pomoću *htseq* alata, DE analiza pomoću *edgeR* R-paketa.

### **3.5.5. Analiza ekspresije miRNK**

SE sekvenciranjem su dobijeni podaci o ekspresiji malih RNK, RNK molekula dužine < 200 nt. Usledile su analize koje su bile fokusirane samo na miRNK, pa su prečišćene sekvence filtrirane na osnovu dužine fragmenata pre koraka mapiranja ( $\geq 18$  nt,  $\leq 31$  nt), čime su dobijeni podaci samo za miRNK. Dalje analize miRNK su podrazumevale analize već poznatih, očuvanih miRNK (eng. *conserved miRNA*), kao i identifikaciju potencijalno novih molekula miRNK.

Poznate, očuvane miRNK su identifikovane poređenjem kratkih transkripata koji su tokom koraka mapiranja povezani sa poznatim sRNK regionima genoma, sa već prepoznatim i registrovanim miRNK iz *miRBase* baze podataka (verzija 20, <http://www.mirbase.org>; Kozomara i sar., 2019). U ovu svrhu korišćen je bioinformatički alat *miRDeep2* (verzija 2.0.1.3; Friedländer i sar., 2012). Samo sekvence koje su se potpuno poklapale sa sekvencama iz *miRBase* baze podataka su smatrane validnim miRNK. Ove sekvence su takođe poređene sa miRNK sekvencama drugih biljnih vrsta iz baze podataka korišćenjem istog bioinformatičkog alata. Za predviđanje potencijalno novih miRNK bilo je neophodno filtrirati sve kratke transkripte poreklom iz protein-kodirajućih regiona, kao i regiona rRNK, transportnih RNK (tRNK), malih nuklearnih RNK (snRNK) i malih nukleolarnih RNK (snoRNK). Ovo je urađeno poređenjem sekvenci sa sekvencama deponovanim u *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>; Smit i sar., 2013) i *Rfam* baze podataka (<https://rfam.org>; Kalvari i sar., 2021). Potencijalno nove miRNK su zatim predviđene iz sekvenci prekursora miRNK, primenom dva bioinformatička alata, *miREvo* (verzija 1.2; Wen i sar., 2012) i *miRDeep2*. Oba alata su zasnovana na prilagođenom *miRDeep* algoritmu, koji na osnovu neanotiranih kratkih RNK transkripata predviđa potencijalnu sekundarnu strukturu miRNK, strukturu ukosnice, mesta rascepa od strane enzima sličnim dajserima (eng. *DICER-like*), i minimalne slobodne energije neanotiranih kratkih RNK transkripata. Algoritam takođe ima stroge vrednosti nivoa odlučivanja (eng. *cut off values*) rezultata koja značajno ograničavaju mogućnost lažno pozitivnih rezultata. Potencijalne sekundarne strukture miRNK, njihova kvantifikacija i pristranosti prve pozicije su određeni pomoću *miRDeep2* alata.

Analiza diferencijalne ekspresije između kontrolnih i tretiranih uzoraka u obe vremenske tačke i oba genotipa je urađena korišćenjem *DEGseq* R-paketa (verzija 1.2.2; Wang i sar., 2010a), nakon izvršene normalizacije pomoću TPM (eng. *transcripts per million reads*) algoritma (Fahlgren i sar., 2007). Dobijene p-vrednosti su prilagođene u skladu sa Bajesovom interpretacijom. Prilagođene p-vrednosti, označene kao q-vrednosti, su dalje korišćene za određivanje statističke značajnosti rezultata. miRNK sa promenom ekspresije između kontrole i tretmana, koja je zadovoljavala sledeći uslov:  $\log_2(FC) \geq 1$  ili  $\leq -1$  (q-vrednost < 0,01) su smatrane značajno diferencijalno eksprimiranim. Takođe je urađena i HCA analiza primenom TPM vrednosti pomoću *cluster R* paketa (Maechler i sar., 2023). Matrice distanci su dobijene primenom metode za izračunavanje Pirsonovih distanci, po istom principu kao i za iRNK (3.5.2.3 Hijerarhijska analiza grupisanja, HCA).

### **3.5.6. Analiza interakcija između različitih klasa RNK i konstrukcija mreža interakcije**

Potencijalne regulatorne interakcije su analizirane između svih ispitivanih klasa RNK: miRNK-iRNK, miRNK-lncRNK, miRNK-circRNK, i lncRNK-iRNK, radi konstrukcije sveobuhvatne mreže interakcija (eng. *interaction network*).

Interakcije molekula miRNK sa ostalim klasama RNK su ispitivane pomoću bioinformatičkog alata *psRobot* (verzija 1.2; Wu i sar., 2012), zasnovanog na prilagođenom Smit-

Vatermanovom algoritmu. Parametri analize su podrazumevali potpuno poklapanje sekvenci na pozicijama 2–17 u miRNK: bez ikakvog neslaganja, nedozvoljena prazna mesta (eng. *gaps*). Dozvoljeno je samo jedno prazno mesto na udaljenijim pozicijama miRNK (18-30 nt). Program takođe kao parametar ima kaznenu ocenu (eng. *penalty score*), u opsegu 0-5, izračunatu po specifičnoj formuli (Wu i sar., 2012), koji zajedno sa ostalim parametrima određuje rigoroznost (eng. *rigorousness*) analize. Niža kaznena ocena podrazumeva strožije parametre analize i time i pouzdanije rezultate. Za poznate miRNK kaznena ocena je podešena na 1,5, a za potencijalno nove molekule na 2,5.

lncRNK direktno regulišu ekspresiju iRNK na dva moguća načina: *cis*- i *trans*-način. Potencijalne *cis*-lncRNK-iRNK interakcije su analizirane pomoću bioinformatičkog alata *bedtools* (verzija 2.31.1, Quinlan i Hall, 2010) detekcijom egzona, lokalizovanih u neposrednoj blizini identifikovanih lncRNK sekvenci na hromozomima. Parametar analize je postavljen na 100 kb uz ili nizvodno od lncRNK koordinata. Potencijalne *trans*-lncRNK-iRNK interakcije su identifikovane primenom specijalizovanog alata za tu namenu – *LncTar* (verzija 1.0, Li i sar., 2015b). Osnovni parametar analize interakcije ovih molekula jeste slobodna energija vezivanja, dG (eng. *binding free energy*, deltaG – dG) svakog lncRNK-iRNK para, jer je ona indikator stabilnosti komplementarnosti (Santa Lucia, 1998). Bioinformatički alat *LncTar* uvodi novi parametar koji bolje odražava relativnu stabilnost uparenih RNK – dG vrednost normalizovanu po dužinama RNK molekula, odnosno nDG (Dimitrov i Zuker, 2004; Rehmsmeier i sar., 2004). Na osnovu nDG su odabrane potencijalno značajne interakcije – sve one koje su se odlikovale sa nDG < -0,15.

Ukupni rezultati DE analize, odnosno DE rezultati za sve klase RNK, su udruženi sa rezultatima regulatornih interakcija između molekula ispitivanih klasa RNK, radi konstrukcije kompleksne regulatorne mreže interakcija. Pomoću *stats R*-paketa analizirani su obrasci ekspresija svih ispitivanih parova (miRNK-iRNK, miRNK-lncRNK, miRNK-circRNK, i lncRNK-iRNK) i određene Pirsonove korelacije između njih. Za konstrukciju mreža su odabrani samo oni parovi sa statistički značajnom korelacijom ( $p < 0,05$ ). Konstrukcija i vizualizacija formiranih mreža su urađene u *Cytoscape* softveru (verzija 3.10.2, Shannon i sar., 2003).

### **3.6. Validacija rezultata sekvenciranja transkriptoma**

Potvrda rezultata sekvenciranja transkriptoma je izvršena metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze, qRT-PCR (eng. *quantitative real-time polymerase chain reaction*). Validacija podrazumeva odabir reprezentativnog broja gena i nekodirajućih RNK, koje su na osnovu DE analize bile diferencijalno eksprimirane između kontrole i tretmana, i potvrdu njihove diferencijalne ekspresije dodatnom metodom, odnosno kvantitativnim PCR umnožavanjem. Proces je obuhvatao ponovnu postavku eksperimenta, uzorkovanje u istim vremenskim tačkama, izolaciju i prečišćavanje ukupne RNK, sintezu cDNK, i PCR umnožavanje odabranih gena i ncRNK.

#### **3.6.1. Sinteza cDNK**

##### ***3.6.1.1. Priprema uzoraka za reverznu transkripciju RNK i sintezu cDNK***

Eksperiment izlaganja dva genotipa kukuruza uslovima niskih temperatura, kao i u kontrolnim (optimalnim) uslovima, je postavljen kao što je opisano u poglavlju 3.4.1 *Postavka eksperimenta*. Izolacija ukupne RNK je urađena na isti način kao i tokom pripreme uzoraka za sekvenciranje (3.4.2.1 *Izolacija ukupne RNK*). Koncentracija ukupne RNK je potom izmerena spektrofotometrijski (*NanoPhotometer*<sup>®</sup>, *IMPLEN*, *SAD*) i po potrebi uzorci su razblaženi do koncentracije 200 µg/mL. Korak prečišćavanja uzoraka RNK od kontaminacije molekulima DNK je takođe urađen na prethodno opisan način (3.4.2.2 *Prečišćavanje ukupne RNK*). Nakon prečišćavanja, uspešnost izolacije ukupne RNK je proverena na nekoliko načina opisanih u

poglavlju 3.4.2.3 *Provera kvaliteta ukupne RNK* – spektrofotometrijski i horizontalnom agaroznom elektroforezom.

### 3.6.1.2. *Reverzna transkripcija RNK i sinteza cDNK*

Sinteza cDNK, je izvršena uz pomoć komercijalne reverzne transkriptaze, RT (*RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific™*), pomoću koje se vrši sinteza jednolančane DNK komplementarne RNK molekulima u uzorku. Pored reverzne transkriptaze, za ovaj proces su bili neophodni i nasumični heksamerni prajmeri (*Random Hexamer Primer, Thermo Scientific™*), inhibitor RNAze (*RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific™*) i 10 mM smeša dezoksinukleozidtrifosfata, dNTP (*dNTP Mix (10 mM each), Thermo Scientific™*).

Sinteza cDNK se vršila iz 1 µg ukupne, prečišćene RNK, tako da je iz svakog uzorka uzeta zapremina koja je sadržala tu količinu RNK. Ukoliko je ta zapremina bila manja od 11 µL, u svaki uzorak je dodato ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza do navedene zapremine. Nakon toga su dodate sledeće komponente (do ukupne zapremine od 20 µL): 1 µL nasumičnih heksamernih prajmera, 4 µL 5X reakcionog pufera za *RevertAid RT* (eng. *5X RevertAid Reverse Transcriptase Reaction Buffer*), 1 µL *RiboLock* inhibitora, 2 µL dNTP (finalna koncentracija 1 mM) i 1 µL *RevertAid RT*. Uzorci su blago promešani, kratko centrifugirani i reakciona smeša je inkubirana 10 min na 25°C. Nakon završene inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorci su inkubirani 60 min na 42°C. Potom je reakcija reverzne transkripcije prekinuta zagrevanjem na 70°C u trajanju od 10 min. Dobijena cDNK je odložena na -20°C do dalje upotrebe.

### 3.6.1.3. *Provera uspešnosti sinteze cDNK*

Provera uspešnosti sinteze komplementarne DNK iz prečišćene RNK, kao i provera njenog kvaliteta, je urađena kvalitativnom PCR reakcijom uz korišćenje prajmera za referentne gene. U ovom slučaju su korišćeni prajmeri za sekvencu komplementarnu 26s rRNK (Tabela 3.3). Prajmeri su razblaženi do koncentracije 10 µM. Takođe, pre PCR reakcije, uzorci cDNK su razblaženi dva puta (2X) dodavanjem ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza u istoj zapremini.

Svaka PCR reakcija se odvijala u reakcionoj smeši koja sadrži: 1X PCR pufer (*10x DreamTaq Green Buffer, Thermo Fisher Scientific™*), 0,2 mM dNTP (*dNTP Mix (10 mM each), Thermo Scientific™*), 0,5 U/µL TAQ polimerazu (*DreamTaq DNA Polymerase 5 units/µL, Thermo Fisher Scientific™*), 0,4 µM F-prajmer (eng. *forward primer*) i 0,4 µM R-prajmer (eng. *reverse primer*), ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza i cDNK.

**Tabela 3.3** Sekvence prajmera za sekvencu komplementarnu (26s rRNK 26S-rRNA).

Naziv prajmera	Sekvenca
<b>26S-rRNA-F</b>	CACAATGATAGGAAGAGCCGAC
<b>26S-rRNA-R</b>	CAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATC

Sadržaj mikrotuba je promešan i kratko centrifugiran, i mikrotube su zatim postavljene u PCR aparat (*Biometra Thermocycler T-Professional, Analytik Jena GmbH+Co, Nemačka*). Umnježavanje 26s fragmenata se vršilo prema sledećem programu: inicijalna denaturacija (95° C, 5 min); 40 ciklusa denaturacije (94°C, 45 s), hibridizacije prajmera (60°C, 45 s) i ekstenzije (72°C, 45 s); finalna ekstenzija (72°C, 5 min) i snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C.

Nakon završene PCR-reakcije, PCR produkti su elektroforetski razdvojeni, horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznim gelovima, pri konstantnom naponu od 80V. Za potvrdu veličine dobijenih fragmenata, odnosno traka na gelu, korišćena je 100 bp DNK lestvica (*O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific™*). Gelovi su obojeni rastvorom etidijum-bromida

(0,5 µg/mL EtBr, 20 min), nakon čega su osvetljeni na UV transiluminatoru (*Biometra BioDocAnalyze BDA Live, Analytik Jena GmbH+Co, Nemačka*).

### **3.6.2. Odabir gena za validaciju rezultata sekvenciranja**

Rezultati sekvenciranja ukupnog transkriptoma su potvrđeni kvantitativnim PCR umnožavanjem odabranih DE gena i nekodirajućih RNK. DE geni, odnosno ncRNK, za validaciju su birani na osnovu veličine i statističke značajnosti njihovog FC: minimum  $FC = |2|$ , q-vrednost < 0,01. Takođe, u slučaju ncRNK, parametar koji je uzet u obzir jeste i njihov kvantitet, odnosno tačan broj sekvenci određene ncRNK prisutan u uzorku: prosečno, RC > 250. Ovaj parametar je postavljen kako bi se osiguralo umnožavanje fragmenata, čak i PCR metodom – NGS je osetljivija metoda, sposobna da detektuje razlike u ekspresiji i pri veoma malom broju sekvenci neke RNK, što qRT-PCR ne može.

Validacija rezultata sekvenciranja je izvedena qRT-PCR umnožavanjem šest DE gena, pet DE lncRNK i pet DE miRNK. Prajmeri za ove DE gene i ncRNK su dizajnirani pomoću veb-alata *Primer 3* (verzija 0.4.0; <https://primer3.ut.ee/>), unošenjem sekvenci u veb-alat i korišćenjem standardnih parametara: režim rada – opšti (eng. *task for primer selection: generic*), prag stope neuspeha prajmera < 0,1; vrsta *Zea mays*; veličina: 18-23 nt; temperatura topljenja ( $T_T$ ) 57-62°C; %GC 50%; dužina amplifikovanog fragmenta < 800 nt. Izabrani prajmeri su provereni pomoću *NCBI Primer-BLAST* alata (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

#### **3.6.2.1. Određivanje temperature hibridizacije pojedinačnih parova prajmera**

Pre početka qRT-PCR analize, određena je temperatura hibridizacije,  $T_H$  (eng. *annealing temperature*) za svaki od korišćenih prajmera za izabrane gene i ncRNK i to kvalitativnim PCR umnožavanjem. Svaka reakciona smeša, ukupne zapremine 12,5 µL, je sadržala 1X PCR pufer (*10x DreamTaq Green Buffer, Thermo Fisher Scientific™*), 0,2 mM dNTP (*dNTP Mix (10 mM each), Thermo Scientific™*), 0,5 U/µL TAQ polimerazu (*DreamTaq DNA Polymerase 5 units/µL, Thermo Fisher Scientific™*), 0,4 µM F-prajmer (eng. *forward primer*) i 0,4 µM R-prajmer (eng. *reverse primer*), 8,9 µL ddH<sub>2</sub>O bez nukleaza i 1 µL 2X razblažene cDNK. Umnožavanje ovih gena i ncRNK se vršilo na gradijent PCR-aparatu, koji je omogućavao ispitivanje nekoliko temperatura hibridizacije u isto vreme. Za svaki par prajmera su ispitivane temperature do 3°C niže od temperature topljenja prajmera ( $T_T$ ). Ispitivanje  $T_H$  se vršilo prema sledećem programu na PCR aparatu: inicijalna denaturacija (95°C, 5 min); 40 ciklusa denaturacije (94°C, 45 s), potencijalne hibridizacije prajmera ( $T_M-1^\circ\text{C}/T_M-2^\circ\text{C}/T_M-3^\circ\text{C}$ , 45 s) i ekstenzije (72°C, 45 s); finalna ekstenzija (72°C, 5 min) i snižavanje temperature reakcione smeše do 4°C.

Potom su PCR-produkti elektroforetski razdvojeni, na 2% agaroznim gelovima, pri konstantnom naponu od 80V tokom 45 min, uz korišćenje 100 bp DNK lestvice (*O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific™*). Nakon bojenja etidijum-bromidom (0,5 µg/mL EtBR, 20 min), gelovi su prosvetljeni na UV transiluminatoru (*Biometra BioDocAnalyze BDA Live, Analytik Jena GmbH+Co, Nemačka*). Za svaki par prajmera je proverena dužina amplifikovanog fragmenta, čistoća i jasnoća njihove trake na gelu, i potvrđeno je odsustvo fragmenata neodgovarajuće veličine, kao i prajmer-dimera. Na osnovu navedenih parametara su izabrane  $T_H$ . Svi korišćeni prajmeri i njihove sekvence su navedeni u Tabeli 3.4.

**Tabela 3.4** Prajmeri korišćeni za validaciju rezultata sekvenciranja. Za svaki tip RNK koja se validira (iRNK, odnosno geni; lncRNK i miRNK) su navedeni nazivi prajmera (F i R) i njihove sekvence, kao i naziv gena, odnosno ncRNK, koji umnožavaju.

Kategorija	Naziv gena ili ncRNK	Naziv prajmera	Sekvenca
DE geni	<i>Adagio-like protein 3 (ADO3)</i>	ADO3-F	CCAAACCAGCCAAACCACTG
		ADO3-R	GTCCACTTCCATCCCCTCC
	Tiamin tiazol sintaza, hloroplastna ( <i>TH1</i> )	TH1-F	TCGATCGAATTCCTTGGGT
		TH1-R	GTAGTAGGACTCGCACGTGA
	Aspartil proteaza 1, ( <i>AED1</i> )	AED1-F	AGCGTACGTTTCGAGATGCTA
		AED1-R	TTCCAAAGCCGTGTTGTTGA
	Naterin 4 ( <i>nat4</i> )	nat4-F	TCAACTCCACCTACAGCTGG
		nat4-R	ACCTTCTCTCTCCGGTAGT
	15-cis-fitoen desaturaza, hloroplastna ( <i>pds</i> )	pds-F	AGACGTTTCTCCAGAGCCTG
pds-R		AACGACACACCTAGGCAAGA	
Aktivaza Ribulozo bifosfat karboksilaze/oksigenaze, chloroplastic ( <i>rca</i> )	RCA-F	TTGGAGTACGGACACATGCT	
	RCA-R	CACCTCCTCGATCCTATGCC	
DE lncRNK	XLOC_012565	lnc_01-F	GACGGCACCAGTTTTCTTTT
		lnc_01-R	TCAACCTCCCGATCGTGAAA
	XLOC_000175	lnc_02-F	AGTCTCCAAGAAGCTCGGCAA
		lnc_02-R	ATGGGATCGAAGGCTAGCTC
	XLOC_001043	lnc_03-F	CGGGCTACATCTTCAAAGGC
		lnc_03-R	TTTCATGCGTGGTGGAGTTC
	XLOC_006714	lnc_04-F	AGCAAACCCGGAGAAGATCA
lnc_04-R		GACTTCCGCAACAGCTTGAA	
XLOC_016783	lnc_05-F	TGCTACACAGAAACGCCATC	
	lnc_05-R	CCCAACTGTAGCTTGCCAA	
DE miRNK	novel_904	novel_904-F	GACTCCGTGGCCCAA
		novel_904-R	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTCCAT
	zma-miR11970-3p	zma-miR11970-3p-F	TGGTTTGGTTGCACGTT
		zma-miR11970-3p-R	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGCA
	zma-miR159c-5p	zma-miR159c-5p-F	CAGGAGCTCCCTTCGAT
		zma-miR159c-5p-R	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGGATT G
	zma-miR166a-5p	zma-miR166a-5p-F	AGGGAATGTTGTCTGGCT
		zma-miR166a-5p-R	CAGTTTTTTTTTTTTTTCCCGA
zma-miR396c	zma-miR396c-F	AGTTCCACAGGCTTTCTTG	
	zma-miR396c-R	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAGTTC	

### 3.6.3. Određivanje efikasnosti izabranih prajmera za DE gene i ncRNK

Kvanfitikacija umnožavanih fragmenata tokom qRT-PCR je izvršena u ranim ciklusima eksponencijalne faze amplifikacije – u tom trenutku su svi reagensi prisutni u dovoljnim količinama, DNK polimeraza je i dalje visoko efikasna i nivo aplifikovanih fragmenata je dovoljno nizak, tako da ne dolazi do kompeticije sa prajmerima. Svi navedeni parametri značajno utiču na efikasnost reakcije, pa je pre same analize ekspresije odabranih gena i ncRNK bilo potrebno proveriti efikasnost reakcije njihove amplifikacije. U tu svrhu je korišćen nagib *log*-linearne krive reakcije amplifikacije, *m*. Koeficijent efikasnosti (*E*) je izračunat prema sledećoj formuli:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Vrednosti  $m$  u opsegu 3,58 i 3,10, daju koeficijent efikasnosti u opsegu 1,9-2,1, što je proporcionalno jednako efikasnosti reakcije amplifikacije 90-110%. Za formiranje *log*-linearne krive reakcije amplifikacije napravljen je set razblaženja uzoraka poznatih količina RNK uvedenih u reakciju sinteze komplementarne cDNK i određene su njihove logaritamske vrednosti. Konkretno, reakcija sinteze komplementarne cDNK je obavljena na 1 µg prečišćene RNK i od te vrednosti je napravljen set od pet razblaženja: 0,2 µg, 0,1 µg, 0,05 µg, 0,025 µg i 0,0125 µg. Log-vrednosti ovih količina RNK su: -0,699, -1, -1,301, -1,602 i -1,903. Razblaženja koja su sadržala navedene početne količine RNK tokom sinteze cDNK su dobijena razblaživanjem uzoraka cDNK 5X, 10X, 20X, 40X i 80X.

Provera efikasnosti prajmera i reakcije amplifikacije za odabrane gene ili ncRNK je urađena, qRT-PCR reakcijom za svako razblaženje. Kao endogena kontrola (EK) za normalizaciju rezultata qRT-PCR analize ekspresije korišćen je gen za ciklofilin, *cyp* (Lin i sar., 2014), i svaka pojedinačna reakcija umnožavanja je izvršena u tri ponavljanja na istoj ploči za qRT-PCR analizu. Reakcije umnožavanja su izvršene na *StepOnePlus™ Real-Time PCR* sistemu (*Applied Biosystems™, SAD*), korišćenjem *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)* (*Solis BioDyne™*). Reakciona smeša (10 µL) za svaki uzorak je sadržala 1x *EvaGreen* qPCR miks (*5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix*), 0,2 µM F- i R-prajmere, 2 µL uzorka 2X cDNK i 5,6 µL ddH<sub>2</sub>O, bez nukleaza. Program qRT-PCR umnožavanja ciljanih fragmenata je uključivao sledeće korake: inicijalna denaturacija (95° C, 10 min); 40 ciklusa denaturacije (94° C, 15 s), hibridizacije prajmera (odgovarajući T<sub>H</sub>, 60 s) i ekstenzije (72° C, 45 s); snižavanje temperature reakcione smeše do 4° C.

Nakon završene qRT-PCR amplifikacije dobijene su pojedinačne i srednje vrednosti C<sub>T</sub> za svako razblaženje za pojedinačni par prajmera i endogenu kontrolu. C<sub>T</sub> vrednost predstavlja broj ciklusa u kom je fluorescentni signal prešao određen prag amplifikacije, automatski zadat od aparata. Vrednosti C<sub>T</sub> za svako razblaženje se kombinuju sa *log*-vrednostima početne količine RNK i regresionom analizom je formirana standardna kriva, čiji se nagib,  $m$ , korišćen za računanje efikasnosti po navedenoj formuli.

### **3.6.4. Validacija rezultata sekvenciranja qRT-PCR metodom**

Nakon odabira gena i ncRNK za validaciju, dizajniranja odgovarajućih prajmera, kao i potvrde njihove T<sub>H</sub>, i efikasnosti, rezultati sekvenciranja metodama NGS su provereni qRT-PCR analizom. Kao endogena kontrola za normalizaciju rezultata korišćen je gen *cyp*. Analiza je ponovljena u tri replikata za svaki uzorak. Reakcije umnožavanja su izvršene na *StepOnePlus™ Real-Time PCR* sistemu (*Applied Biosystems™, SAD*), korišćenjem *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)* (*Solis BioDyne™*), na način opisan u prethodnom poglavlju (3.6.3 *Određivanje efikasnosti izabranih prajmera za DE gene i ncRNK*). Nakon završene amplifikacije, za svaki uzorak su dobijene C<sub>T</sub> vrednosti za gen od interesa (C<sub>T</sub><sup>GOI</sup>) i C<sub>T</sub> vrednosti endogene kontrole (C<sub>T</sub><sup>EK</sup>).

Ove vrednosti su korišćene za komparativnu kvantifikaciju, odnosno računanje relativne ekspresije gena i to ΔΔC<sub>T</sub> metodom. Relativna ekspresija (RE) gena ili ncRNK za svaku vremensku tačku oba genotipa je izračunata prema Livak i Schmittgen (2001), korišćenjem formule korigovane za efikasnost prema Pfaffl (2003):

$$\begin{aligned}\Delta C_T^{GOI} &= C_T^{GOI}(\text{Kontrola}) - C_T^{GOI}(\text{Tretman}) \\ \Delta C_T^{EK} &= C_T^{EK}(\text{Kontrola}) - C_T^{EK}(\text{Tretman})\end{aligned}$$

$$E_{GOI}^{\Delta C_T} = (E_{GOI})^{\Delta C_T^{GOI}}$$

$$E_{EK}^{\Delta C_T} = (E_{EK})^{\Delta C_T^{EK}}$$

$$RE = \frac{E_{GOI}^{\Delta C_T}}{E_{EK}^{\Delta C_T}}$$

Dobijene vrednosti RE ovom metodom su upoređene sa vrednostima dobijenih tokom DE analize uzoraka sekvenciranih NGS metodom, radi potvrde rezultata sekvenciranja. Normalna raspodela dobijenih rezultata je proverena Šapiro-Vilkovim testom, a statistička značajnost je određena primenom Studentovog T-testa, sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ .

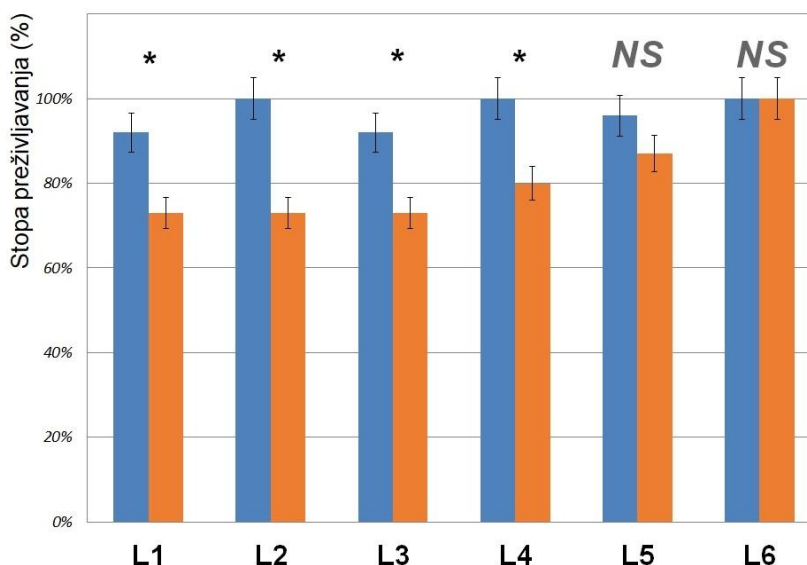
## 4. Rezultati

### 4.1. Određivanje tolerantnosti na niske temperature i odabir genotipova kukuruza za analizu transkriptoma

#### 4.1.1. Morfološki parametri

Morfološki parametri analizirani pri ispitivanju tolerantnosti na niske temperature su uključivali parametre merene odmah nakon završenog tretmana (SP, SM,  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$ ), odnosno nakon oporavka u trajanju od sedam dana (MK, MI, DK, DI, SMK i SMI).

Stopa preživljavanja za šest linija je prikazana na Slici 4.1. Kod linije L6, nije uočena razlika između kontrole i tretmana: u oba slučaja, stopa preživljavanja je bila 100%. Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i tretmana ni kod linije L5 – stopa preživljavanja je bila 96% u kontrolnim uslovima i 87% u uslovima niske temperature. Ostali genotipovi su imali značajno niže vrednosti ovog parametra u uslovima tretmana. Kod linije L4, stopa preživljavanja nakon tretmana bila je 20% manja u odnosu na kontrolu. Slično je i kod L2, gde je stopa preživljavanja u uslovima tretmana bila 73%, dok su u kontrolnim uslovima sve biljke preživele. Genotipovi L1 i L3 su se pored značajne razlike između kontrole i tretmana (SP nakon tretmana: 73%), odlikovali i najnižom stopom preživljavanja u kontrolnim uslovima: u oba genotipa ona je iznosila 92%.

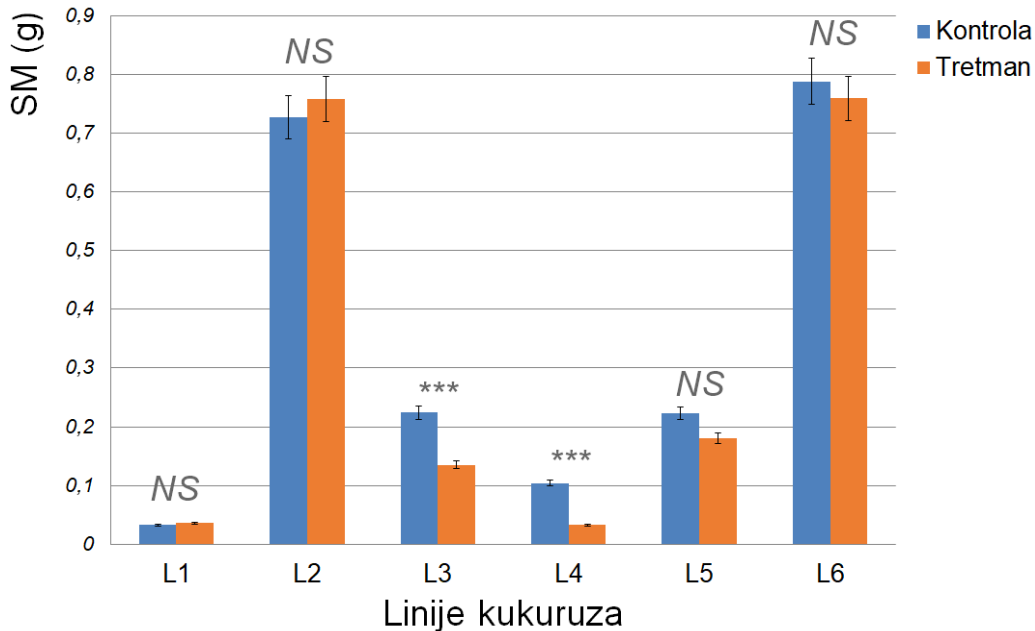


Slika 4.1 Stopa preživljavanja (SP) šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h. Stopa preživljavanja je izražena u procentima (%). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana određen je T-testom i prikazan kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ). Standardna devijacija

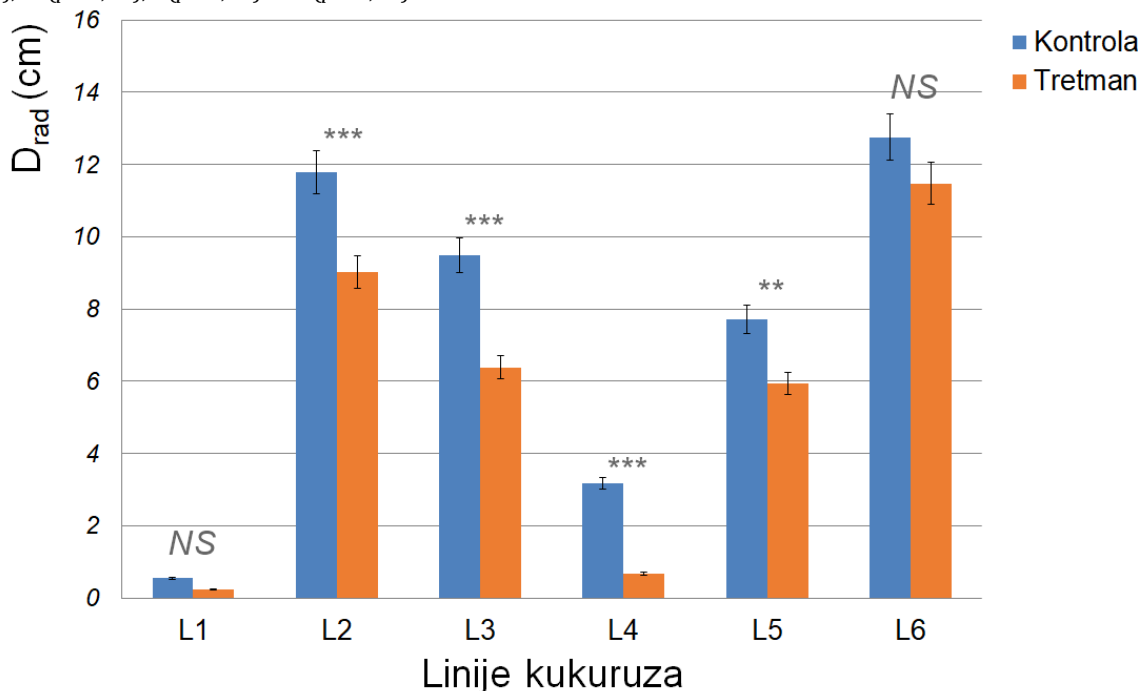
Kada je reč o svežoj masi klijanaca starih pet dana, najbolje su se pokazale linije L2 i L6, zbog najvećih izmerenih vrednosti i odsustva statističke značajnosti između kontrole i tretmana. Kod linija L5 i L1, takođe nije bilo statistički značajne razlike između kontrole i tretmana, ali su klijanci imali niže vrednosti SM od linija L2 i L6. Sa druge strane, L3 i L4 su se pokazali kao najosetljiviji genotipovi na osnovu ovog parametra. Sveža masa svih šest linija je prikazana na Slici 4.2.

L6 se izdvojio kao najtolerantniji genotip, kada se u obzir uzmu  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$  – odlikovao se najvećim dužinama radikule i koleoptila, kao i odsustvom statistički značajne razlike između kontrole i tretmana. Kod L1, razlika između kontrole i tretmana takođe nije bila statistički značajna, ali su se klijanci ovog genotipa odlikovali znatno kraćim radikulama i koleoptilima. Kod

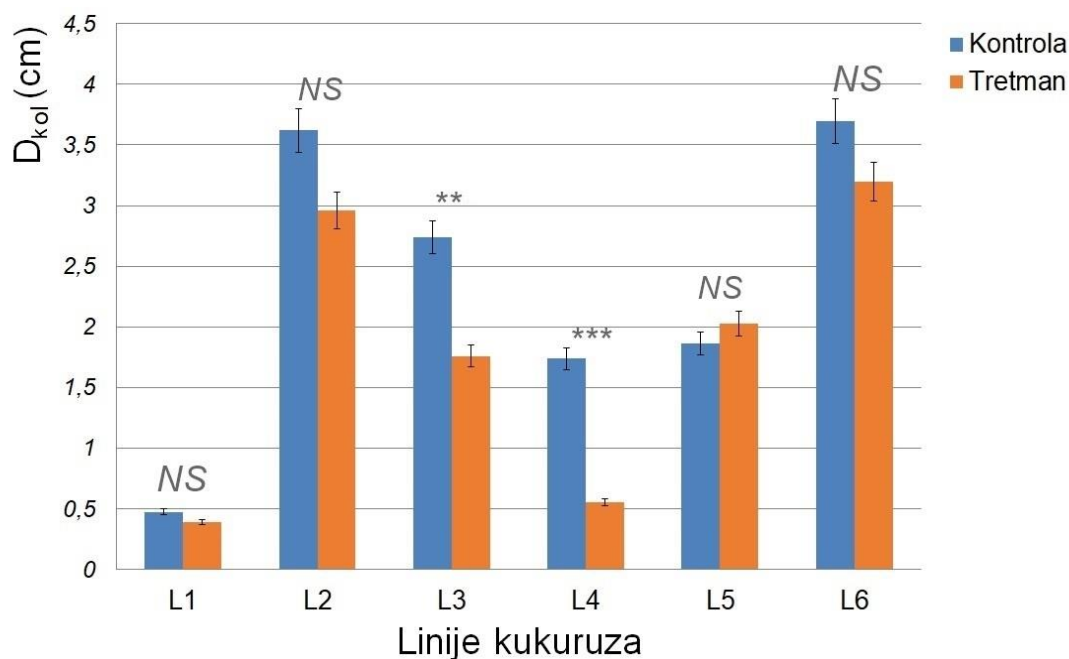
L2 i L5, vrednosti  $D_{kol}$  su bile slične i u kontroli i u tretmanu, ali je tretman doveo do statistički značajno usporenog rastanja radikule. Kao i kod sveže mase, pri analizi  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$  su se L3 i L4 pokazali kao najosetljiviji genotipovi. Vrednosti  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$  su prikazane na Slici 4.3, odnosno 4.4.



**Slika 4.2 Sveža masa klijanaca (SM) šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h.** Sveža masa (SM) je izražena u gramima (g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

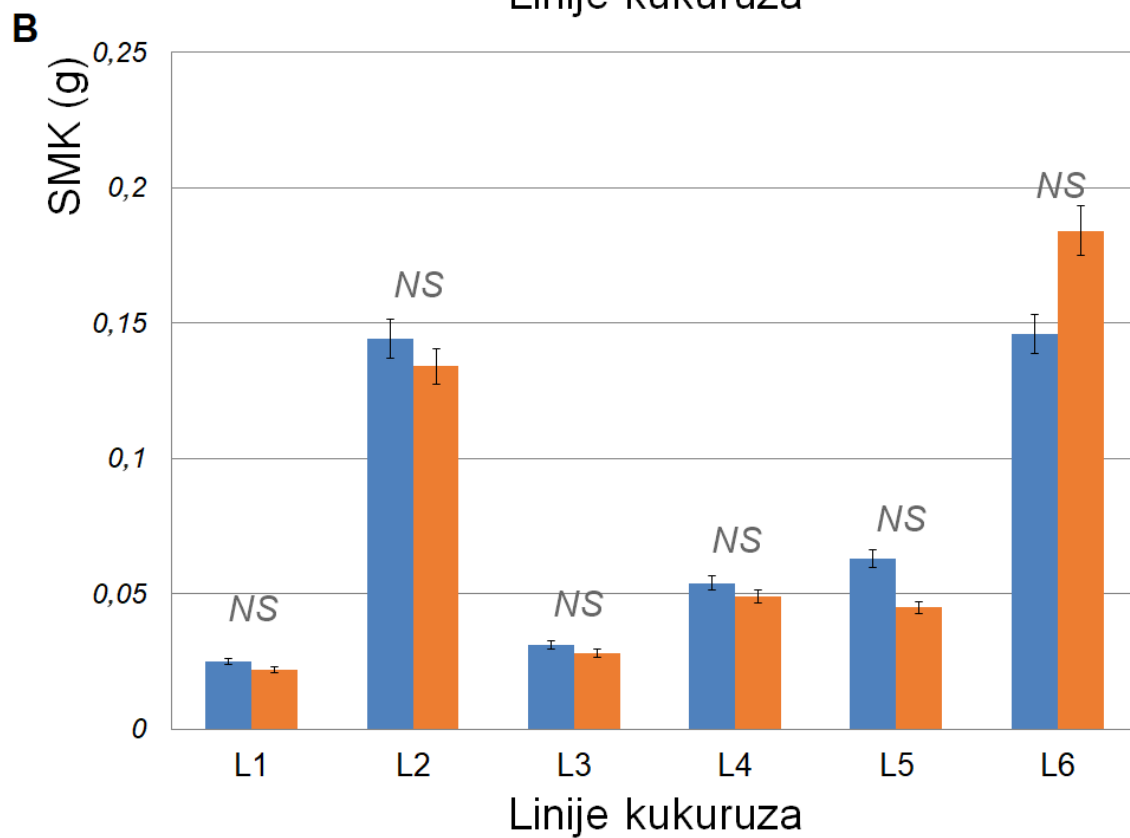
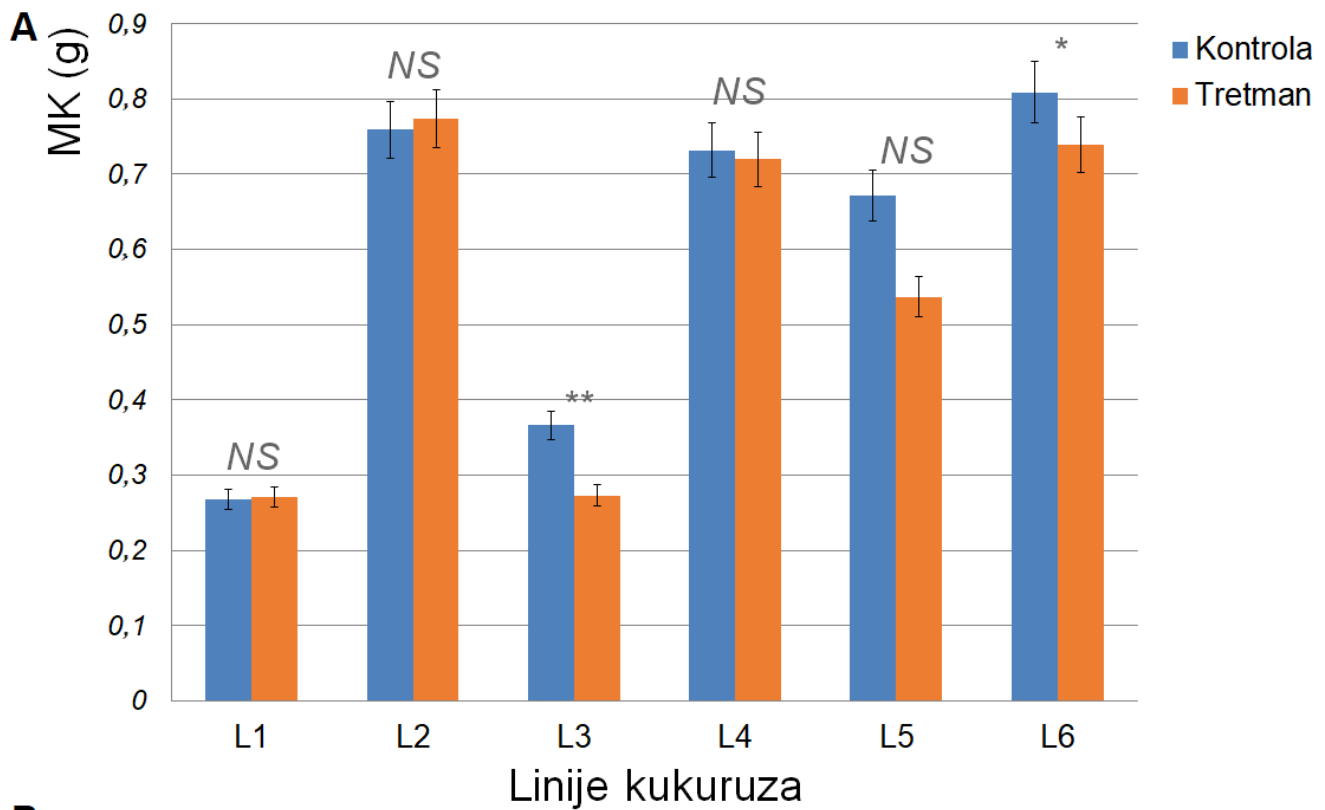


**Slika 4.3 Dužina radikule klijanaca ( $D_{rad}$ ) šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h.** Dužina radikule ( $D_{rad}$ ) je izražena u centimetrima (cm). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

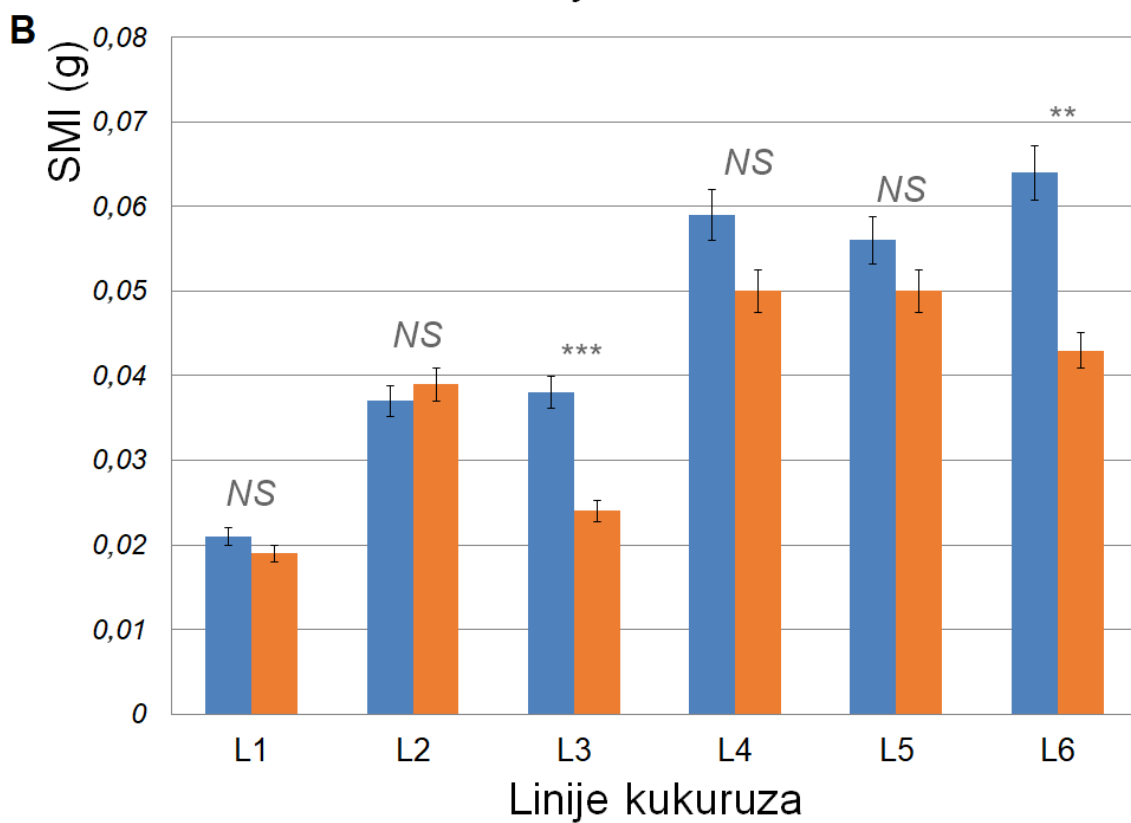
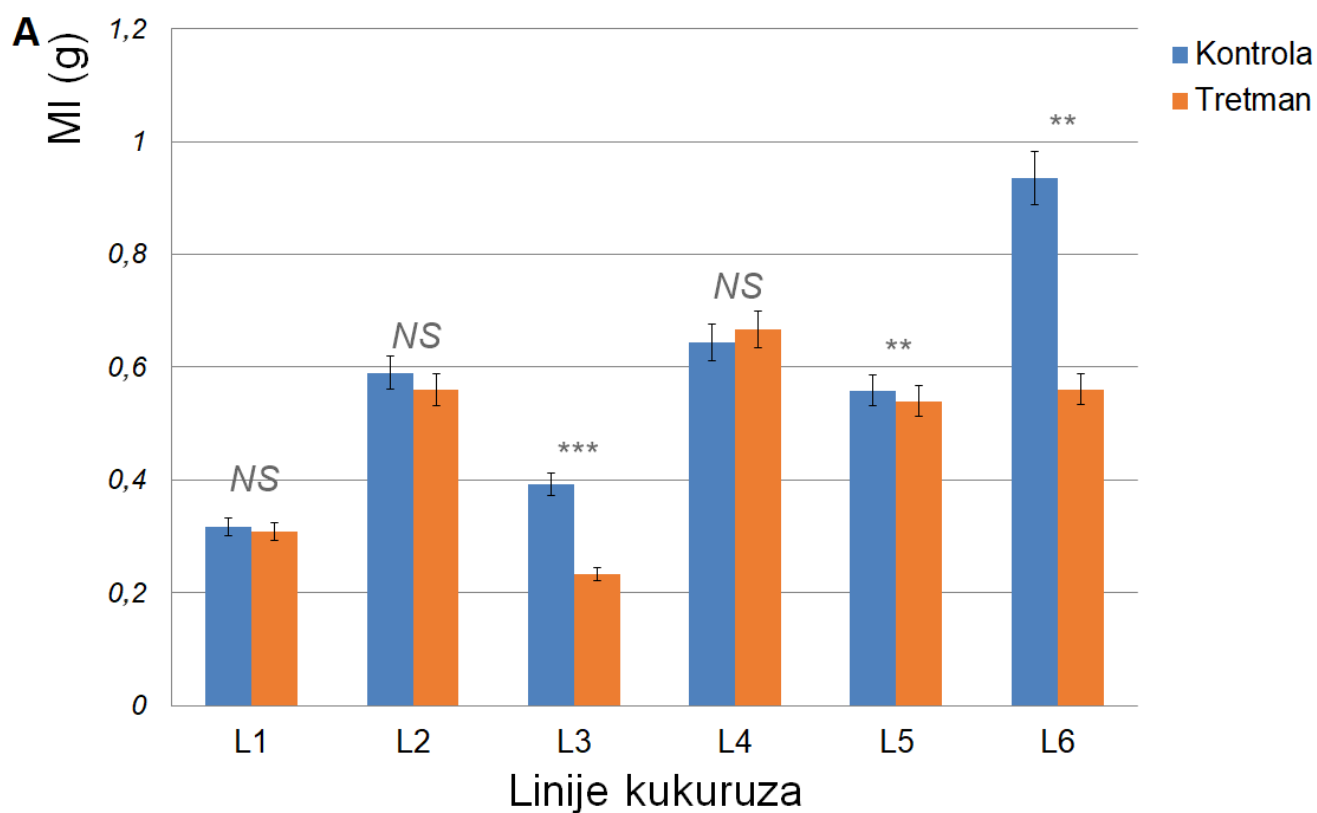


**Slika 4.4 Dužina koleoptila klijanaca ( $D_{kol}$ ) šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h.** Dužina koleoptila ( $D_{kol}$ ) je izražena u centimetrima (cm). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

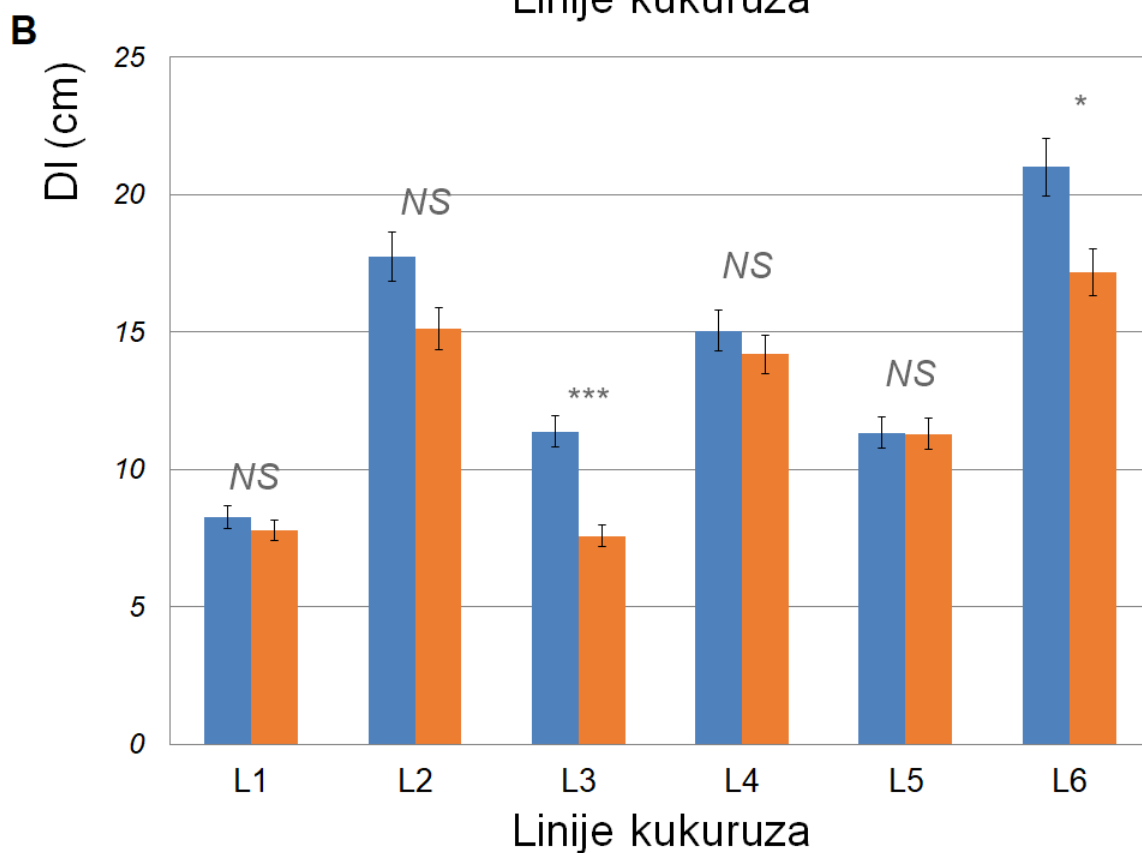
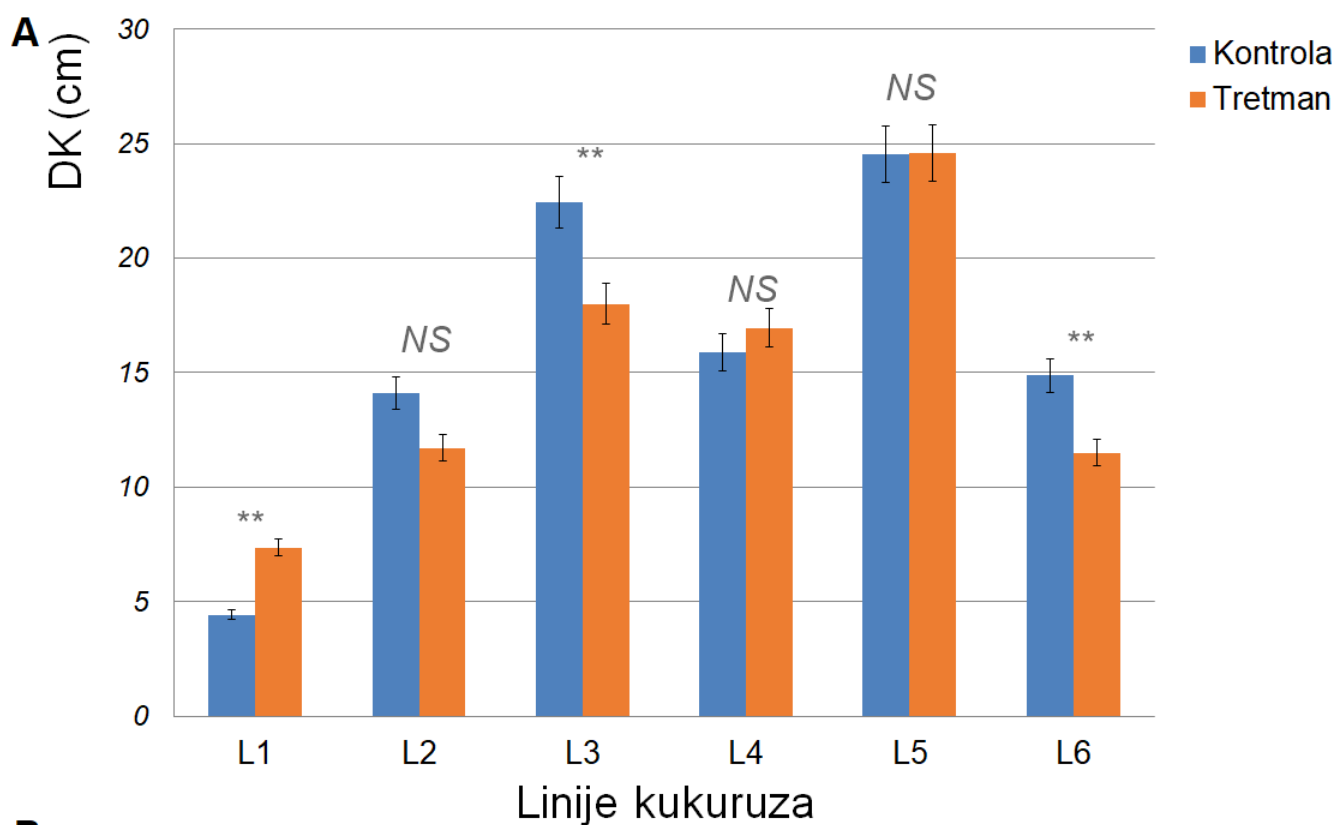
Nakon oporavka od sedam dana u optimalnim uslovima izmereni su MK, SMK, MI i SMI, kao i DK i DI. Sveža i suva masa korena su prikazane na Slici 4.5, a sveža i suva masa izdanka na Slici 4.6. Kada je reč o svežoj i suvoj masi korena, većina genotipova se odlikovala uspešnim oporavkom nakon tretmana niskim temperaturama. Nije uočena statistički značajna razlika između vrednosti SMK u kontrolnim i uslovima tretmana ni kod jednog genotipa, dok je za MK ona bila odsutna kod četiri genotipa (L1, L2, L4 i L5). Kod linije L6 su korenovi bili  $\approx 10\%$  manje razvijeni u tretiranim biljkama. Međutim, i pored toga, vrednosti MK tretiranih L6 biljaka su bile veće od vrednosti MK kontrolnih biljaka svih genotipova osim L2. Sa druge strane, linija L3 se odlikovala statistički značajnom razlikom između kontrole i tretmana za MK, kao i jednom od najnižih vrednosti mase korena među svim genotipovima (Slika 4.5). Ovaj genotip se pokazao i kao najosetljiviji pri analizi parametara mase izdanka: i MI i SMI su bili statistički značajno manji kod kontrolnih biljaka. Iako se genotip L6 pokazao kao jedan od najtolerantnijih genotipova na osnovu ostalih parametara, tretman niskim temperaturama je imao izrazito negativan efekat na MI i SMI – vrednosti i sveže i suve mase izdanaka su bile značajno niže u tretiranim biljkama. Kod ostalih linija nije bilo statistički značajnih razlika između kontrole i tretmana (Slika 4.6). Slični odgovori na niske temperature šest linija su uočeni i kada je reč parametrima dužine korena i izdanka. Kod linija L2, L4 i L5 nije bilo statistički značajnih razlika između DK i DI. Genotip L1 se odlikovao sličnim dužinama izdanka i u kontrolnim i u uslovima tretmana, ali je dužina korena bila statistički značajno manja u tretmanu. Genotip L3 se i ovde pokazao kao najosetljiviji: statistički značajne razlike između kontrole i tretmana su zabeležene i kod DK i DI. Isto je utvrđeno i kod linije L6, ali su vrednosti DI i u kontroli i tretmanu bile veće nego kod drugih genotipova. Vrednosti DK i DI za sve linije su prikazane na Slici 4.7.



**Slika 4.5** Masa korena biljaka šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h i nakon 7d oporavka od tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h. **A.** Sveža masa korena (MK). **B.** Suva masa korena (SMK). MK i SMK su izražene u gramima (g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).



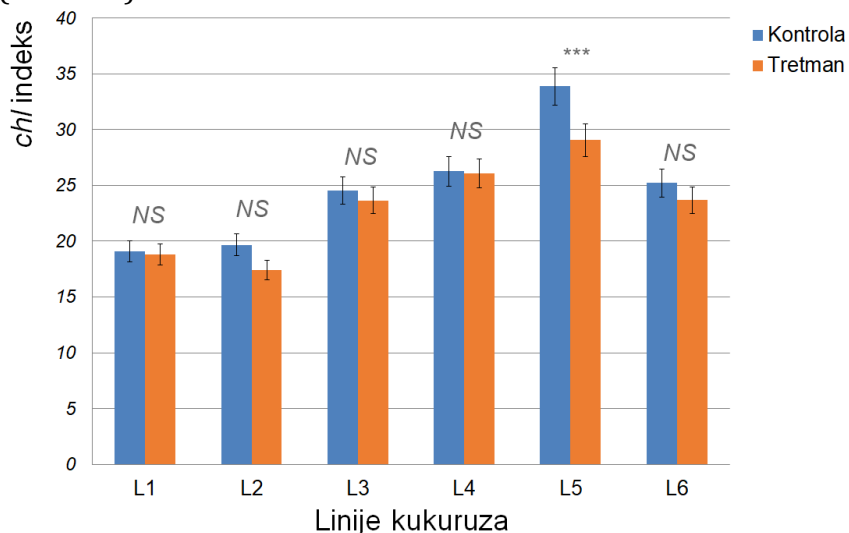
Slika 4.6 Masa izdanka biljaka šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h i nakon 7d oporavka od tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h. A. Sveža masa izdanka (MI). B. Suva masa izdanka (SMI). MI i SMI su izražene u gramima (g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).



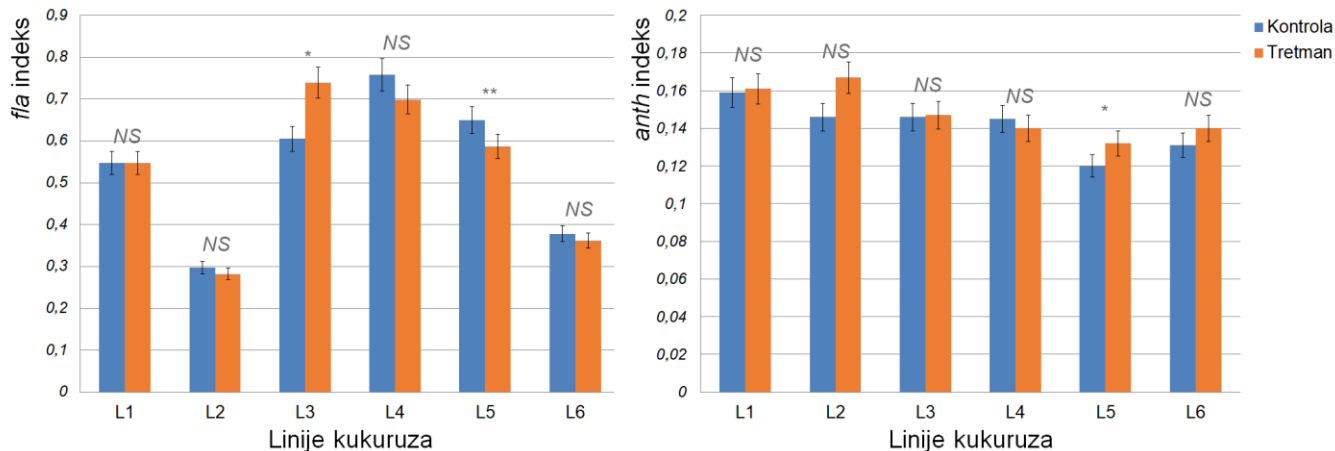
Slika 4.7 Dužine korena, DK, i izdanka, DI, biljaka šest genotipova kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h i nakon 7d oporavka od tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h. A. Dužine korena (DK). B. Dužine izdanka (DI). DK i DI su izražene u centimetrima (cm). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

### 4.1.2. Fiziološki parametri

Fiziološki parametri koji su ispitivani kao odgovor na stres niskim temperaturama su obuhvatili indeks sadržaja hlorofila (*chl*), antocijanina (*anth*) i flavonola (*flav*). Sadržaj hlorofila je prikazan na Slici 4.8. Jedini genotip kod kojeg je došlo do statistički značajne razlike, odnosno opadanja sadržaja hlorofila u tretiranim biljaka bio je L5. Linija L5 je takođe bila jedina u kojoj je utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i tretmana u sadržaju antocijana (Slika 4.9). Kada je reč o flavonolima, do statistički značajnog opadanja njihovog sadržaja je došlo samo kod linije L5, dok se genotip L3 odlikovao statistički značajnim povećanjem nivoa flavonola kod tretiranih biljaka (Slika 4.9).



Slika 4.8 Sadržaj hlorofila (*chl*) kod biljaka šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h i nakon 7d oporavka od tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h. Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).



Slika 4.9 Sadržaj flavonola (*fla*) i antocijanina (*anth*) kod biljaka šest linija kukuruza (L1-L6) nakon tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h i nakon 7d oporavka od tretmana niskim temperaturama u trajanju od 24h. Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

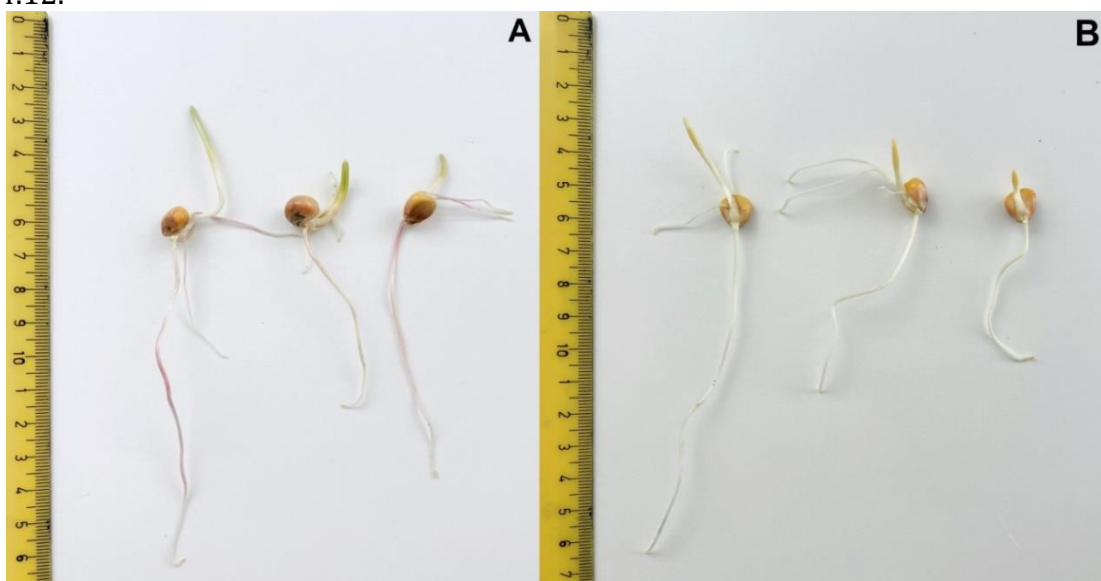
### 4.1.3. Izbor genotipova kukuruza za analizu transkriptoma

Stopa preživljavanja i parametri tolerantnosti ispitani neposredno nakon završenog tretmana niskim temperaturama uzeti su kao ključni za procenu tolerantnosti linija kukuruza na niske temperature jer su ispitivani u životnoj fazi u kojoj bi biljke i bile izložene ovom faktoru

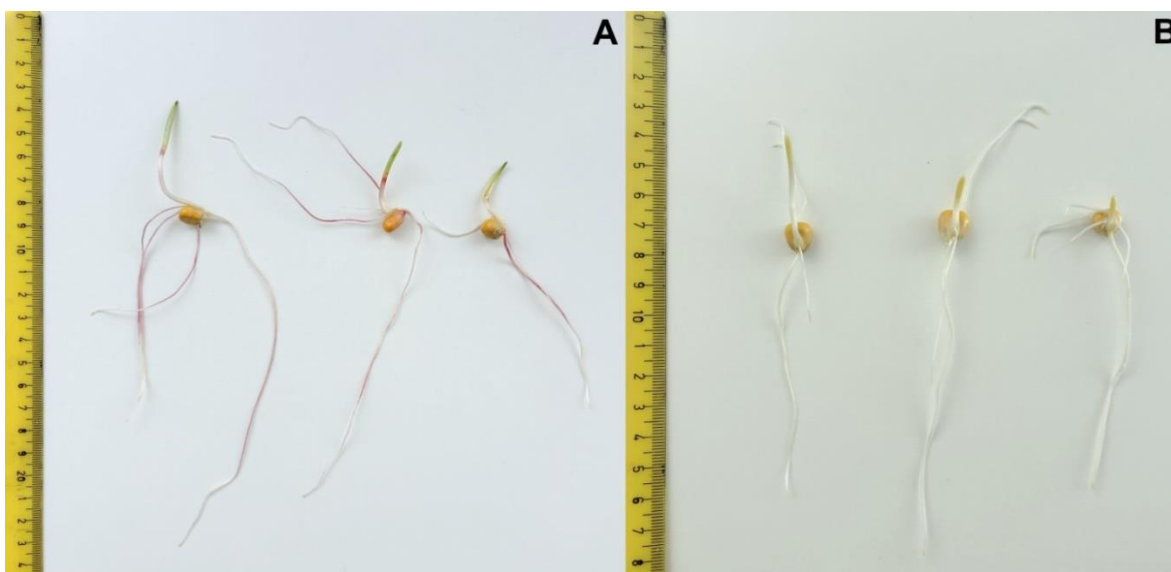
stresa tokom rane setve. Parametri izmereni nakon oporavka su smatrani dodatnom potvrdom zaključaka donetih na osnovu prva dva nivoa procene.

Kada je reč o stopi preživljavanja tretmana niskim temperaturama (Slika 4.1), linija L6 se izdvojila kao najtolerantnija, odnosno klijanci ove linije su bili najmanje pogođeni stresom niskih temperatura. Sa druge strane, najnižom stopom preživljavanja su se odlikovale linije L1 i L3. Linije L1 i L6 su pokazale najviši stepen tolerantnosti u pogledu morfoloških parametara izmerenih neposredno nakon završenog tretmana ( $SM$ ,  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$ ) – negativni efekti stresa nisu bili statistički značajni kod ove dve linije. Ipak, linija L6 je pokazala veću snagu semena od L1 – vrednosti  $SM$ ,  $D_{rad}$ ,  $D_{kol}$  su bili nekoliko puta veći. Na primer, dužina radikule je bila 50 puta veća kod L6. S druge strane, linije L3 i L4 su pokazale najveću osetljivost, pošto su vrednosti svih analiziranih osobina na ovom nivou bile značajno smanjene u uslovima stresa. Na osnovu navedenih rezultata, kao najosetljivija linija izdvojila se L3, a kao najtolerantnija L6. Linija L3 nije pokazala značajna poboljšanja ni nakon oporavka – odlikovala se statistički značajnim razlikama između kontrole i tretmana u većini parametara izmerenih nakon perioda oporavka ( $MK$ ,  $MI$ ,  $DK$ ,  $DI$ ,  $SMK$  i  $SMI$ ). Takođe, za većinu parametara linija L3 je imala neke od najnižih vrednosti u odnosu na sve analizirane genotipove. Iz navedenih razloga, linija L3 je izabrana kao osetljiva linija ( $L_S$ ) za dalje analize. Sa druge strane, parametri mereni nakon oporavka kod linije L6 su pokazali nešto kompleksniju sliku. Kod nekoliko ispitivanih parametara nije bilo statistički značajne razlike između kontrole i tretmana ( $chl$ ,  $fla$ ,  $anth$ ) ili su neke vrednosti bile veće kod tretiranih biljaka ( $SMK$ ). Međutim, kod  $MK$ ,  $MI$ ,  $DK$ ,  $DI$  i  $SMI$  je došlo do statistički značajnih smanjenja kod tretiranih biljaka. Ipak, iako su izmerene vrednosti bile niže od kontrolnih biljaka, i dalje su vrednosti nekih parametara ( $MK$ ,  $DI$ ) bile više nego kod većine drugih genotipova. S obzirom na navedene rezultate, kao i činjenicu da se ova linija pokazala najboljom pri ispitivanju neposredno nakon stresa, linija L6 je ipak izabrana kao tolerantna linija ( $L_T$ ) za dalja istraživanja.

Fotografije kontrolnih i tretiranih biljaka linije L3 ( $L_S$ ) nakon 24h tretmana niskim temperaturama su prikazane na Slici 4.10, a linije L6 ( $L_T$ ) na Slici 4.11. Takođe, fotografija klijanaca tretiranih niskim temperaturama oba genotipa nakon oporavka od 7 dana prikazana je na Slici 4.12.



Slika 4.10 Klijanci stari 5 dana osetljive linije ( $L_S$ ) nakon tretmana niskim temperaturama (24h). A. Kontrolne biljke – 25/20°C. B. Tretirane biljke – 10/8°C.



Slika 4.11 Ključanci stari 5 dana tolerantne linije ( $L_T$ ) nakon tretmana niskim temperaturama (24h). A. Kontrolne biljke – 25/20°C. B. Tretirane biljke – uslovi stresa niskih temperatura – 10/8°C.



Slika 4.12 Ključanci osjetljive ( $L_S$ ) i tolerantne ( $L_T$ ) linije nakon 7 dana oporavka od tretmana niskim temperaturama. Oporavak nakon tretmana niskim temperaturama se odvijao u ključalištu u optimalnim uslovima (25/20°C). U saksijama sa leve strane se nalaze ključanci genotipa  $L_S$ , a u saksijama sa desne, ključanci genotipa  $L_T$ .

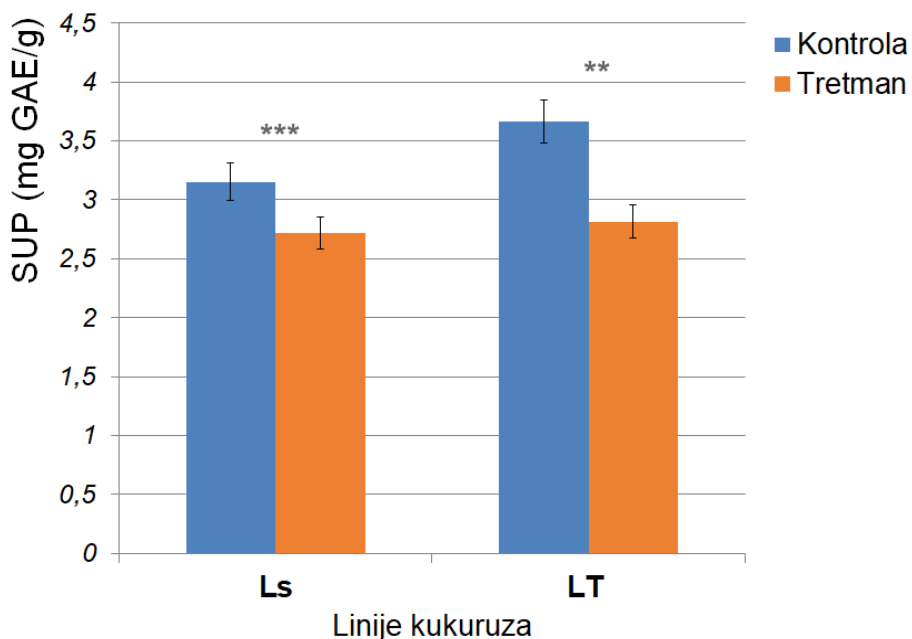
## **4.2. Biohemijska i fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature tolerantnog ( $L_T$ ) i osjetljivog ( $L_S$ ) genotipa kukuruza**

### **4.2.1. Biohemijska karakterizacija**

#### **4.2.1.1. Ukupan sadržaj fenola**

Kod linije  $L_S$ , ukupan sadržaj fenola u kontrolnim uslovima iznosio je 3,152 mg GAE/g, a u uslovima tretmana niskim temperaturama 2,722 mg GAE/g. Kod kontrolnih ključanaca linije  $L_T$  izmerene su vrednosti ukupnog sadržaja fenola 3,668 mg GAE/g, a kod tretiranih ključanaca 2,815 mg GAE/g. Razlike između kontrole i tretmana su bile statistički značajne kod oba genotipa, i

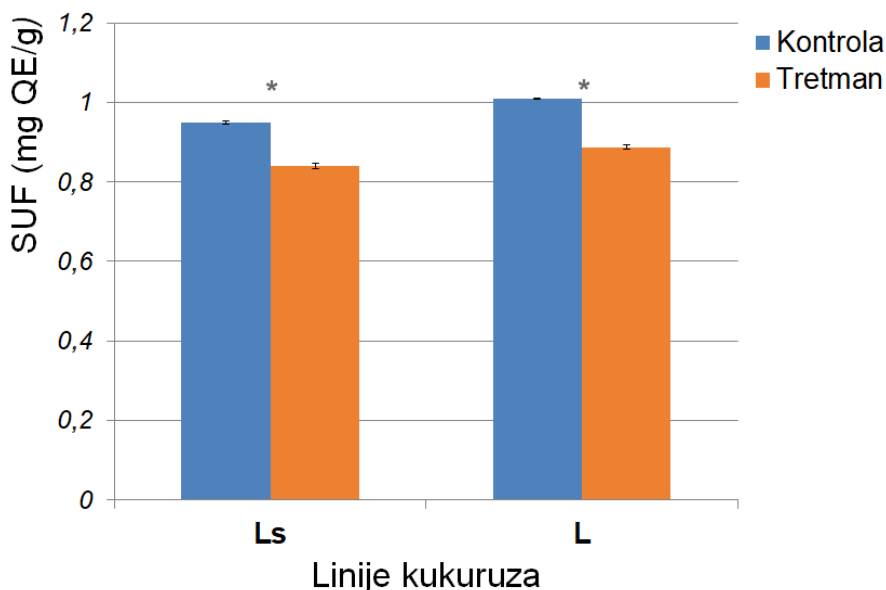
redukcija SUP kod tretiranih klijanaca je bila izraženija kod linije L<sub>T</sub>. Rezultati analize ukupnog sadržaja fenola su prikazani na Slici 4.13.



**Slika 4.13 Ukupan sadržaj fenola (SUP).** Ukupan sadržaj fenola (SUP) je izražen u miligramima ekvivalenata galne kiseline (GAE) po gramu uzorka (mg GAE/g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.1.2. Ukupan sadržaj flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida (SUF) kod kontrolnih biljaka linije L<sub>s</sub> je iznosio 0,948 mg QE/g, a kod tretiranih 0,839 mg QE/g. Sa druge strane kod kontrolnih biljaka linije L<sub>T</sub>, izmerene vrednosti ukupnog sadržaja flavonoida bile su 1,009 mg QE/g, a kod tretiranih 0,887 mg QE/g. Statistički značajne niže vrednosti SUF kod tretiranih biljaka su utvrđene kod oba genotipa, i stopa opadanja SUF između kontrole i tretmana je takođe slična (≈20%). Rezultati analize su prikazani na Slici 4.14.



**Slika 4.14 Ukupan sadržaj flavonoida (SUF).** Ukupan sadržaj flavonoida (SUF) je izražen u miligramima kvercetina (QE) po gramu uzorka (mg QE/g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku.

Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

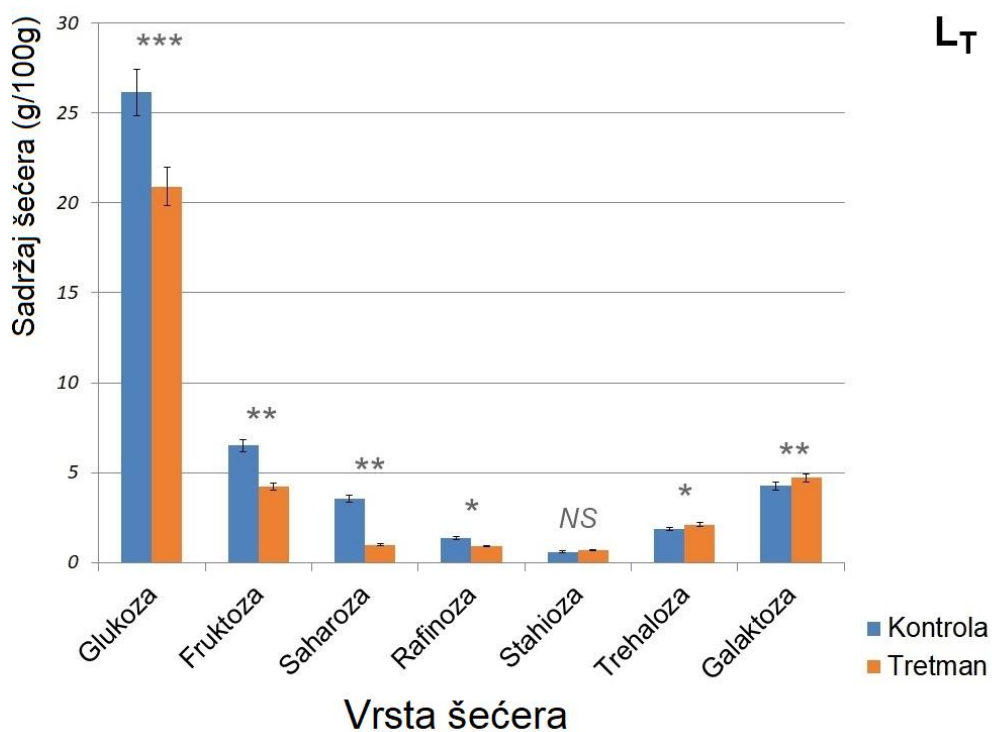
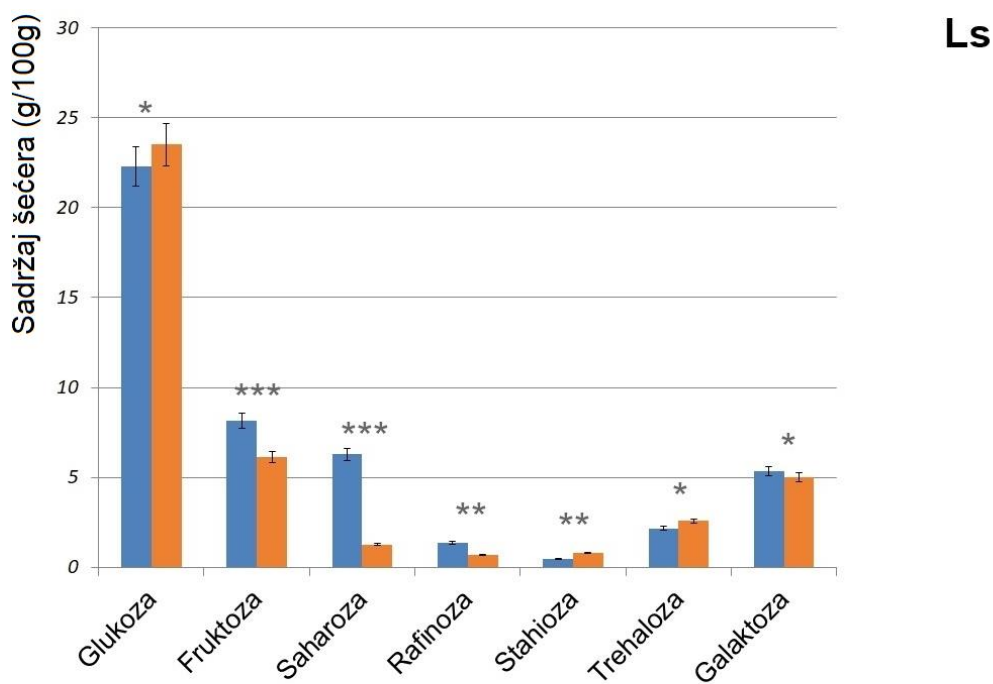
#### **4.2.1.3. Sadržaj pojedinačnih šećera i šećernih alkohola**

Linije  $L_s$  i  $L_T$  su se odlikovale različitim profilima šećera i šećernih alkohola – razlike su postojale i između uzoraka klijanaca gajenih u optimalnim uslovima i u načinu na koji su linije reagovale na stres niskih temperatura.

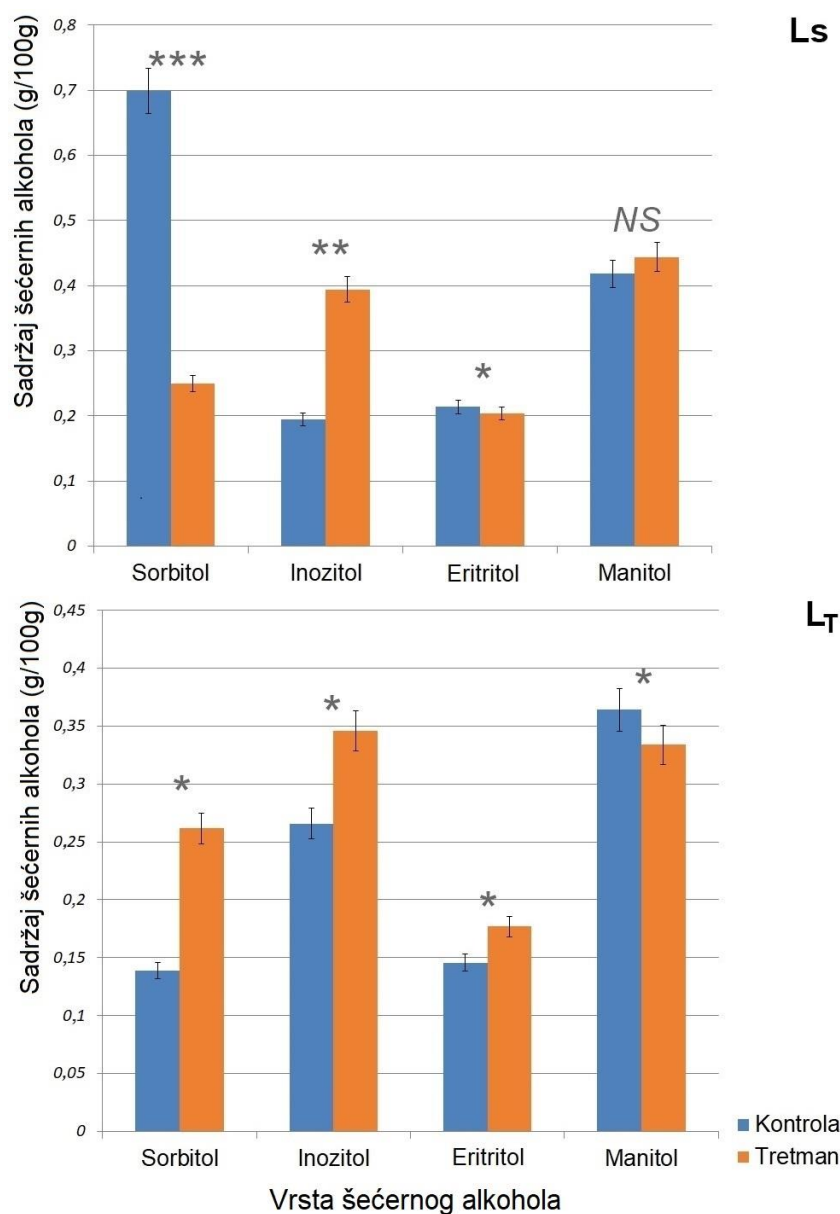
Šećeri fruktoza, saharoza i rafinoza su pokazali slične obrasce kod obe linije – njihov nivo je opao kod tretiranih biljaka nezavisno od genotipa, s tim da se linija  $L_s$  odlikovala većim sadržajem navedenih šećera u kontrolnim uslovima. Nivo fruktoze je opao za  $\approx 30\%$  kod tretiranih klijanaca linije  $L_T$ , a  $\approx 25\%$  kod  $L_s$ . Kod saharoze su promene bile izraženije – nivo navedenog šećera je bio tri puta niži kod tretiranih klijanaca genotipa  $L_T$ , odnosno pet puta niži kod  $L_s$ . Sa druge strane, nivo rafinoze je bio duplo manji kod tretiranih biljaka genotipa  $L_s$ , dok je kod  $L_T$  ova razlika iznosila  $\approx 30\%$ . Isti obrasci kod oba genotipa su utvrđeni kada je reč o stahiozi i trehalozi, ali je nivo navedenih šećera bio viši u tretiranim klijancima. Kod genotipa  $L_s$ , nivo stahioze je bio  $\approx 40\%$  viši kod tretiranih biljaka a nivo trehaloze  $\approx 20\%$ . Kod linije  $L_T$  su uočene manje izražene promene –  $\approx 10\%$  u nivou oba šećera. Ipak, razlika između kontrole i tretmana u nivou stahioze kod  $L_T$  nije bila statistički značajna.

Glukoza i galaktoza su od posebnog značaja jer su u njihovom sadržaju uočeni suprotni obrasci kod ova dva genotipa. Nivo glukoze kod linije  $L_s$  je porastao u tretiranim biljkama ( $\approx 5\%$ ), dok se suprotno desilo kod linije  $L_T$  – više glukoze je bilo prisutno u uzorcima kontrolnih biljaka ( $\approx 20\%$ ). Obrnuti obrasci su uočeni u sadržaju galaktoze – kod linije  $L_T$  njen nivo je viši kod tretiranih biljaka ( $\approx 5\%$ ), za razliku od  $L_s$  gde je viši u kontrolnim uzorcima ( $\approx 10\%$ ). Sve navedene razlike između kontrole i tretmana su bile statistički značajne, osim razlike u sadržaju stahioze kod linije  $L_T$ . Sadržaj navedenih šećera kod obe linije je prikazan na Slici 4.15.

Ispitivani šećerni alkoholi i njihov sadržaj su prikazani na Slici 4.16. Šećerni alkoholi su bili prisutni u manjim količinama od šećera, ali su razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka bile izraženije. Na primer, nivo inozitola je dva puta veći kod tretiranih biljaka linije  $L_s$ , dok je kod nivoa sorbitola utvrđeno jednako izraženo povećanje kod  $L_T$ . Kod tolerantnog genotipa je većina šećernih alkohola pokazala statistički značajno povećanje nivoa kod tretiranih biljaka (sorbitol, inozitol i eritritol), dok je kod tretiranih  $L_s$  klijanaca statistički značajna razlika detektovana u nivou inozitola i manitola. Interesantno je i da osim inozitola, genotipovi pokazuju suprotne obrasce u akumulaciji šećernih alkohola. Sorbitol i eritrol su statistički značajno povećani kod tretiranih klijanaca linije  $L_T$  –  $\approx 50\%$ , odnosno  $\approx 20\%$ , dok su kod  $L_s$  značajno smanjeni – eritritol za  $\approx 5\%$ , a sorbitol čak za  $\approx 70\%$ . Sa druge strane nivo manitola je statistički značajno snižen kod tretiranih biljaka  $L_T$  ( $\approx 10\%$ ), dok je kod  $L_s$  povećan ( $\approx 5\%$ ), ali ta razlika nije statistički značajna.



**Slika 4.15 Sadržaj pojedinačnih šećera.** Ispitivani šećeri bili su glukoza, fruktoza, saharoza, rafinoza, stahioza, trehaloza i galaktoza. Sadržaj pojedinačnih šećera je izražen u gramima na 100 grama uzorka (g/100 g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).



**Slika 4.16 Sadržaj pojedinačnih šećernih alkohola.** Ispitivani šećerni alkoholi bili su sorbitol, inozitol, eritritol i manitol. Sadržaj pojedinačnih šećernih alkohola je izražen u gramima na 100 grama uzorka (g/100 g). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

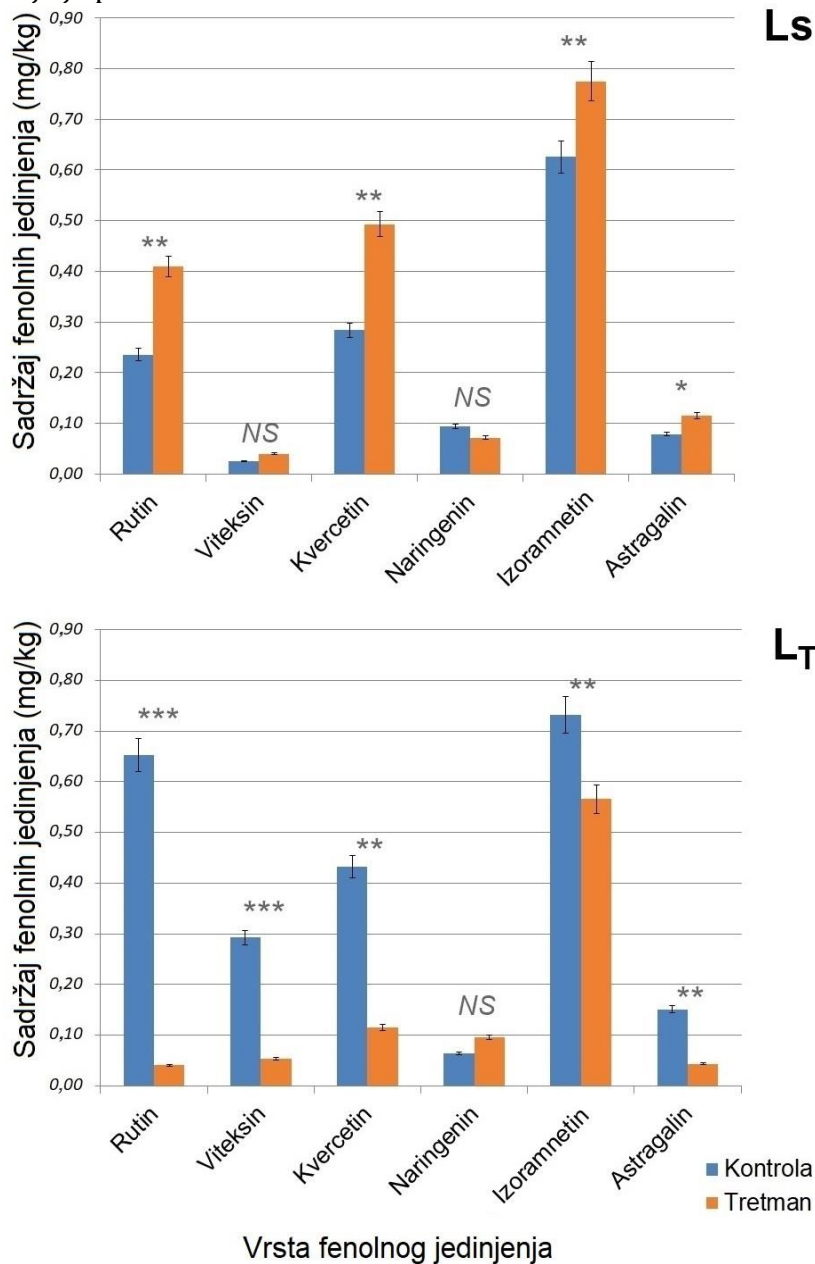
#### 4.2.1.4. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina

Fenolna jedinjenja koja su analizirana u uzorcima linija L<sub>s</sub> i L<sub>T</sub> bila su rutin, viteksin, kvercetin, naringenin, izoramnetin i astragalin (kampferol-3-O-glukozid). Takođe, analizirane su i sledeće fenolne kiseline: p-kumarinska, kofeinska i 5-O-kafeoilhinska (neohlorogena, 5-CQA) kiselina.

Naringenin je bio jedino fenolno jedinjenje bez statistički značajne razlike između kontrole i tretmana kod obe linije. Takođe, kod viteksina, razlika nije bila statistički značajna kod L<sub>s</sub>. Kod ostalih fenolnih jedinjenja su uočeni specifični profili akumulacije i izražene razlike između kontrole i tretmana. Sadržaji rutina, kvercetina, izoramnetina i astragalina su bili izrazito povećani kod tretiranih u odnosu na kontrolne klijance kod linije L<sub>s</sub> – ~70% povećanje u nivou rutina i kvercetina, ~20% u nivou izoramnetina i ~40% u nivou astragalina. Kod linije L<sub>T</sub> je uočen

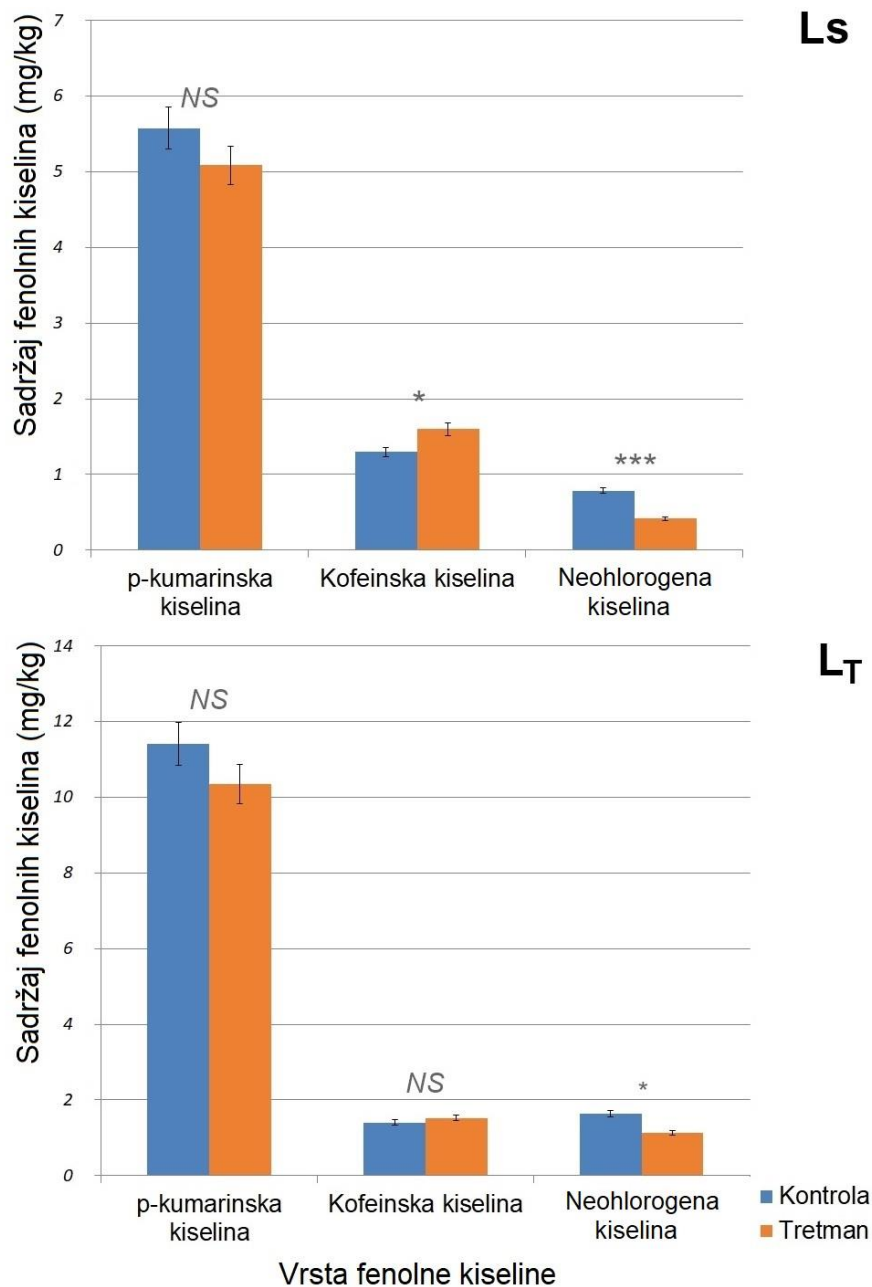
suprotan trend. U uzorcima tretiranih biljaka bila je prisutna skoro 15 puta manja količina rutina, pet puta manje viteksina, četiri puta manje kvercetina i tri puta manje količina astragalina. Takođe, akumulacija izoramnetina je bila snižena  $\approx 20\%$  kod tretiranih klijanaca ovog genotipa. Sadržaj navedenih fenolnih jedinjenja kod obe linije je prikazan na Slici 4.17.

Kada je reč o fenolnim kiselinama, nije bilo statistički značajne razlike između kontrole i tretmana u nivou p-kumarinske kiseline, kod obe ispitivane linije. Kod  $L_T$  promena u nivou kofeinske kiseline takođe nije bila statistički značajna, dok je kod  $L_S$  došlo da slabo izraženog, ali statistički značajnog, povećanja kod tretiranih biljaka. Nivo 5-CQA je bio niži kod tretiranih biljaka oba genotipa – mada razlike nisu bile izrazito ispoljene. Sadržaj navedenih fenolnih kiselina kod obe linije je prikazan na Slici 4.18.



**Slika 4.17 Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja.** Ispitivana fenolna jedinjenja bila su rutin, viteksin, kvercetin, naringenin, izoramnetin i astragalalin (kampferol-3-O-glukozid). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i kiselina je izražen u miligramima po kilogramu uzorka (g/kg).

Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).



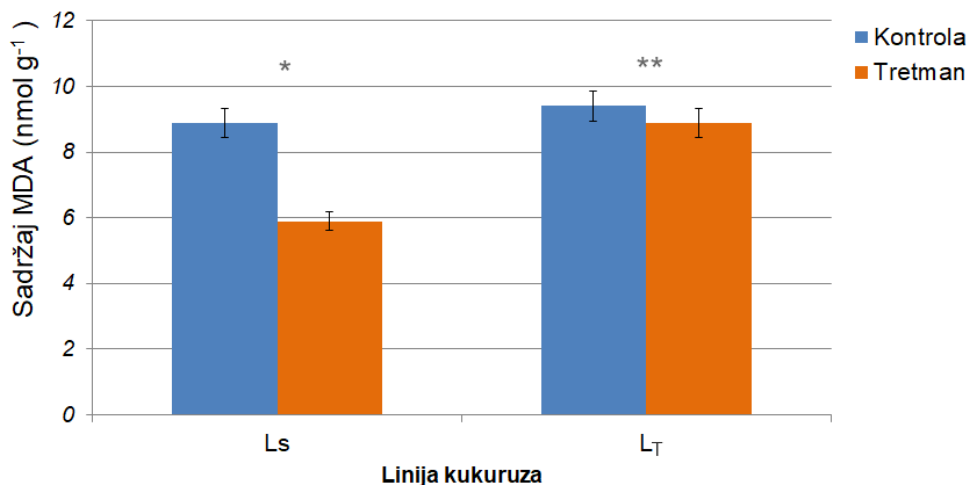
**Slika 4.18 Sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina.** Ispitivane fenolne kiseline bile su p-kumarinska, kofeinska, i 5-O-kafeoilhinska, 5-CQA (neohlorogena) kiselina. Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja i kiselina je izražen u miligramima po kilogramu uzorka (g/kg). Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

## 4.2.2. Fiziološka karakterizacija

### 4.2.2.1. Nivo lipidne peroksidacije

Malonil dialdehid je jedinjenje koje nastaje kao posledica lipidne peroksidacije i razlaganja ćelijskih membrana, na osnovu čijeg nivoa se procenjuje nivo oštećenja membrane. Kod osetljivog genotipa je kod tretiranih klijanaca došlo do povećanja nivoa MDA ( $\approx 30\%$ ) – u kontrolnim klijancima nivo MDA je bio 0,16 nmol/g, a u klijancima tretiranim NT 0,22 nmol/g.

Kod  $L_T$  je uočeno suprotno, odnosno nivo MDA je bio  $\approx 30\%$  veći kod kontrolnih klijanaca – nivo MDA iznosio je 0,28 nmol/g u kontrolnim uslovima, dok je kod klijanaca izloženih NT ova vrednost bila 0,19 nmol/g. Razlike u nivou MDA između kontrolnih i tretiranih klijanaca obe linije su bile statistički značajne. Sadržaj MDA je prikazan na Slici 4.19.

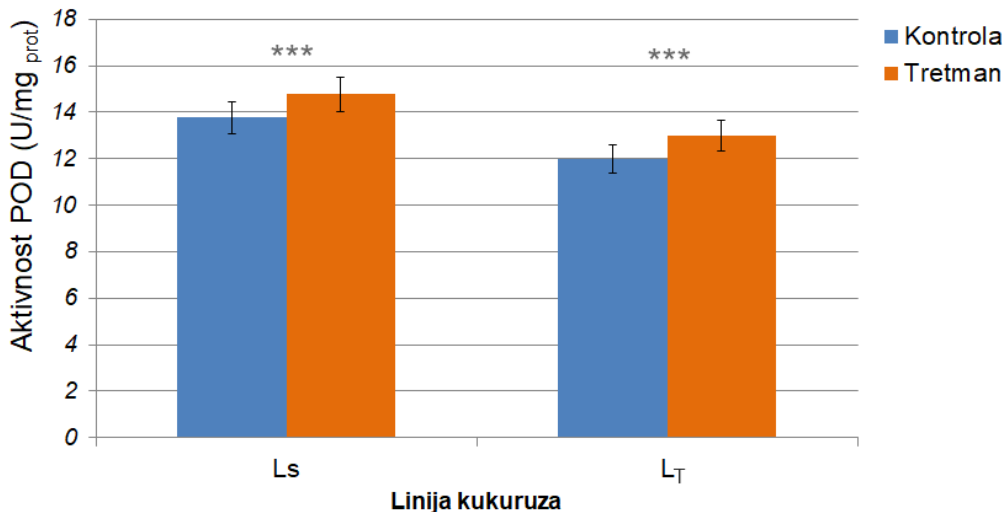


**Slika 4.19 Sadržaj malonildialdehida (MDA).** Sadržaj MDA je izražen u nanomolima po gramu sveže mase uzorka (nmol g<sup>-1</sup>). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Aktivnost antioksidativnih enzima

##### 4.2.2.2.1. Aktivnost peroksidaze (POD)

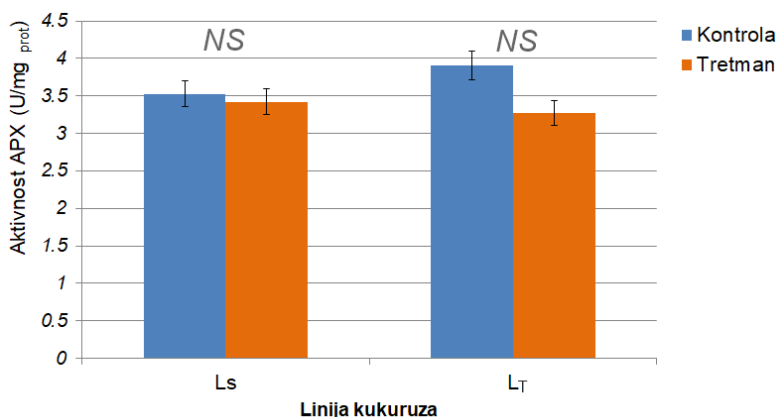
Aktivnost peroksidaze je izračunata na osnovu vrednosti apsorbanci pirogalol-hinona, koji nastaje oksidacijom pirogalne kiseline katalizovanom od strane POD. Kod obe linije je došlo do statistički značajnih, ali slabo izraženih povećanja nivoa aktivnosti POD u uzorcima tretiranim niskim temperaturama. Kod Ls, nivo aktivnosti POD u kontrolnim uzorcima bio je 13,76 U/mg<sub>prot</sub>, a u tretiranim je bio povećan za manje od 10%, i iznosio je 14,77 U/mg<sub>prot</sub>. Kod tolerantne linije, aktivnosti POD u kontrolnim i tretiranim uzorcima bile su 11,98 U/mg<sub>prot</sub>, odnosno 12,98 U/mg<sub>prot</sub> – nivo aktivnosti je bio povećan za manje od 10% kod tretiranih klijanaca (Slika 4.20).



**Slika 4.20 Aktivnost enzima peroksidaze (POD).** Aktivnost enzima peroksidaze (POD) je prikazana kao količina enzima potrebna za katalizovanje reakcije sa 1  $\mu$ g supstrata u 1 mg proteina po minutu na 37°C (U/mg<sub>prot</sub>). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX)

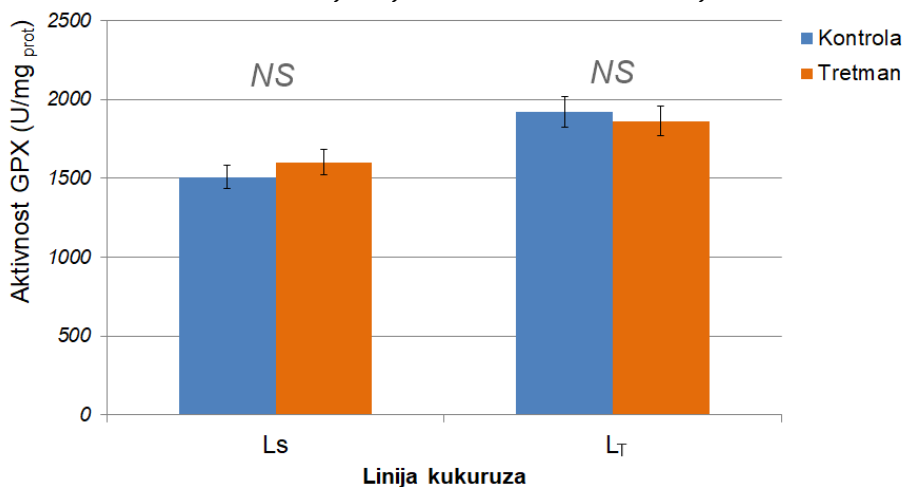
Askorbat-peroksidaza katalizuje reakciju uklanjanja  $H_2O_2$ , za šta kao supstrat koristi ASA. Utvrđeno je opadanje aktivnosti ovog enzima kod tretiranih klijanaca oba genotipa. Kod genotipa  $L_S$  APX aktivnost je opala za manje od 5% – u kontrolnim uslovima je iznosila 3,53 U/mg<sub>prot</sub>, a u uslovima tretmana 3,42 U/mg<sub>prot</sub>. Kod linije  $L_T$  je ovaj pad u aktivnosti APX kod tretiranih klijanaca bio ispoljeniji ( $\approx 20\%$ ) – kontrolni klijanci su pokazali aktivnost APX od 3,91 U/mg<sub>prot</sub>, a tretirani 3,28 U/mg<sub>prot</sub>. Međutim, ova promena nije bila statistički značajna ni kod jednog genotipa. Rezultati analize aktivnosti askorbat-peroksidaze su prikazani na Slici 4.21.



**Slika 4.21 Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX).** Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) je prikazana kao količina enzima neophodna za katalizovanje reakcije 1  $\mu$ mol ASA u 1 mg proteina u 1 mL reakcionog sistema, po minuti (U/mg<sub>prot</sub>). Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.2.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX)

Glutation peroksidaza (GPX) katalizuje reakciju oksidacije GSH. Aktivnost ovog enzima je određena merenjem stope opadanja sadržaja ovog jedinjenja. Utvrđeno je da je nivo aktivnosti ovog enzima (Slika 4.22) opadao kod tretiranih biljaka tolerantne linije (manje od 5%): izmerena aktivnost je iznosila 1922,1 U/mg<sub>prot</sub> u kontrolnim, a 1861,8 U/mg<sub>prot</sub> u tretiranim uzorcima. Sa druge strane, kod  $L_S$  je došlo do povećanja nivoa aktivnosti GPX (manje od 5%): izmerena aktivnost je iznosila 1508,3 u kontrolnim uzorcima, a 1600,7 u tretiranim. Međutim, razlika između kontrole i tretmana kod obe linije nije bila statistički značajna.

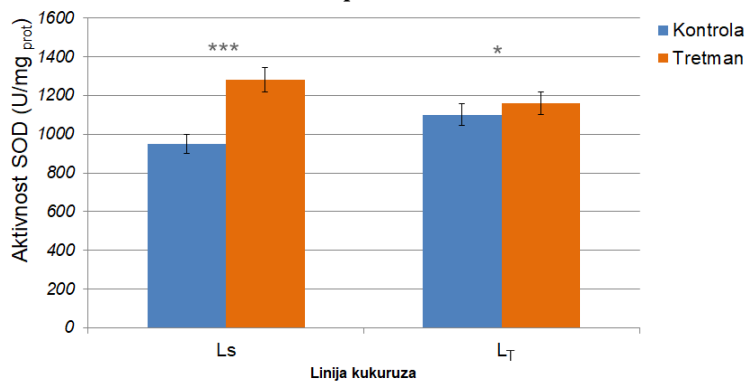


**Slika 4.22 Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPX).** Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPX) je prikazana kao količina enzima potrebna za katalizovanje reakcije sa 1  $\mu$ g supstrata u 1 mg proteina po minuti na 37°C (U/mg<sub>prot</sub>). Standardna

devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.2.4. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

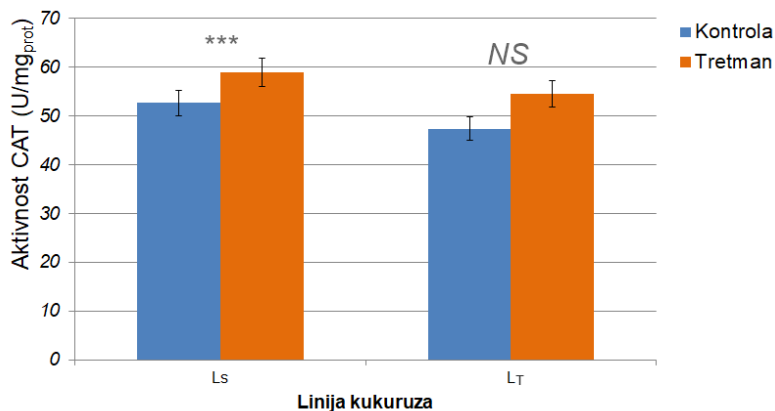
Superoksid dismutaza (SOD) je odgovorna za ublažavanje efekta oksidativnog stresa nastalog zbog produkcije superoksidnih radikala. Aktivnost SOD (Slika 4.23) je bila povećana kod tretiranih uzoraka oba genotipa i ove razlike su bile statistički značajne. Kod linije L<sub>s</sub>, razlika u aktivnosti SOD između kontrolnih i tretiranih klijanaca bila je ≈25% – u kontrolnim uzorcima izmerena aktivnost bila je 949,8 U/mg<sub>prot</sub>, a u tretiranim 1281,3 U/mg<sub>prot</sub>. Kod tolerantne linije ovo povećanje je bilo slabije izraženo, odnosno ≈5% – 1100,5 U/mg<sub>prot</sub> u kontrolnim uzorcima, a 1159,4 U/mg<sub>prot</sub> u onim tretiranim niskim temperaturama.



**Slika 4.23 Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD).** Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) je prikazana kao količina enzima potrebna za katalizovanje reakcije sa 1 µg supstrata u 1 mg proteina po minutu na 37°C (U/mg<sub>prot</sub>). Kontrola je obeležena plavom bojom, a tretman narandžastom. Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.2.5. Aktivnost katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze (CAT) je izračunata preko nivoa peroksomolibdata, jedinjenja koji nastaje oksidacijom amonijum molibdata, u reakciji katalizovanoj od strane ovog enzima. Kod L<sub>s</sub>, nivo aktivnosti CAT bio je povećan u tretiranim uzorcima (≈10%) i ta razlika je bila statistički značajna – u kontrolnim uzorcima je iznosio 52,6 U/mg<sub>prot</sub> i 59 U/mg<sub>prot</sub> u tretiranim uzorcima. Isti obrazac je uočen i kod L<sub>T</sub>, odnosno aktivnost CAT je bila povećana u tretiranim uzorcima (≈15%) – nivo aktivnosti CAT je bio 47,4 U/mg<sub>prot</sub> u kontrolnim uzorcima, a u tretiranim 54,6 U/mg<sub>prot</sub>. Međutim, za razliku od L<sub>s</sub>, ova razlika nije statistički značajna. Nivo aktivnosti katalaze kod obe linije je prikazan na Slici 4.24.



**Slika 4.24 Aktivnost enzima katalaze (CAT).** Aktivnost enzima katalaze (CAT) je prikazana kao količina enzima potrebna za katalizovanje reakcije sa 1 µg supstrata u 1 mg proteina po minutu na 37°C (U/mg<sub>prot</sub>). Kontrola je obeležena plavom bojom, a

tretman narandžastom. Standardna devijacija je prikazana kao traka greške (eng. *error bar*) na vrhu svakog stupca u grafiku. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2.3. Fotosintetska efikasnost

Ispitivanje fotosintetske efikasnosti je izvršeno nakon završenog tretmana niskim temperaturama (24h) i posle oporavka u trajanju od sedam dana u optimalnim uslovima. Za određivanje fotosintetske efikasnosti izračunati su parametri:  $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $Y(NO)$ ,  $Y(NPQ)$  i ETR. Rezultati ovih parametara prikazani su u Tabeli 4.1. Statistički značajne razlike uočene su u maksimalnom kvantnom prinosu i fotohemijskoj efikasnosti fotosistema II kod genotipa  $L_s$ , gde su vrednosti oba parametra bile smanjene kod tretiranih biljaka.

**Tabela 4.1 Razlika u fotosintetskoj efikasnosti između kontrole i tretmana kod osetljive,  $L_s$ , i tolerantne linije,  $L_T$ .** Parametri fotosintetske aktivnosti su navedeni u prvoj koloni: maksimalni kvantni prinos fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), fotohemijaska efikasnost fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ), kvantna efikasnost neregulisanog oslobađanja energije u PSII ( $Y(NO)$ ), kvantna efikasnost regulisanog oslobađanja energije u PSII ( $Y(NPQ)$ ) i brzina prenosa elektrona (ETR). Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je određena T-testom i prikazana kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS ( $p > 0,05$ ).

Parametar	$L_s$			$L_T$		
	Kontrola	Tretman	Statistička značajnost	Kontrola	Tretman	Statistička značajnost
$F_v/F_m$	0,637	0,607	***	0,625	0,627	NS
$\Phi_{PSII}$	0,643	0,605	*	0,626	0,631	NS
ETR	45,76	50,81	NS	48,49	47,21	NS
$Y(NO)$	0,224	0,225	NS	0,224	0,227	NS
$Y(NPQ)$	0,009	0,004	NS	0,004	0,006	NS

### 4.3. Sekvenciranje ukupnog transkriptoma

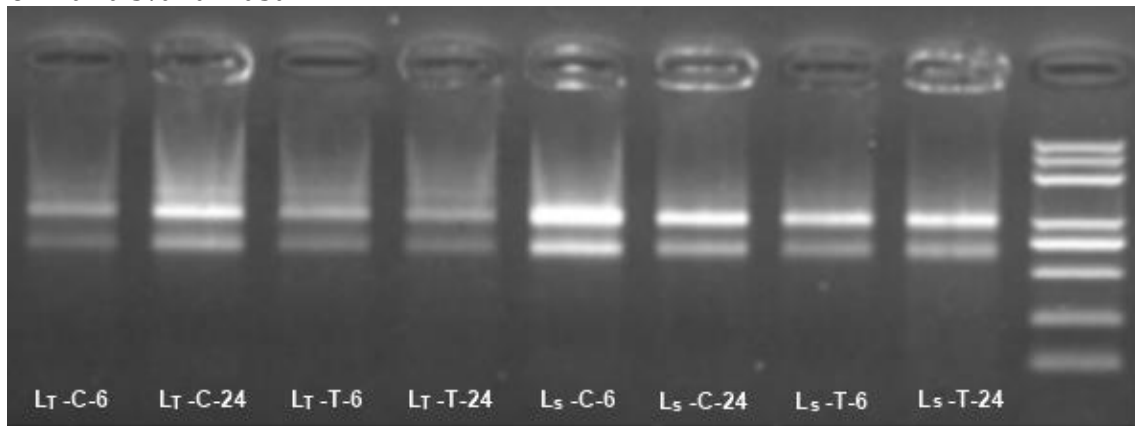
Početni materijal za sekvenciranje transkriptoma NGS metodom su specifične biblioteke cDNK, za čiju je sintezu bila potrebna ekstrahovana i prečišćena RNK određenog kvaliteta. Pojedinačni uzorci izolovane RNK su bili obeleženi na sledeći način:  $L_s$ -C-6,  $L_s$ -C-24,  $L_s$ -T-6,  $L_s$ -T-24,  $L_T$ -C-6,  $L_T$ -C-24,  $L_T$ -T-6, i  $L_T$ -T-24. Koncentracije izolovane RNK, ukupne količine izolovane RNK, i vrednosti  $A_{260/230}$ ,  $A_{260/280}$  i RIN su prikazane u Tabeli 4.2. Prikaz izolovane i prečišćene RNK na agaroznom gelu za sve uzorke prikazan je na Slici 4.25. Na osnovu vrednosti parametara kvaliteta i integriteta RNK zaključeno je da svi izolati RNK zadovoljavaju standarde i mogu biti korišćeni za sintezu komplementarnih cDNK biblioteka.

**Tabela 4.2 Kvalitet i integritet izolovane RNK.** Parametri kvaliteta i integriteta RNK navedeni u tabeli su: koncentracija RNK (ng/ $\mu$ L), količina RNK (ng),  $A_{260/230}$ ,  $A_{260/280}$  i RIN.

Uzorak	Koncentracija RNK (ng/ $\mu$ L)	Količina RNK (ng)	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	RIN vrednost
$L_s$ -C-6	204	8,364	1,88	1,98	10
$L_s$ -C-24	204	8,568	1,88	1,88	10
$L_s$ -T-6	122	5,124	1,96	1,91	9,8
$L_s$ -T-24	135	5,400	1,85	1,93	9,7
$L_T$ -C-6	94	3,948	1,97	2,05	8,2
$L_T$ -C-24	193	8,106	1,96	1,86	10
$L_T$ -T-6	110	4,400	1,54	1,6	9,8
$L_T$ -T-24	121	4,840	1,61	1,65	9,7

Uzorci RNK su podvrgnuti procesu uklanjanja rRNK, nakon čega su podeljeni radi pripreme oba tipa biblioteka, PE i SE. Kvalitet sintetisanih PE i SE biblioteka svih osam uzoraka

koji je proveren metodom elektroforeze visoke rezolucije, je bio zadovoljavajući i pogodan za NGS. Sekvenciranje je urađeno na *NovaSeq 6000* sekvenceru: za PE sekvenciranje program je uključivao 2 × 150 bp sekvenciranje sa dvojnim indeksima (i7 i i5), a za SE, 1 × 50 bp sekvenciranje. Dobijeni sirovi PE i SE podaci su dalje bioinformatički obrađeni specifičnim protokolima za svaku klasu RNK.



**Slika 4.25 Prikaz izolovane RNK.** Izolovana i prečišćena RNK iz osam uzoraka (Ls-C-6, Ls-C-24, Ls-T-6, Ls-T-24, LT-C-6, LT-C-24, LT-T-6, i LT-T-24).

## **4.4. Bioinformatička obrada podataka**

### **4.4.1. Kvalitet sirovih podataka sekvenciranja**

Primenom alata *FastQC* omogućeno je dobijanje izveštaja provere kvaliteta koji sadrži više parametara, uključujući ukupan broj sirovih sekvenci ( $N_{SS}$ ), ukupan broj sekvenci visokog kvaliteta ( $N_{SVK}$ ), ukupan broj baza ( $N_B$ ), ukupan broj baza visokog kvaliteta ( $N_{BVK}$ ), stopa greški (SG), procenat sekvenci sa ocenom kvaliteta većom od 20 (Q20), procenat sekvenci sa ocenom kvaliteta većom od 30 (Q30), GC sadržaj (GC). Najbitniji parametar je kvalitet sekvenciranja po nukleotidnoj bazi na osnovu kojeg se automatski računa Fredova ocena kvaliteta (QC). QC vrednost može biti u opsegu od 10 do 60, i vrednosti QC veće od 20 se smatraju pouzdanim (preciznost sekvenciranja je 99%), a veće od 30 veoma pouzdanim (preciznost sekvenciranja je 99.9%). U slučaju PE sekvenciranja,  $\approx 99\%$  sekvenci je imalo ocenu Q20, a  $\approx 95\%$  ocenu Q30. Slične vrednosti QC su dobijene i za podatke dobijene SE sekvenciranjem – više od 98% sekvenci je imalo ocenu Q20, i  $\approx 96\%$  sekvenci je ocenjeno sa Q30. Bitan parametar je i sadržaj neidentifikovanih baza (N), koji je kod svih uzoraka oba tipa sekvenciranja bio 0,00%. Pronađene su i prezastupljene sekvence, koje su obuhvatale sekvence adaptera korišćenih tokom samog procesa sekvenciranja. Prezastupljene sekvence su uklonjene u koraku obrade bioinformatičkim alatom *Trimmomatic*. U slučaju SE podataka izvršeno je dodatno filtriranje prema dužini sekvenci, čime su sačuvane samo one duže od 18, a kraće od 31 nukleotida.

S obzirom na činjenicu da je  $\approx 95\%$  sekvenci imalo ocenu Q30, i da neidentifikovanih baza nije bilo, smatra se da je sekvenciranje bilo uspešno i da su dobijeni podaci visokog kvaliteta. Rezultati provere kvaliteta podataka dobijenih PE sekvenciranjem su prikazani objedinjeni po uzorku za sekvence sekvencirane iz oba smera u Tabeli 4.3, dok su rezultati provere kvaliteta podataka dobijenih SE sekvenciranjem prikazani u Tabeli 4.4.

**Tabela 4.3 Kvalitet podataka dobijenih PE 2 × 150 bp sekvenciranjem.** Parametri kvaliteta su  $N_{SS}$ ,  $N_{SVK}$ ,  $N_B$ ,  $N_{BVK}$ , SG, Q20, Q30, GC.

Uzorak	$N_{SS}$	$N_{SVK}$	$N_B$ (Gbp)	$N_{BVK}$ (Gbp)	SG	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
Ls-C-6	52031889	51044142	15,6	15,4	0,02	98,45	95,3	54,82
Ls-C-24	48938800	48091195	14,7	14,6	0,02	98,49	95,35	53,76

L <sub>S</sub> -T-6	51460205	50477480	15,4	15,3	0,02	98,38	95,07	53,49
L <sub>S</sub> -T-24	43925206	43216476	13,2	13	0,02	98,59	95,61	54,21
L <sub>T</sub> -C-6	44432833	43626949	13,3	13,2	0,02	98,5	95,4	54,63
L <sub>T</sub> -C-24	59818861	58813399	17,9	17,7	0,02	98,51	95,36	52,78
L <sub>T</sub> -T-6	55264305	54234896	16,6	16,3	0,02	98,46	95,31	53,9
L <sub>T</sub> -T-24	53039694	52104693	15,9	15,7	0,02	98,52	95,45	54,17

**Tabela 4.4 Kvalitet podataka dobijenih 1 × 50 bp sekvenciranjem.** Parametri kvaliteta su N<sub>SS</sub>, N<sub>SVK</sub>, N<sub>B</sub>, N<sub>BVK</sub>, SG, Q20, Q30, GC.

Uzorak	N <sub>SS</sub>	N <sub>SVK</sub>	N <sub>B</sub> (Gbp)	N <sub>BVK</sub> (Gbp)	SG	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
L <sub>S</sub> -C-6	21508483	20560537	1,08	1,03	0,0001	98,77	96,41	53,78
L <sub>S</sub> -C-24	21270425	19434426	1,06	0,96	0,0001	99,18	97,14	53,33
L <sub>S</sub> -T-6	25557721	25308392	1,28	1,27	0,0001	99,28	97,46	51,05
L <sub>S</sub> -T-24	21559705	20671159	1,08	1,04	0,0001	98,01	94,24	54,95
L <sub>T</sub> -C-6	22192595	21938806	1,11	1,10	0,0001	98,17	94,50	49,86
L <sub>T</sub> -C-24	20277368	20060097	1,01	0,99	0,0001	99,26	97,59	53,85
L <sub>T</sub> -T-6	20131208	19979721	1,01	1,00	0,0001	99,21	96,91	52,00
L <sub>T</sub> -T-24	22803969	22530101	1,14	1,12	0,0001	99,23	97,37	50,84

#### **4.4.2. Poravnanje prečišćenih sekvenci sa referentnim genomom**

Poravnanje prečišćenih sekvenci sa referentnim genomom, odnosno mapiranje, je urađeno bioinformatičkim alatom *STAR*. Određena sekvenca može biti mapirana, odnosno poravnana samo sa jednim regionom referentnog genoma – jedinstveno mapirane sekvence, JMS (eng. *unique mapped reads*) ili sa više, čime se dobija ukupan broj mapiranih sekvenci, UMS (eng. *total mapped reads*). Kod podataka dobijenih PE sekvenciranjem, prosečna stopa poravnanja iznosila je 93,57%, dok je u proseku 78,5% mapirano na samo jedan region referentnog genoma. Detaljne informacije za svaki uzorak su navedene u Tabeli 4.5. U slučaju SE podataka, 81,39% je uspešno mapirano na referentni genom, od čega su 56,9% bile jedinstveno mapirane sekvence. Takođe, SE sekvence su grupisane u nekoliko klasa na osnovu regiona genoma sa kojim su poravnane, radi preciznije dalje analize. SE sekvence dužine 18-31 nt, odnosno male RNK, sRNK (eng. *small RNA*, sRNA) su podeljene na poznate miRNK, nove miRNK, tRNK, snRNK, snoRNK, ponovljene sekvence (eng. *repeat sequences*), sekvence mapirane na egzonske regione (sRNK<sub>ER</sub>), sekvence mapirane na intronske regione (sRNK<sub>IR</sub>) i neklasifikovane sekvence. Rezultati mapiranja sekvenci dužine 18-31 nt su prikazani u Tabeli 4.6, a klasifikacija mapiranih sRNK je prikazana u Tabeli 4.7. Distribucija, odnosno raspodela, filtriranih, mapiranih sRNK sekvenci različitih dužina je prikazana na Slici 4.26. Većina sRNK transkripata bila je dužine 20–24 nt (prosečno 67,9%), a transkripti tužine 24 nt su bili najzastupljeniji (u proseku 29,97% svih mapiranih sRNK transkripata).

**Tabela 4.5 Poravnanje PE sekvenci sa referentnim genomom.** Prikazani su ukupan broj (N TMS) i procenat (TMS (%)) svih prečišćenih sekvenci koje su uspešno mapirane; kao i ukupan broj (N UMS) i procenat (UMS (%)) prečišćenih sekvenci koje su jedinstveno mapirane.

Uzorak	N UMS	UMS (%)	N JMS	JMS (%)
L <sub>S</sub> -C-6	47 703 257	93,46	40 904 830	80,14
L <sub>S</sub> -C-24	45 565 959	94,75	38 146 958	79,32
L <sub>S</sub> -T-6	47 238 367	93,58	39 555 339	78,36
L <sub>S</sub> -T-24	48 765 063	93,59	40 834 418	78,37
L <sub>T</sub> -C-6	40 150 425	92,03	34 156 101	78,29
L <sub>T</sub> -C-24	55 647 223	94,62	44 743 668	76,08
L <sub>T</sub> -T-6	50 390 940	92,91	42 645 039	78,63

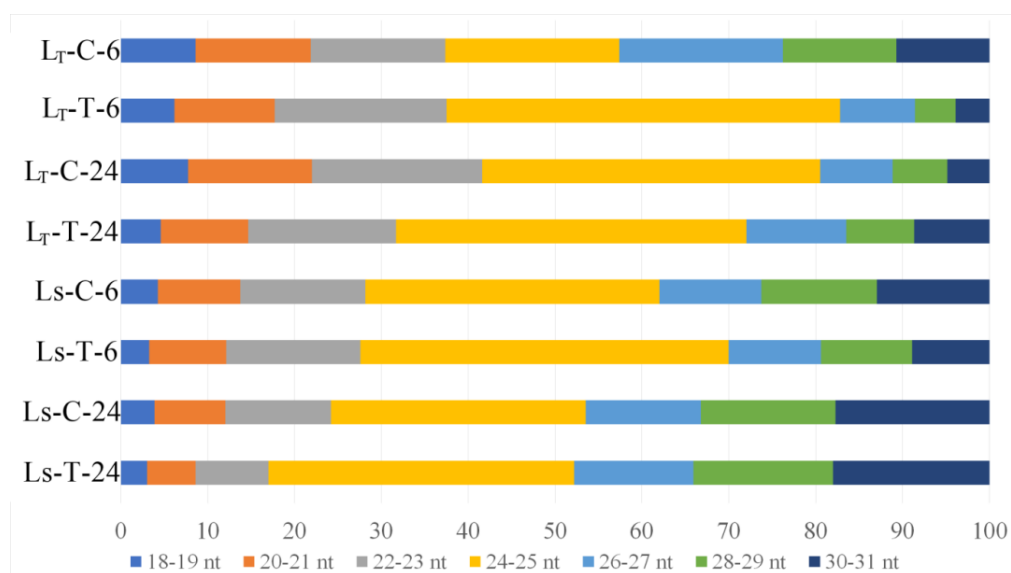
<b>L<sub>T</sub>-T-24</b>	40 438 891	93,58	34 070 573	78,84
---------------------------	------------	-------	------------	-------

**Tabela 4.6 Poravnanje SE sekvenci dužine 18-31 nt sa referentnim genomom.** Prikazani su ukupan broj (N TMS) i procenat (TMS (%)) svih prečišćenih sekvenci koje su uspešno mapirane; kao i ukupan broj (N UMS) i procenat (UMS (%)) prečišćenih sekvenci koje su jedinstveno mapirane.

Uzorak	N UMS	UMS (%)	N JMS	JMS (%)
<b>L<sub>S</sub>-C-6</b>	12 432 617	75,68	11 325 204	68,94
<b>L<sub>S</sub>-C-24</b>	10 336 699	78,40	9 500 647	72,06
<b>L<sub>S</sub>-T-6</b>	18 232 231	79,73	16 147 440	70,62
<b>L<sub>S</sub>-T-24</b>	5 925 766	83,10	5 435 657	76,23
<b>L<sub>T</sub>-C-6</b>	18 072 195	92,89	17 559 053	90,25
<b>L<sub>T</sub>-C-24</b>	13 559 575	80,87	11 951 241	71,28
<b>L<sub>T</sub>-T-6</b>	10 742 526	78,78	9 025 572	66,19
<b>L<sub>T</sub>-T-24</b>	16 151 003	81,67	14 235 011	71,98

**Tabela 4.7 Klasifikacija SE sekvenci dužine 18-31 nt.** Procentualna zastupljenost (%) sledećih klasa SE sekvenci dužine 18-31 nt: poznate miRNK, nove miRNK, tRNK, snRNK, snoRNK, ponovljene sekvence, sekvence mapirane na egzonske regione, sekvence mapirane na intronske regione i neklasifikovane sekvence.

Klasa	L <sub>S</sub> -C-6	L <sub>S</sub> -C-24	L <sub>S</sub> -T-6	L <sub>S</sub> -T-24	L <sub>T</sub> -C-6	L <sub>T</sub> -C-24	L <sub>T</sub> -T-6	L <sub>T</sub> -T-24
<b>Poznate miRNK</b>	1,15	1,30	1,51	4,59	0,18	2,80	3,15	1,92
<b>Nove miRNK</b>	0,13	0,10	0,21	0,10	0,02	0,19	0,31	0,20
<b>snRNK</b>	0,19	0,19	0,12	0,28	0,17	0,06	0,07	0,08
<b>snoRNK</b>	1,55	1,60	0,59	2,39	0,38	1,35	0,57	0,42
<b>tRNK</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Ponovljene sekvence</b>	3,78	3,06	4,66	3,26	0,60	4,80	5,80	4,57
<b>sRNK<sub>ER</sub></b>	34,01	36,61	31,65	31,05	57,70	23,94	21,75	31,28
<b>sRNK<sub>IR</sub></b>	33,14	30,89	29,28	35,13	30,26	35,77	29,80	29,50
<b>Neklasifikovane sekvence</b>	26,05	26,25	31,99	23,20	10,70	31,10	38,55	32,03



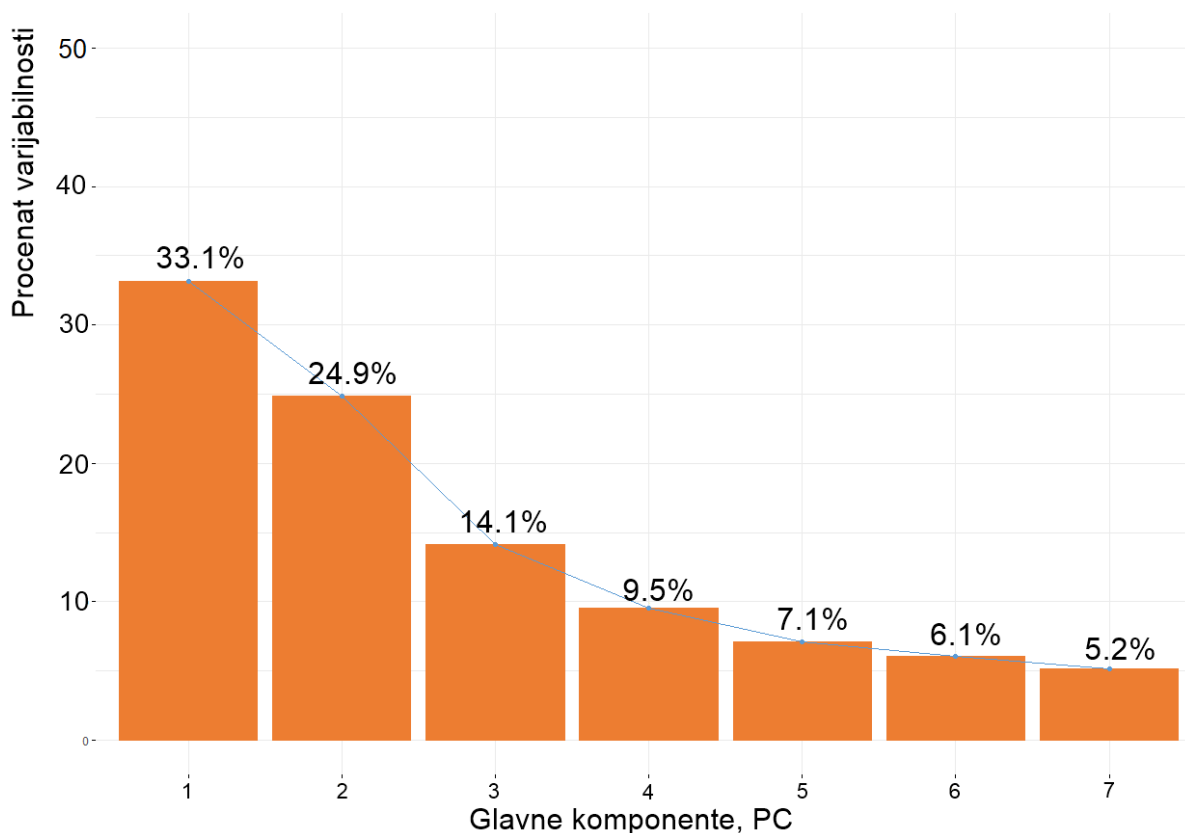
**Slika 4.26 Distribucija dužina mapiranih sRNK transkripata.** Procentualna zastupljenost sRNK transkripata različitih dužina je prikazana na x-osi.

### 4.4.3. Ekspresija iRNK

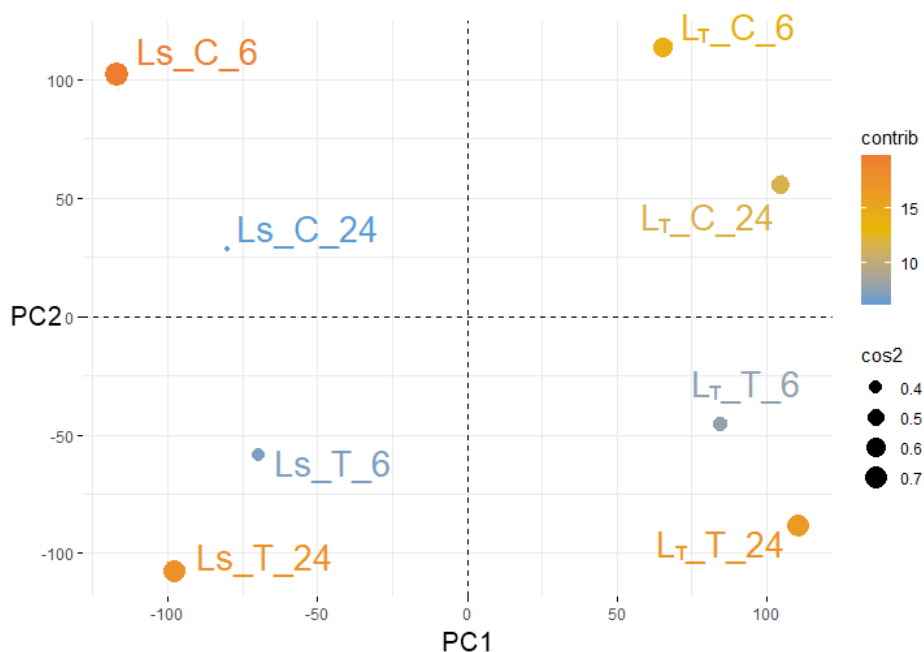
Prvi korak u analizi obrazaca ekspresije iRNK tokom stresa izazvanog niskim temperaturama kod  $L_s$  i  $L_t$  linije, bio je kvantifikacija iRNK, odnosno gena sa kojih su transkribovane. Bioinformatički alat *htseq* je primenjen za ovu svrhu i kao rezultat su dobijeni podaci o ekspresiji svih gena kukuruza, odnosno broj sekvenci koji odgovara svakom genu (RC) za svaki od osam uzoraka. Rezultati su obuhvatili podatke o nivou ekspresije 33857 gena, međutim značajan broj gena je imao RC vrednosti manje od 15. Radi povećanja pouzdanosti, ti geni za dalje analize nisu uzeti u obzir. Preostalih 26023 gena je korišćeno za PCA i HCA analizu, dok su za DE i WGCNA analizu urađena dodatna filtriranja. Takođe, za PCA i HCA analizu je urađena transformacija u FPKM vrednosti pomoću *DESeq2* R-paketa.

#### 4.4.3.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)

PCA analiza je urađena korišćenjem FPKM vrednosti, pomoću *factoextra* paketa u *R* programu. Procenat varijabilnosti koju opisuje svaka varijabla, odnosno PC, prikazana na Slici 4.27. Eigen-vrednost, koordinate, *cos2* vrednosti i individualni doprinosi svake PC su prikazani u Prilogu 1. Na grafiku individua (Slika 4.28), može se uočiti da više od 70% varijabilnosti u genskoj ekspresiji može biti objašnjeno kroz prve dve glavne komponente, PC1 i PC2. Na osnovu nivoa ekspresije gena obuhvaćenih sa PC1 i PC2, pokazano je jasno razdvajanje uzoraka u četiri grupe, na osnovu eksperimentalnih uslova (kontrola i tretman) i genetskog porekla linije ( $L_s$  i  $L_t$ ).



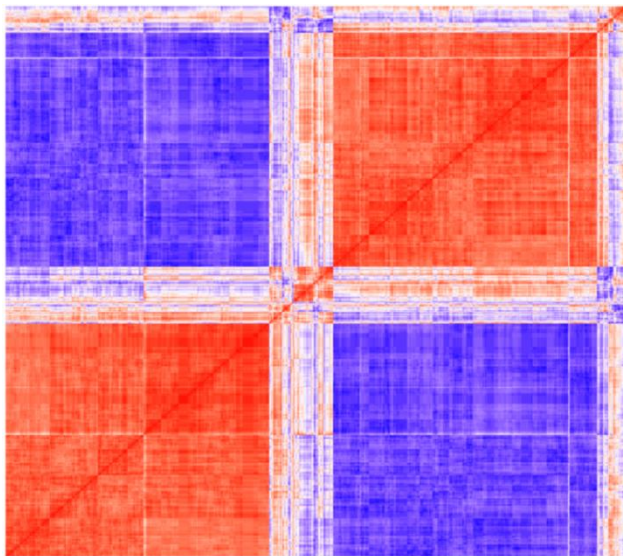
Slika 4.27 Varijabilnost obuhvaćena svakom glavnom komponentom (PC). Glavne komponente (PC) su obeležene brojevima od 1 do 7.



**Slika 4.28 PCA grafik individua.** Individualni doprinosi svake PC (*contrib*) su prikazani u opsegu 10-20, obeleženim opsegom plavo-žuto-narandžaste boje. *cos2* vrednosti PC su prikazani u opsegu 0.4-0.7, i to kao tačke različite veličine.

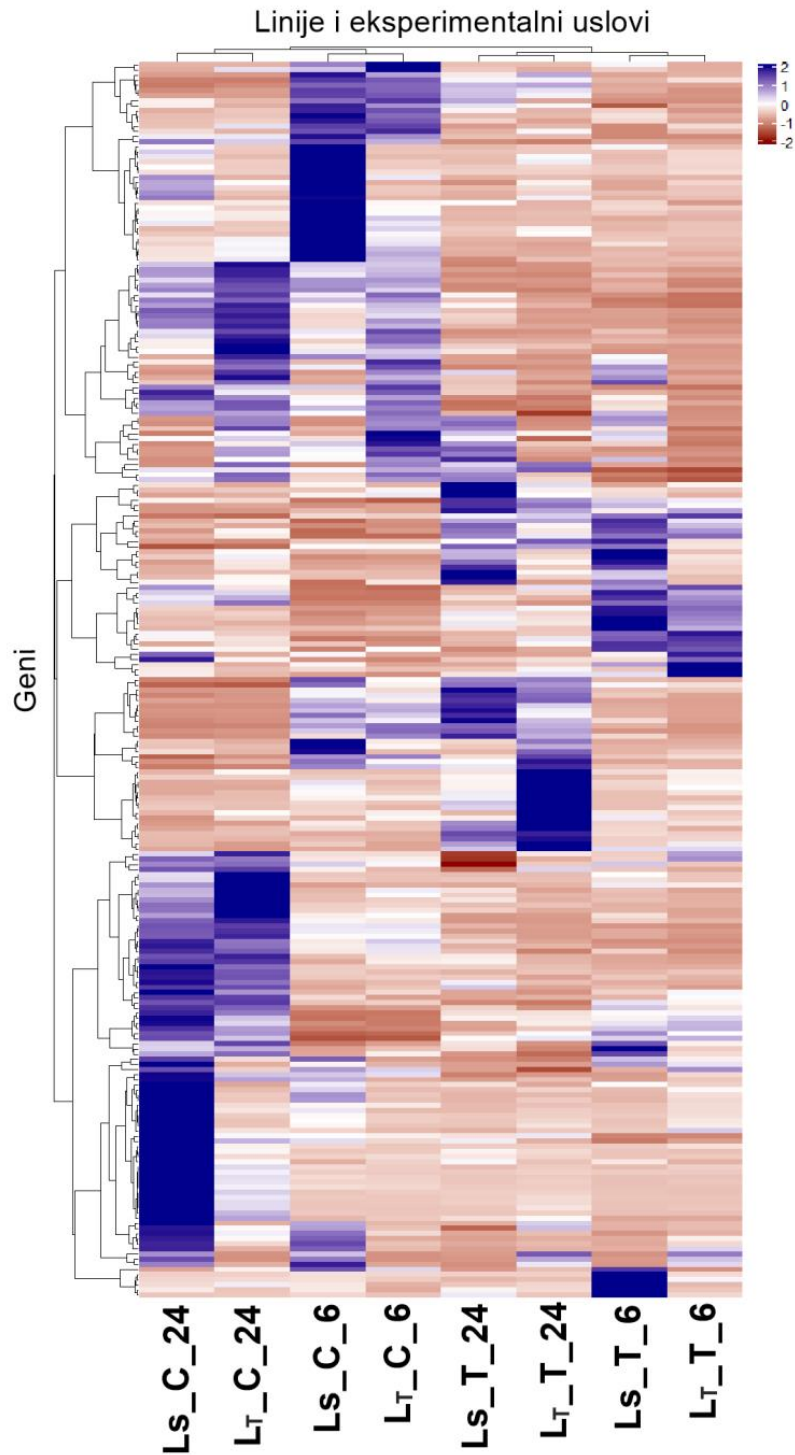
#### 4.4.3.2. Hijerarhijska analiza grupisanja (HCA)

Hijerarhijska analiza grupisanja (HCA) je urađena korišćenjem FPKM vrednosti i R paketa *cluster*. Sklonost ga grupisanju ispitivanih uzoraka je potvrđena Hopkinsovom statističkom metodom, pomoću izračunate H-vrednosti. Uniformna distribucija uzoraka se odlikuje vrednošću  $H \approx 0,5$ , dok ukoliko postoje klasteri H-vrednost raste. Vrednost H veća od 0,75 ukazuje na postojanje sklonosti ka grupisanju, sa pouzdanošću od 90%. H-vrednost analiziranih uzoraka je bila  $H=0,999$ , ukazujući na visoku sklonost ka grupisanju, što je vizuelno i dodatno potvrđeno (Slika 4.29).



**Slika 4.29 Vizuelna procena sklonosti ka grupisanju (eng. visual assessment of cluster tendency, VAT).** Vizuelna procena sklonosti ka grupisanju na osnovu ekspresije 26023 gena u osam analiziranih uzoraka. Vizuelna procena sklonosti ka grupisanju podrazumeva formiranje ODM (eng. *ordered dissimilarity matrix*, ODM) na osnovu distanci i ODM je predstavljen kao ODI (eng. *ordered dissimilarity image*, ODI), prikazan na slici. Boje su proporcionalne vrednosti različitosti (eng. *dissimilarity*) između gena. Crvena boja označava sličnost između gena ( $dist(x_i, x_j)=0$ ), a plava različitost ( $dist(x_i, x_j)=1$ ).

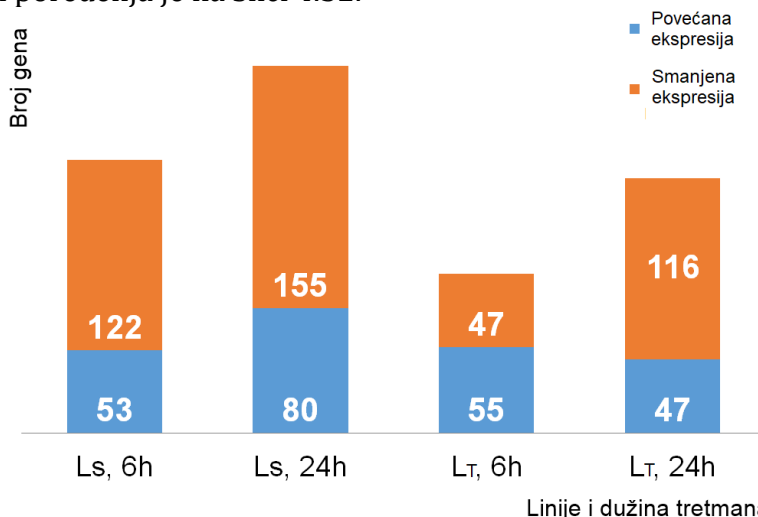
Izračunate Euklidske matrice distanci i Vordova metoda minimalne varijanse su iskorišćene za AGNES analizu. Dobijena hit-mapa i dendrogram prikazani su na Slici 4.30. Rezultati AGNES-HCA analize su pokazali da se uzorci prvo grupišu na osnovu eksperimentalnih uslova (tip – kontrola i tretman; dužina izlaganja – 6h ili 24h), a tek onda na osnovu genotipa, odnosno porekla.



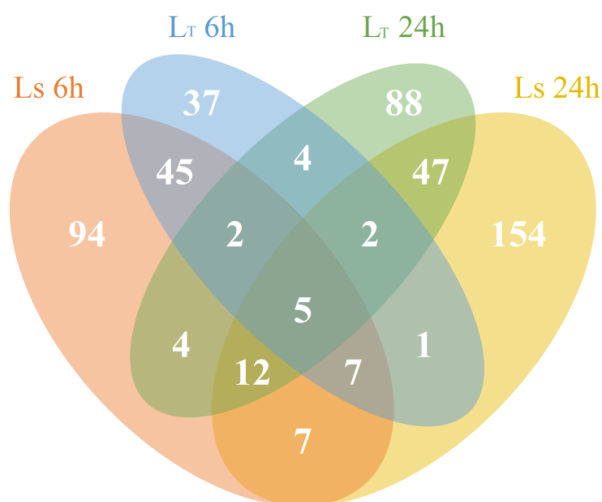
**Slika 4.30 Hijerarhijska analiza grupisanja, HCA.** Hijerarhijska analiza grupisanja, HCA na osnovu ekspresije 26023 gena u osam analiziranih uzoraka prikazanih kao kolone hit-mape (Ls-C-6, Ls-C-24, Ls-T-6, Ls-T-24, Lt-C-6, Lt-C-24, Lt-T-6, i Lt-T-24). Pojedinačni geni su prikazani u redovima hitmapi. Boja svakog polja na hitmapi prikazuje određenu, normalizovanu, skaliranu FPKM vrednost u opsegu od -2 (crvena boja), preko 0 (bela boja) do 2 (plava boja).

#### 4.4.3.3. Diferencijalna ekspresija gena

Analiza diferencijalne ekspresije iRNK, odnosno gena sa kojih su transkribovane, je podrazumevala poređenje nivoa ekspresije između kontrolnih i tretiranih uzoraka obe linije, nakon 6 i 24h stresa. Geni sa  $\log_2FC \geq 1$  ili  $\leq -1$  ( $q$ -vrednost  $< 0,01$ ) između kontrole i tretmana su smatrani značajno diferencijalno eksprimiranim. Pronađeno je ukupno 508 DE gena između kontrole i tretmana – 175 kod  $L_S$  nakon 6h i 235 nakon 24h tretmana; dok su kod tolerantne linije, 102 gena bila DE nakon 6h, a 163 nakon 24h tretmana (Slika 4.31). Pet gena je bilo zajedničko za obe linije i vremenske tačke (Zm00001eb106430, Zm00001eb113780, Zm00001eb161610, Zm00001eb101660, Zm00001eb325410). Prikaz jedinstvenih i zajedničkih DE gena za ova četiri poređenja je na Slici 4.32.



**Slika 4.31 Diferencijalna ekspresija (DE) iRNK, odnosno odgovarajućih gena.** Broj DE iRNK, odnosno odgovarajućih gena diferencijalno eksprimiranih između kontrolnih i tretiranih uzoraka obe linije ( $L_S$ ,  $L_T$ ) i vremenske tačke (6h i 24h) je prikazan u okviru svakog stupca na grafiku. Geni sa povećanom ekspresijom u tretmanu su obeleženi plavom bojom, a oni sa smanjenom narandžastom.



**Slika 4.32 Zajedničke i jedinstvene diferencijalno eksprimirane (DE) iRNK, odnosno odgovarajući DE geni.** Venov dijagram prikazuje zajedničke i jedinstvene DE iRNK, odnosno odgovarajuće DE gene, za svako poređenje:  $L_S$  6h je prikazano narandžastom bojom,  $L_S$  24h žutom,  $L_T$  6h plavom, i  $L_T$  24h zelenom bojom.

Većina DE gena je kodirala proteine značajne za nekoliko bitnih aspekata fotosinteze, uključujući uspostavljanje fotosistema I (PSI) i II (PSII) (*psaD*, *psaE*, *psaG*, *psaH*, *psaL*, *psaN*, *psbP*, *psbQ-1*), stabilnost antena kompleksa LHC (eng. *light harvesting complex*, LHC) (*lhca-p4*, *lhcb5*,

*cab1*, *cab7*, *cab48*), regulaciju Kalvinovog ciklusa i Rubisco enzima (*rca*, *rbcx2*, *prk*), kao i zaštitu od fotoinhibicije i antioksidativne mehanizme (*ctpa2*, *elip1*, *elip2*, *grxs5*, *grxs17*, *psy2*, *thi1*, *UF3GT*, *pds*). Takođe, veliki broj DE gena je kodirao HSP proteine (*hsp* geni) i HSF transkripcione faktore (*HSF* geni). U odgovor na abiotički stres je bilo uključeno i nekoliko gena koji potencijalno kodiraju specifične peroksidaze, kao i gen *thi1*, neophodan za sintezu tiamina. Navedeni DE geni i njihov FC u ispitana četiri poređenja između kontrole i tretmana u obe vremenske tačke i linije kukuruza (L<sub>s</sub>, 6h; L<sub>s</sub>, 24h; L<sub>T</sub>, 6h i L<sub>T</sub>, 24h) su prikazani u Tabeli 4.8.

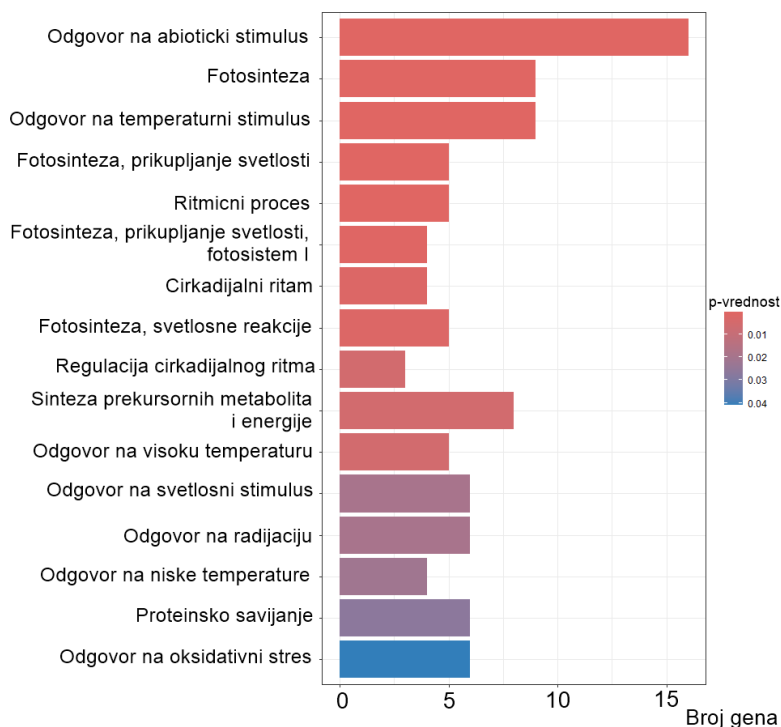
**Tabela 4.8 Najznačajniji diferencijalno eksprimirani (DE) geni i njihova promena ekspresije (FC) u ispitana četiri poređenja.** Ispitana četiri poređenja uključivala su: L<sub>s</sub>, 6h; L<sub>s</sub>, 24h; L<sub>T</sub>, 6h i L<sub>T</sub>, 24h. Promena ekspresije (FC) ovih gena je prikazana kao log<sub>2</sub> vrednost (log<sub>2</sub>FC).

Proces	Funkcija	Geni		FC			
		Naziv	ID gena	L <sub>s</sub> , 6h	L <sub>s</sub> , 24h	L <sub>T</sub> , 6h	L <sub>T</sub> , 24h
Fotosinteza	Uspostavljanje fotosistema I (PSI)	<i>psaD</i>	Zm00001eb212520	-3,04	NA	-3,65	NA
		<i>psaE</i>	Zm00001eb306070	-2,97	-2,94	NA	NA
		<i>psaG</i>	Zm00001eb101660	-2,98	-3,05	-3,93	-3,02
		<i>psaH</i>	Zm00001eb295610	-2,82	NA	NA	NA
		<i>psaL</i>	Zm00001eb336580	-3,40	-3,77	-2,93	NA
		<i>psaN</i>	Zm00001eb138650	NA	-3,19	NA	NA
	Uspostavljanje fotosistema II (PSII)	<i>psbP</i>	Zm00001eb299760	-4,56	-3,66	-3,32	NA
		<i>psbQ-1</i>	Zm00001eb106430	-3,48	-3,29	-2,93	-2,70
	Stabilizacija antena kompleksa (LHC)	<i>lhca-p4</i>	Zm00001eb179680	-2,95	NA	-3,14	NA
		<i>lhcb5</i>	Zm00001eb112260	-3,36	NA	-3,32	NA
		<i>cab1</i>	Zm00001eb357740	-6,45	-3,67	-6,80	NA
		<i>cab7</i>	Zm00001eb325410	-2,78	-3,21	-3,61	-3,13
	Geneza hloroplasta	<i>tic32</i>	Zm00001eb420380	NA	-3,67	NA	NA
		Regulacija Kalvinovog ciklusa i Rubisco	<i>rca</i>	Zm00001eb164390	NA	-3,84	NA
	<i>rbcx2</i>		Zm00001eb212460	2,97	NA	4,14	NA
	<i>prk</i>		Zm00001eb251520	NA	-3,52	NA	-2,73
	<i>s17p</i>		Zm00001eb147750	NA	-4,52	NA	NA
	Zaštita od fotoinhibicije i antioksidativni mehanizmi	<i>ctpa2</i>	Zm00001eb258790	3,28	NA	3,64	NA
		<i>elip1</i>	Zm00001eb301260	NA	NA	2,76	NA
		<i>elip2</i>	Zm00001eb301270	3,24	NA	3,78	NA
<i>grxs5</i>		Zm00001eb359850	2,63	NA	2,79	NA	
<i>grxs17</i>		Zm00001eb105530	NA	NA	8,04	NA	
<i>psy2</i>		Zm00001eb367770	3,87	NA	3,11	NA	
<i>UF3GT</i>		Zm00001eb146840	NA	NA	3,27	2,79	
Odgovor na abiotički stres	Proteini toplotnog stresa (HSP)	<i>pds</i>	Zm00001eb006310	NA	5,74	NA	5,67
		<i>hsp16</i>	Zm00001eb371530	NA	-5,96	NA	-2,71
		<i>hsp17</i>	Zm00001eb188750	NA	9,28	NA	NA
		<i>hsp17.4</i>	Zm00001eb397940	NA	-3,87	NA	NA
		<i>hsp17.5</i>	Zm00001eb121900	NA	-4,30	NA	NA
		<i>hsp17.6</i>	Zm00001eb395330	NA	-4,39	NA	NA
		<i>hsp18</i>	Zm00001eb395360	NA	-3,70	NA	NA
		<i>hsp21</i>	Zm00001eb198620	-3,30	NA	-3,51	NA
		<i>hsp23</i>	Zm00001eb081770	-3,58	-2,96	-3,64	NA
		<i>hsp26</i>	Zm00001eb010530	NA	-2,90	NA	NA
<i>hsp70-8</i>	Zm00001eb400020	NA	-2,93	NA	NA		

		<i>hsp70-17</i>	Zm00001eb257130	NA	-3,03	NA	NA
		<i>hsp82</i>	Zm00001eb418610	NA	-4,39	NA	NA
	Transkripcioni faktori toplotnog stresa (HSF)	<i>HSFB2a</i>	Zm00001eb428800	-3,82	NA	NA	-2,98
		<i>HSFA6b</i>	Zm00001eb004670	NA	NA	NA	-8,77
		<i>HSFB2b</i>	Zm00001eb037600	NA	-3,66	NA	-3,07
	Sinteza tiamina	<i>TH11</i>	Zm00001eb356910	-3,34	5,23	NA	5,91
	Peroksidaze	<i>Zm00001eb009940</i>		NA	NA	NA	-6,01
		<i>Zm00001eb204960</i>		-4,11	NA	NA	NA
		<i>Zm00001eb410710</i>		NA	NA	NA	-3,53
<b>Interakcija sa lncRNK</b>	Transport šećera	<i>sweet</i>	Zm00001eb180830	NA	-4,74	NA	-3,73
	Rastenje i razviće	<i>gasa1</i>	Zm00001eb051810	NA	-2,75	NA	NA
		<i>pdf1</i>	Zm00001eb277660	NA	-3,25	NA	-4,09
		<i>EPFL6</i>	Zm00001eb121050	NA	-3,33	NA	NA
		<i>caspl</i>	Zm00001eb254440	NA	NA	-2,87	NA

#### 4.4.3.4 Funkcionalno obogaćivanje gena

Analiza genske ontologije je pokazala da su DE geni u najvećoj meri uključeni u biološke procese odgovora na abiotički stimulus i fotosintezu. DE geni obogaćeni za odgovor na abiotički stimulus su dalje podeljeni na one koje učestvuju u odgovor na svetlosni stimulus, temperaturni stimulus (visoke i niske temperature) i oksidativni stres (Slika 4.33). Diferencijalno eksprimirani geni funkcionalno obogaćeni za proces fotosinteze su dalje podeljeni na one koji učestvuju u prikupljanju svetlosti (u okviru fotosistema I i II) i svetlosnim reakcijama. Takođe, DE geni su obogaćeni za sledeće molekularne funkcije: vezivanje tetrapirola i hloroplasta, kao i oksidoreduktivna aktivnost. DE geni su pripadali sledećim ćelijskim komponentama: hloroplast i ekstracelularni region. Detaljan opis svih GO kategorija za biološke procese, molekularne funkcije i ćelijske komponente je prikazan u Prilogu 2.



**Slika 4.33 Analiza genske ontologije (GO) primenom analize prezastupljenosti (ORA) za GO kategoriju - Biološki proces.** Grafik prikazuje GO grupe za GO kategoriju Biološki proces i broj diferencijalno eksprimiranih (DE) gena koji im pripadaju. p-vrednost je prikazana u opsegu od 0.04 (obeleženo plavom bojom) do >0,01 (obeleženo crvenom bojom).

KEGG analiza je pokazala da su DE geni uključeni u nekoliko KEGG bioloških puteva: energetske metabolizam, adaptaciju na životnu sredinu i biosintezu sekundarnih metabolita. Detaljan opis svih KEGG kategorija za biološke puteve je prikazan u Prilogu 3.

#### 4.4.3.5. Obrasci koekspresije gena

Pronađeno je šest statistički značajnih ( $p < 0,05$ ) genskih modula vezanih za tretman niskim temperaturama: tri sa pozitivnom i tri sa negativnom korelacijom. Moduli 1, 2 i 4 su bili u pozitivnoj korelaciji sa tretmanom niskim temperaturama. Modul 1 je obuhvatao 1079, modul 2 169 i modul 4 495 gena čija je ekspresija imala statistički značajan efekat na asocijaciju sa ispitivanom osobinom. Sa druge strane, moduli 3, 5 i 6 su bili negativno korelisani sa tretmanom i obuhvatali su 45 gena u modulu 3, 534 u modulu 5 i 390 u modulu 6. Urađena je i GO analiza gena pojedinačnih modula. Geni modula 2, 5 i 6 nisu bili statistički značajno obogaćeni ni za jednu GO kategoriju. Geni modula 1 su učestvovali u translaciji, proteinskom i amidnom metabolizmu. Geni modula 3 i 4 su najviše bili obogaćeni za biološke procese organizacije nukleozoma i hromatina. Takođe, manji broj gena sva tri modula je bio obogaćen i za odgovor na nedostatak vode.

Kada su analizirani obrasci koekspresije vezani za samu liniju, odnosno tolerantnost ili osetljivost na niske temperature, identifikovano je pet statistički značajnih genskih modula. Međutim, samo dva su sadržala gene čija je ekspresija imala statistički značajan efekat na asocijaciju sa ispitivanom osobinom i oba su bila u pozitivnoj korelaciji sa tolerantnošću na niske temperature. Modul 1 je obuhvatao 23 gena, a modul 2 14 gena. Geni oba modula su bili obogaćeni za biološke procese odgovora na kisela hemijska jedinjenja, nedostatak vode i povećan nivo soli ( $p < 0,05$ ).

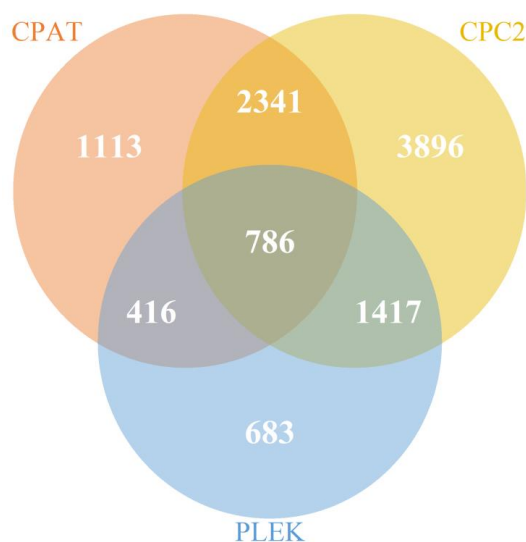
#### 4.4.4. Ekspresija lncRNK

Identifikacija lncRNK je započeta filtriranjem mapiranih i anotiranih asembliranih, transkripata (eng. *assembled transcripts*, AT), na osnovu dužine ( $> 200$  nt), nivoa ekspresije (FPKM  $> 0,1$ ), broja egzona ( $> 1$ ) i genomske pozicije (nekodirajući regioni), čime je dobijeno 24677 transkripata. Detaljan prikaz procesa filtriranja transkripata je prikazan u Tabeli 4.9. Transkripti su potom ispitani na nedostatak kodirajućeg potencijala primenom tri nezavisna alata: *CPC2*, *CPAT* i *PLEK*. Na osnovu rezultata dobijenih primenom bioinformatičkog alata *CPC2*, 8530 transkripata je pokazalo odsustvo kodirajućeg potencijala. Alat *CPAT* je pokazao da je taj broj 4656. *PLEK* alat omogućio je identifikovanje 3302 transkripta bez kodirajućeg potencijala. Za sve tri metode detektovano je 786 zajedničkih transkripata, i samo su oni uzeti kao pouzdano identifikovani lncRNK molekuli (Slika 4.34).

Tabela 4.9 Filtriranje potencijalnih dugih nekodirajućih, lncRNK transkripata.

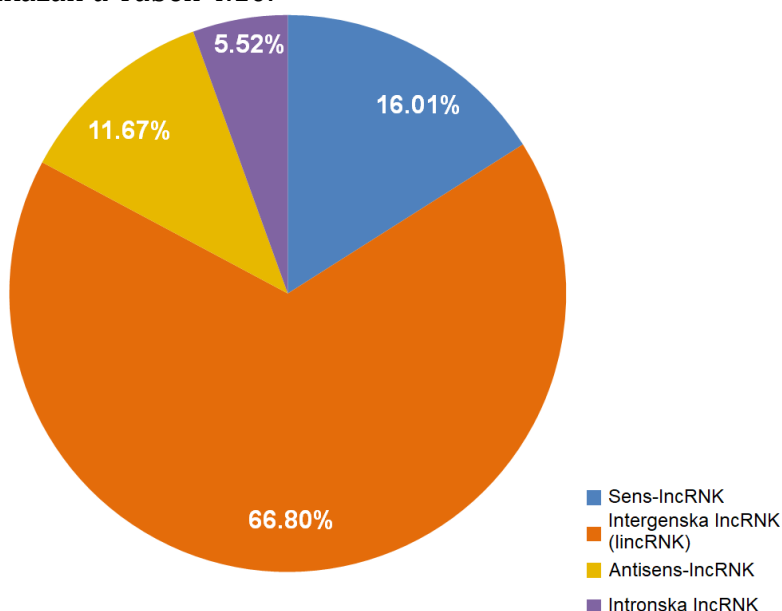
Uzorak	Broj AT	Broj sekvenci sa FPKM $> 0,1$ , broj egzona $> 1$	Broj sekvenci sa dužinom $> 200$ nt	Broj sekvenci sa dodeljenom klasnom oznakom	Broj sekvenci sa klasnom oznakom "u", "i", "o" i "x"
Ls-C-6	638825	288873	141753	92742	7226
Ls-C-24	632902	286396	140310	91535	6835
Ls-T-6	636533	286185	141175	92329	6942
Ls-T-24	634723	288593	140791	91644	5771
Lt-C-6	631193	282396	139008	91332	6241
Lt-C-24	640330	286145	142535	93982	7287
Lt-T-6	631361	283183	139123	91152	6035

<b>L<sub>T</sub>-T-24</b>	631121	286048	139957	91345	5816
<b>Ukupno</b>	<b>777,449</b>	/	/	<b>234,717</b>	<b>24,673</b>

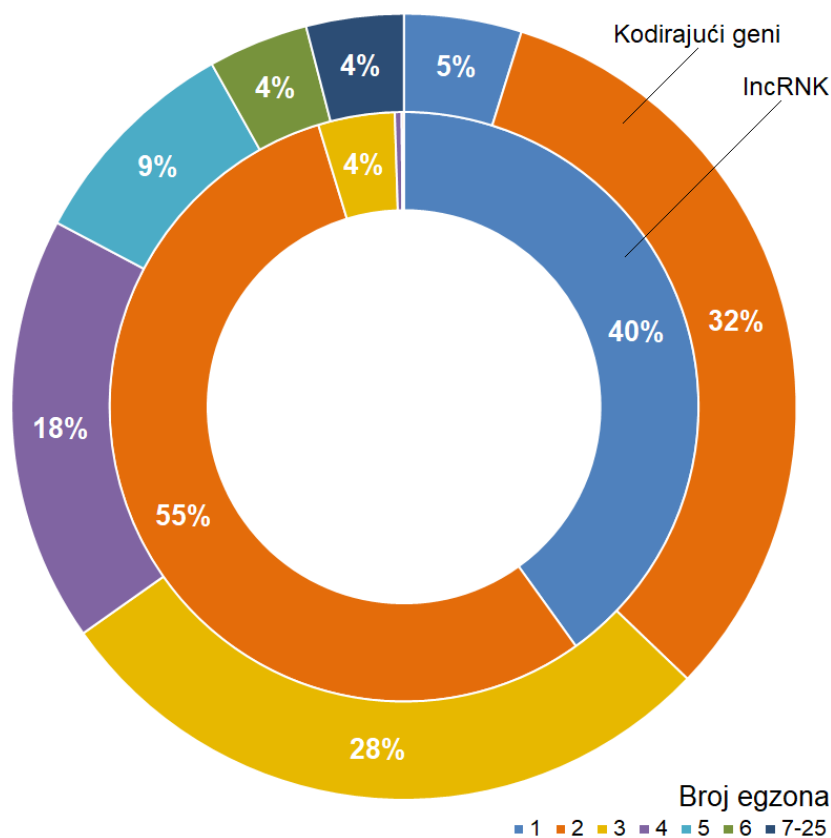


**Slika 4.34 Broj potencijalnih lncRNK transkripata primenom tri pristupa: CPAT, CPC2 i PLEK.** Potencijalne lncRNK identifikovane kroz tri različita pristupa: CPC2 (žuto), CPAT (narandžasto) i PLEK (plavo); i identifikovane lncRNK zajedničke za različita poređenja i sva tri pristupa.

Genomske pozicije identifikovanih lncRNK su potom poređene sa pozicijama kodirajućih gena, na osnovu čega je napravljena klasifikacija lncRNK na intergenske, „antisens“, „sens“ i intronske lncRNK (Slika 4.35). Intergenske lncRNK (lincRNK) činile su većinu lncRNK fragmenata. Utvrđeno je da 40,1% identifikovanih lncRNK ima jedan egzon, a 55,2% dva. Sa druge strane, procenat kodirajućih gena sa jednim ili dva egzona je bio 37,2%, a sa tri ili više 62,8%. Pored navedenog, lncRNK i kodirajući geni su se razlikovali i po dužini fragmenata (Slika 4.36). Što se tiče dužine kodirajućih i nekodirajućih gena, procenat fragmenata kraćih od 500 nt je bio sličan: 62,9% lncRNK i 54,4% iRNK. Razlike su uočene u zastupljenosti dužih fragmenata: 17,5% iRNK je bilo > 1000 nt, dok je taj procenat za lncRNK bio 4,2%. Opseg dužina kodirajućih gena i lncRNK je prikazan u Tabeli 4.10.



**Slika 4.35 Klasifikacija lncRNK i njihova zastupljenost.**

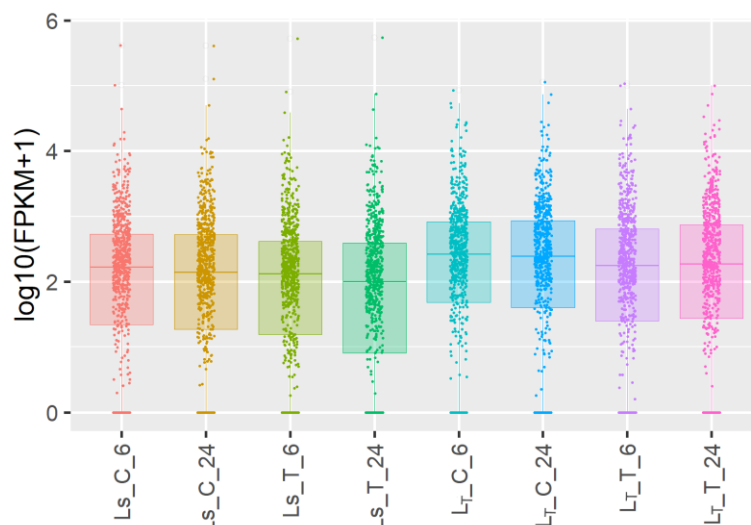


Slika 4.36 Poređenje kodirajućih i lncRNK gena na osnovu broja egzona.

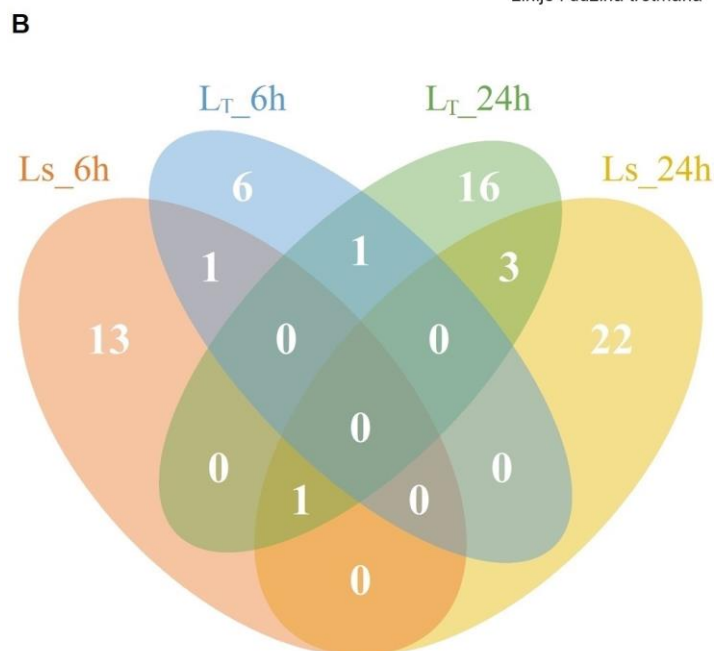
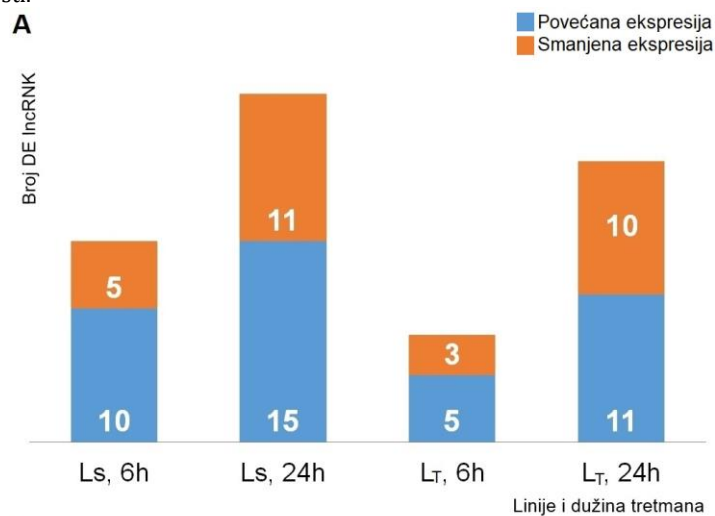
Tabela 4.10 Poređenje kodirajućih i lncRNK gena na osnovu na osnovu dužine.

Dužina (nt)	lncRNK (%)	iRNK (%)
100-200	0	0,34
200-300	24,85	25,67
300-400	22,15	15,85
400-500	15,90	12,57
500-600	11,42	9,28
600-700	8,33	6,90
700-800	6,10	5,07
800-900	3,09	3,84
900-1000	3,94	3,01
>1000	4,24	17,46

Kvantifikacija identifikovanih lncRNK je urađena pomoću *htseq* alata, dok je analiza diferencijalne ekspresije urađena uz pomoć *edgeR* R-paketa. Kao rezultati kvantifikacije dobijene su RC i FPKM vrednosti prikazane na Slici 4.37. Detektovano je 63 DE lncRNK između kontrole i tretmana u oba genotipa i vremenske tačke (Slika 4.38.A). Za razliku od gena, nijedna lncRNK nije bila zajednička za sve uzorke, pri čemu je više od polovine detektovano samo u jednom poređenju (nakon 6h ili 24h). Kod oba genotipa je detektovana diferencijalna ekspresija lncRNK XLOC\_000175 nakon 6h stresa, odnosno XLOC\_001043, XLOC\_006714, XLOC\_015129 i XLOC\_016664 nakon 24h stresa. Diferencijalna ekspresija u obe vremenske tačke je utvrđena za lncRNK XLOC\_016664 kod L<sub>s</sub>, a za XLOC\_009752 kod L<sub>T</sub> (Slika 4.38.B). Vrednosti promene ekspresije ovih lncRNK su prikazane u Tabeli 4.11.



**Slika 4.37** Distribucija FPKM vrednosti duge nekodirajuće, lncRNK po uzorcima. Distribucija FPKM vrednosti je prikazana preko  $\log_{10}(FPKM+1)$  vrednosti.



**Slika 4.38** Diferencijalno eksprimirane duge nekodirajuće, lncRNK po uzorcima. **A.** Broj diferencijalno eksprimiranih (DE) lncRNK između kontrolnih i tretiranih uzoraka obe linije (Ls, Lt) i vremenske tačke (6h i 24h). Geni sa povećanom ekspresijom u

tretmanu su prikazani plavom bojom, a sa smanjenom narandžastom. **B.** DE lncRNK specifične za samo jedno poređenje (Ls\_6h, Ls\_24h, Lt\_6h, Lt\_24h) ili zajedničke za više njih. DE geni nakon 6h kod linije Ls su prikazani narandžastom bojom (Ls\_6h), a nakon 24h žutom (Ls\_24h). DE geni nakon 6h kod linije L<sub>T</sub> su prikazani plavom (Lt\_6h), a oni nakon 24h zelenom bojom (Lt\_24h).

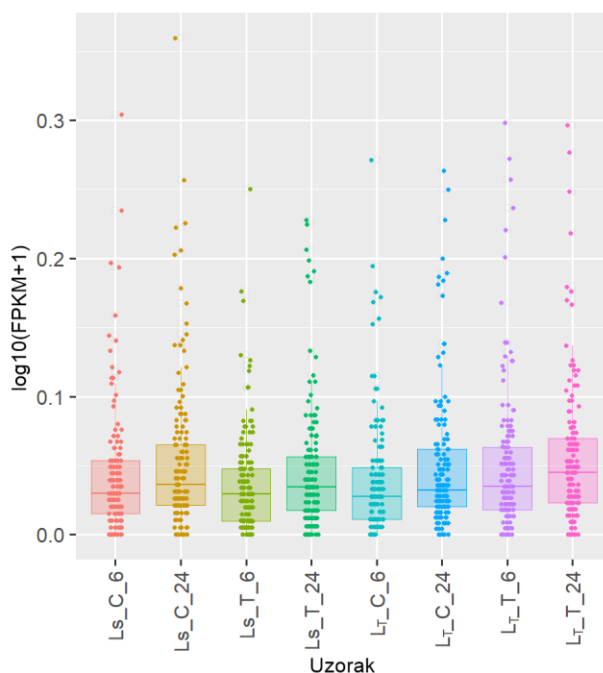
WGCNA analizom je identifikovan jedan modul sa 41 lncRNK čija je ekspresija značajno vezana za tretman niskim temperaturama ( $p < 0,05$ ). Među njima, samo osam je bilo DE (XLOC\_000816, XLOC\_001043, XLOC\_008440, XLOC\_009662, XLOC\_010836, XLOC\_011976, XLOC\_012259, XLOC\_016214).

**Tabela 4.11 Zajedničke diferencijalno eksprimirane (DE) lncRNK i njihova promena ekspresije (FC) u ispitana četiri poređenja.** Prikazane lncRNK su zajedničke za ispitana poređenja ili po liniji, ili vremenskoj tački u kojoj su diferencijalno eksprimirane (DE). Promena ekspresije (FC) ovih gena je prikazana kao log<sub>2</sub> vrednost (log<sub>2</sub>FC).

lncRNK	FC - Ls, 6h	FC - Ls, 24h	FC - L <sub>T</sub> , 6h	FC - L <sub>T</sub> , 24h
XLOC_016664	-4,32	3,68	NA	6,20
XLOC_000175	2,28	NA	2,12	NA
XLOC_006714	NA	4,68	NA	11,65
XLOC_015129	NA	3,08	NA	2,88
XLOC_001043	NA	3,83	NA	2,38
XLOC_009752	NA	NA	4,04	2,56

#### 4.4.5. Ekspresija circRNK

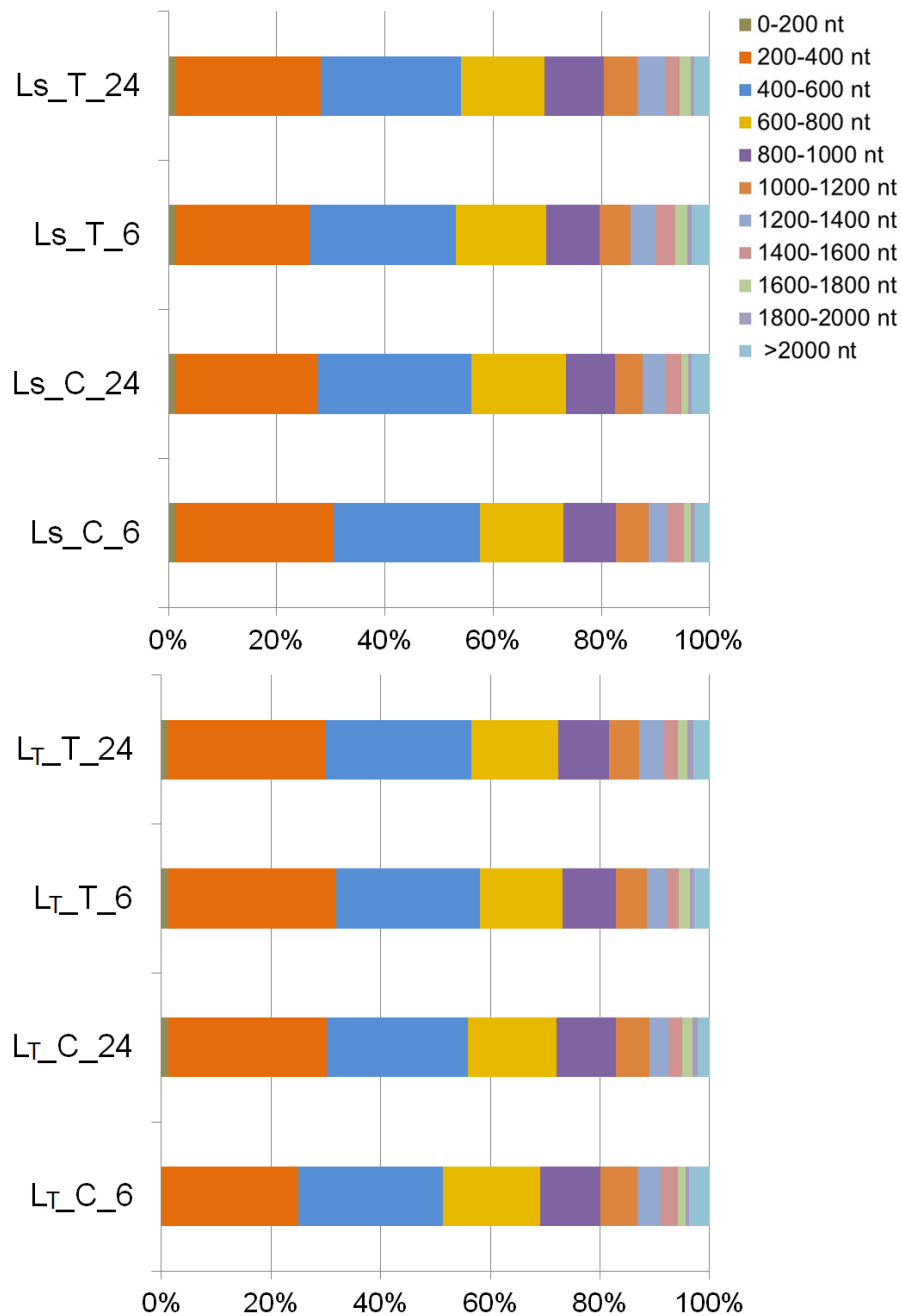
Detekcija i identifikacija cirkularnih RNK je urađena pomoću bioinformatičkog alata *CIRCexplorer2*, u procesu koji je uključivao: poravnanje i raščlanjivanje specifičnih circRNK spojnih sekvenci, *de novo* sklapanje circRNK transkripata i karakterizaciju oba tipa alternativnih BS mesta. Na ovaj način identifikovano je 6951 circRNK molekula. Međutim, nakon izvršene kvantifikacije, uočeno je da se većina circRNK transkripata odlikuje veoma niskim nivoom ekspresije – ≈91% je imalo ukupan nivo ekspresije FPKM < 0,1, što znači da su bile prisutne sa manje od 10 sekvenci u svih osam uzoraka. Radi obezbeđivanja pouzdanih rezultata, sve circRNK sa ovako niskim nivoom ekspresije su isključene, a za dalje analize je ostavljeno 135 identifikovanih circRNK molekula sa FPKM vrednostima > 0,1 u svim uzorcima za dalje analize (Slika 4.39).



**Slika 4.39 Distribucija FPKM vrednosti circRNK po uzorcima.** Distribucija FPKM vrednosti je prikazana preko  $\log_{10}(FPKM+1)$  vrednosti.

Identifikovane circRNK su većinom ( $\approx 68\%$ ) bile dužine 200-800 nt, dok je samo  $\approx 1\%$  bio kraći od 200 nt. Sekvence duže od 800 nt činile su skoro trećinu ( $\approx 27\%$ ) svih identifikovanih sekvenci. Među njima, više od pola je bilo dužine 800-1200 nt, dok su ostale kategorije dužine imale manji udeo (Slika 4.40).

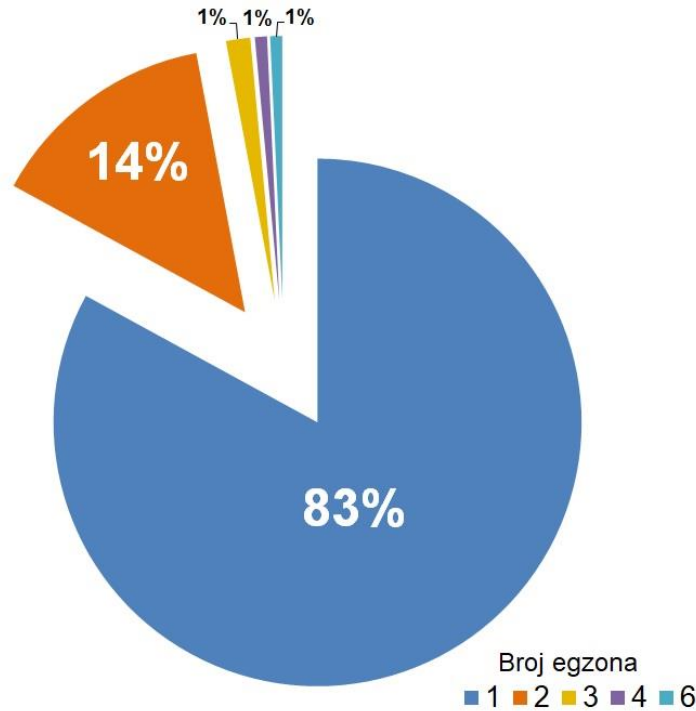
Egzonske circRNK su činile skoro polovinu svih identifikovanih circRNK molekula – 46,94%. Intronske i intergenske circRNK su bile prisutne sa 32,43%, odnosno 20,63%. Identifikovane circRNK su većinom ( $\approx 83\%$ ) sadržale samo jedan egzon, dok su one sa dva egzona činile  $\approx 14\%$  (Slika 4.41).



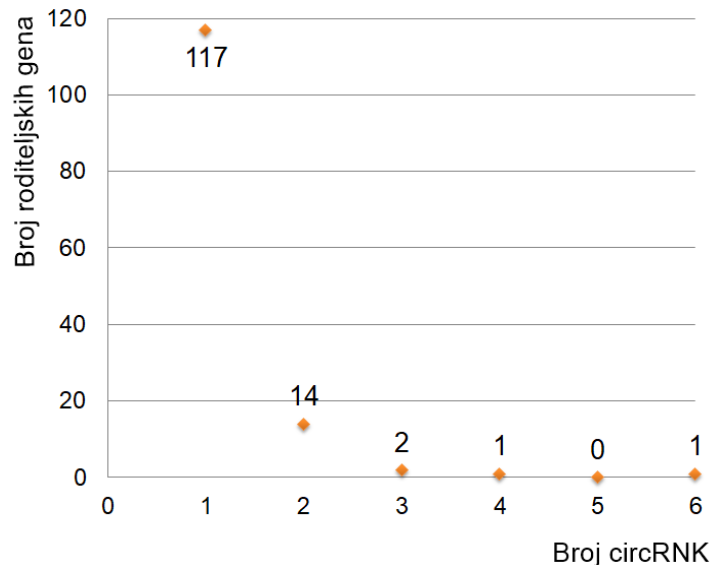
Slika 4.40 Distribucija circRNK različitih dužina među ispitanim uzorcima.

Specifično za circRNK jeste postojanje alternativnih mesta spajanja reverzne orijentacije, odnosno BS mesta, pomoću kojih jedan gen može proizvesti više circRNK koje dele isto BS mesto.

Među identifikovanim circRNK, kod 21 je identifikovano i alternativno 5' i alternativno 3' BS mesto. Među sekvencama 16 circRNK pronađena su samo alternativna 5' mesta, a kod 18 alternativna 3' mesta. Ipak, ukupno 86,67% circRNK sekvenci je vodilo poreklo od jednog roditeljskog gena. Jedan roditeljski gen je rezultovao sa dve odvojene circRNK u 10,37% slučajeva, dok su tri circRNK poticale od jednog roditeljskog gena samo u 1,48% slučajeva (Slika 4.42). Dva gena su bila odgovorna za više od tri circRNK izoforme. Gen Zm00001eb224050 je odgovoran za četiri različite circRNK sekvence, a gen Zm00001eb420520 za šest.



Slika 4.41 Procenat circRNK sa različitim brojem egzona.



Slika 4.42 Odnos broja roditeljskih gena i broja circRNK za koje su odgovorni. Na x-osi je naveden broj circRNK poreklom od jednog roditeljskog gena: 1-6. Na y-osi je naveden broj roditeljskih gena.

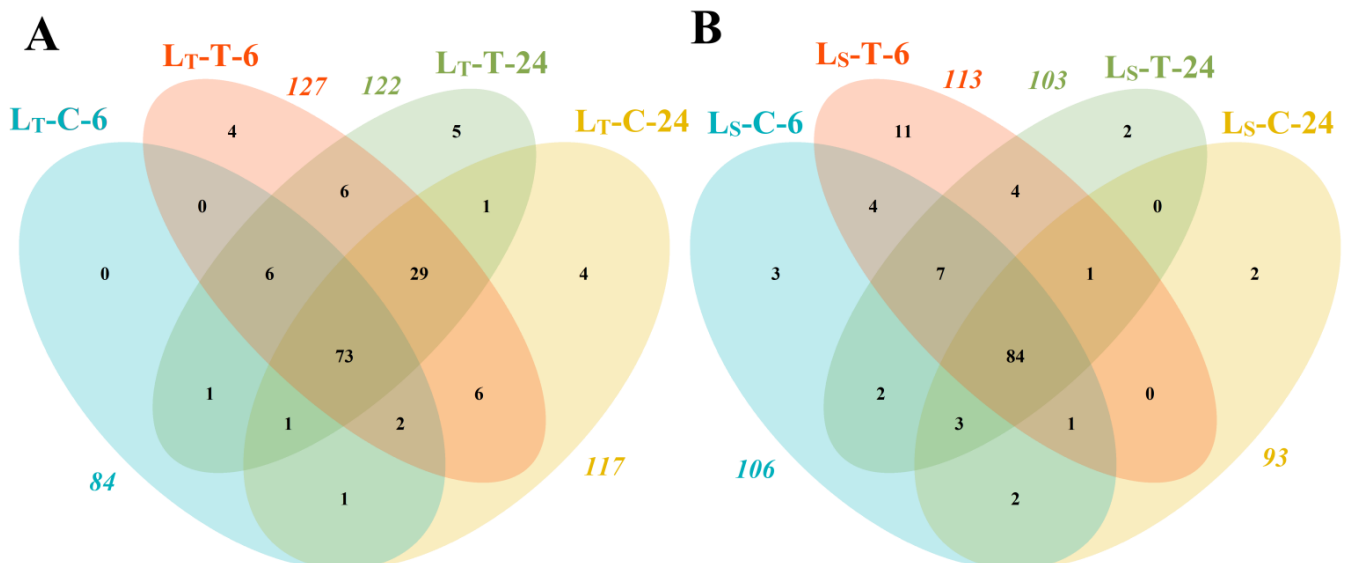
Analizirana je i diferencijalna ekspresija između circRNK prisutnih u kontrolnim i tretiranim uzorcima obe linije i obe vremenske tačke. Međutim, nije pronađena nijedna statistički značajna diferencijalno eksprimirana circRNK između kontrole i tretmana, odnosno nijedna

circRNK nije bila uključena u odgovor na stres izazvan NT ni kod tolerantnog ni osetljivog genotipa. Statistički značajne razlike su detektovane samo ukoliko su se poredili nivoi ekspresije između linija u istim uslovima (C-6, C-24, T-6, T-24). Dve circRNK su pokazale razlike u obrascima ekspresije kod linija  $L_S$  i  $L_T$ . *bna\_circ\_1342* je pokazala šest puta veću ekspresiju kod osetljivog genotipa u odnosu na tolerantan, i u kontrolnim i u uslovima tretmana. Sličan trend je uočen i kod *bna\_circ\_1094*, koja je u uslovima tretmana nakon 6 i nakon 24h pokazala pet puta veću ekspresiju kod  $L_S$ .

#### 4.4.6. Ekspresija miRNK

##### 4.4.6.1. Identifikacija poznatih miRNK

Već poznate, očuvane miRNK su identifikovane poređenjem sRNK transkripata dužine 18-31 nt, sa već poznatim i registrovanim miRNK iz *miRBase* baze podataka. Pronađeno je ukupno 145 miRNK anotiranih u *miRBase* bazi, koje su članovi 30 miRNK familija. Raspodela identifikovanih poznatih miRNK među osam ispitanih uzoraka, kao i zajedničke i jedinstvene miRNK su prikazane na Slici 4.43. Poznate miRNK familije zastupljene sa najvećim brojem članova bile su miR166 i miR171 sa 12 članova, kao i miR156, miR164, i miR169 sa po 11 članova.



**Slika 4.43 Raspodela poznatih miRNK između tretmana i linija, odnosno ispitanih uzoraka. A** Poznate miRNK identifikovane kod linije  $L_T$ , u uslovima tretmana i kontrole, nakon 6 i 24h. **B** Poznate miRNK identifikovane kod linije  $L_S$ , u uslovima tretmana i kontrole, nakon 6 i 24h.

Ukupno 68 miRNK je bilo zastupljeno u svih osam uzoraka, i u najvećem broju pripadnici miR156 (*zma-miR156a-3p*, *zma-miR156d-3p*, *zma-miR156d-5p*, *zma-miR156e-3p*, *zma-miR156h-3p*, *zma-miR156k-5p* i *zma-miR156l-3p*) i miR159 (*zma-miR159a-3p*, *zma-miR159a-5p*, *zma-miR159c-3p*, *zma-miR159c-5p*, *zma-miR159e-3p*, *zma-miR159f-5p* i *zma-miR159h-3p*) familija. Među identifikovanim poznatim miRNK, 14 je bilo jedinstveno za tretman niskim temperaturama, i od tih nijedna miRNK nije bila zajednička za oba genotipa. mikroRNK specifične za tretman niskim temperaturama su prikazane na Tabeli 4.12.

Identifikovane miRNK su takođe poređene sa miRNK detektovanim i kod drugih organizama. Nije uočeno nijedno poklapanje sa miRNK identifikovanim kod virusa, bakterija, ni životinja, ali su članovi 25 miRNK familija pronađeni i kod drugih biljnih vrsta. Najzastupljeniji su bili članovi miRNK familija miR171, miR169, i miR395 sa preko deset poklapanja sa više od 35 biljnih vrsta. Najviše podudarnosti je bilo sa vrstama *Oryza sativa* (103), *Glycine max* (97),

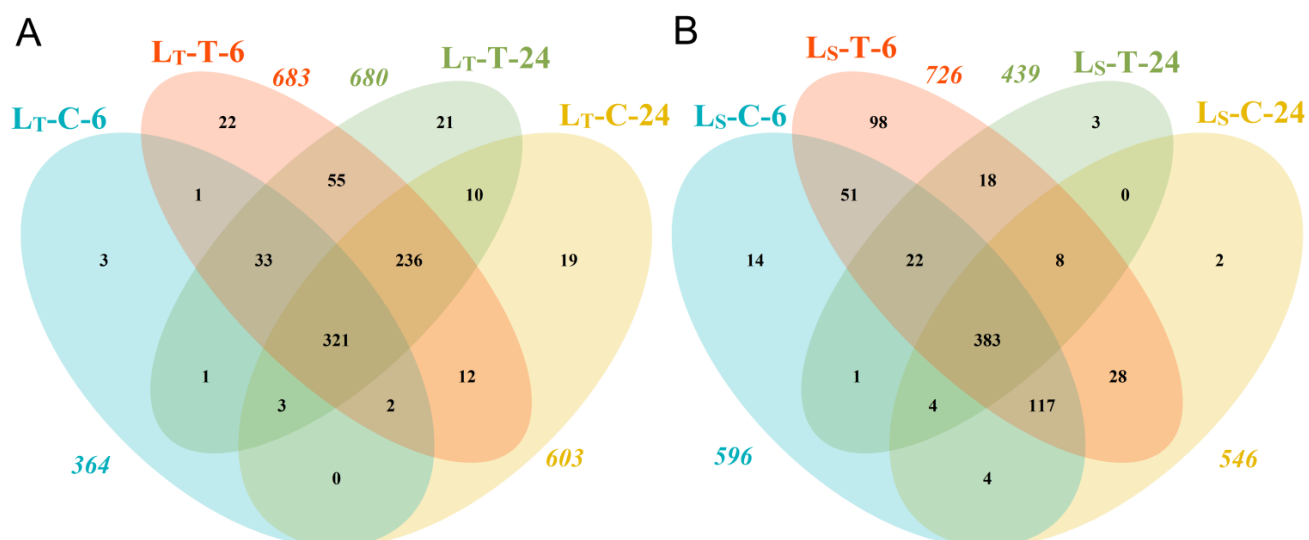
*Populus trichocarpa* (92), *Malus domestica* (91), i *Sorghum bicolor* (90). mikroRNK sa najvećim brojem podudaranja među biljnim vrstama su bile: miR156a (40), miR166a (37), miR156b (36). Podudaranja su pronađena i među drugim vaskularnim biljkama, poput likofite *Selaginella moellendorffii* (12 miRNK poreklom iz šest familija) i briofite *Physcomitrella patens* (43 miRNK poreklom iz osam familija).

**Tabela 4.12 miRNK specifične za uzorke tretirane niskim temperaturama.** miRNK koje nisu identifikovane u kontrolnim uzorcima, već samo tretiranim (L<sub>T</sub>-T-6, L<sub>T</sub>-T-24, L<sub>S</sub>-T-6 i L<sub>S</sub>-T-24). Ukoliko je miRNK pronađena u uzorku obeležena je sa +, u suprotnom sa -.

miRNK	L <sub>T</sub> -T-6	L <sub>T</sub> -T-24	L <sub>S</sub> -T-6	L <sub>S</sub> -T-24
zma-miR159e-3p	+	-	-	-
zma-miR167d-3p	-	+	-	-
zma-miR167j-3p	+	+	+	-
zma-miR169c-5p	+	+	+	-
zma-miR169o-3p	-	+	-	-
zma-miR169o-5p	+	-	+	-
zma-miR171c-3p	+	+	-	-
zma-miR2275a-5p	-	+	+	-
zma-miR2275b-3p	-	+	-	-
zma-miR393b-3p	+	+	+	-
zma-miR395n-5p	+	-	-	-
zma-miR399a-5p	+	-	-	-
zma-miR399b-3p	-	-	-	+
zma-miR399h-5p	-	-	+	-

#### 4.4.6.2. Identifikacija potencijalno novih miRNK

Predikcija potencijalno novih miRNK nakon odvajanja od ostalih sRNK transkripata (rRNK, tRNK, snRNK i snoRNK) urađena je pomoću *miREvo* i *miRDeep2* alata. Na ovaj način je identifikovano 876 potencijalno novih miRNK sa visokom pouzdanošću. Među njima, 124 su identifikovane samo u tolerantnoj liniji, a 137 samo u osetljivoj. Kod L<sub>T</sub>, 324 potencijalno novih miRNK su bile prisutne u sva četiri uzorka, a to se isto može reći za 386 miRNK kod linije L<sub>S</sub>. Raspodela identifikovanih potencijalno novih miRNK među osam ispitanih uzoraka, kao i zajedničke i jedinstvene miRNK su prikazane na Slici 4.44. Među identifikovanim potencijalno novim miRNK, u svih osam uzoraka je detektovano 150 mikroRNK. Takođe, od 189 sekvenci pronađenih samo u tretiranim uzorcima, 24 je bilo zajedničko za oba genotipa (Tabela 4.13). Analiza pristrasnosti nukleotida na prvoj poziciji u potencijalno novim miRNK sekvencama je pokazala da je prvi nukleotid najčešće bio adenin, dok druge pristrasnosti položaja nisu bile izražene.



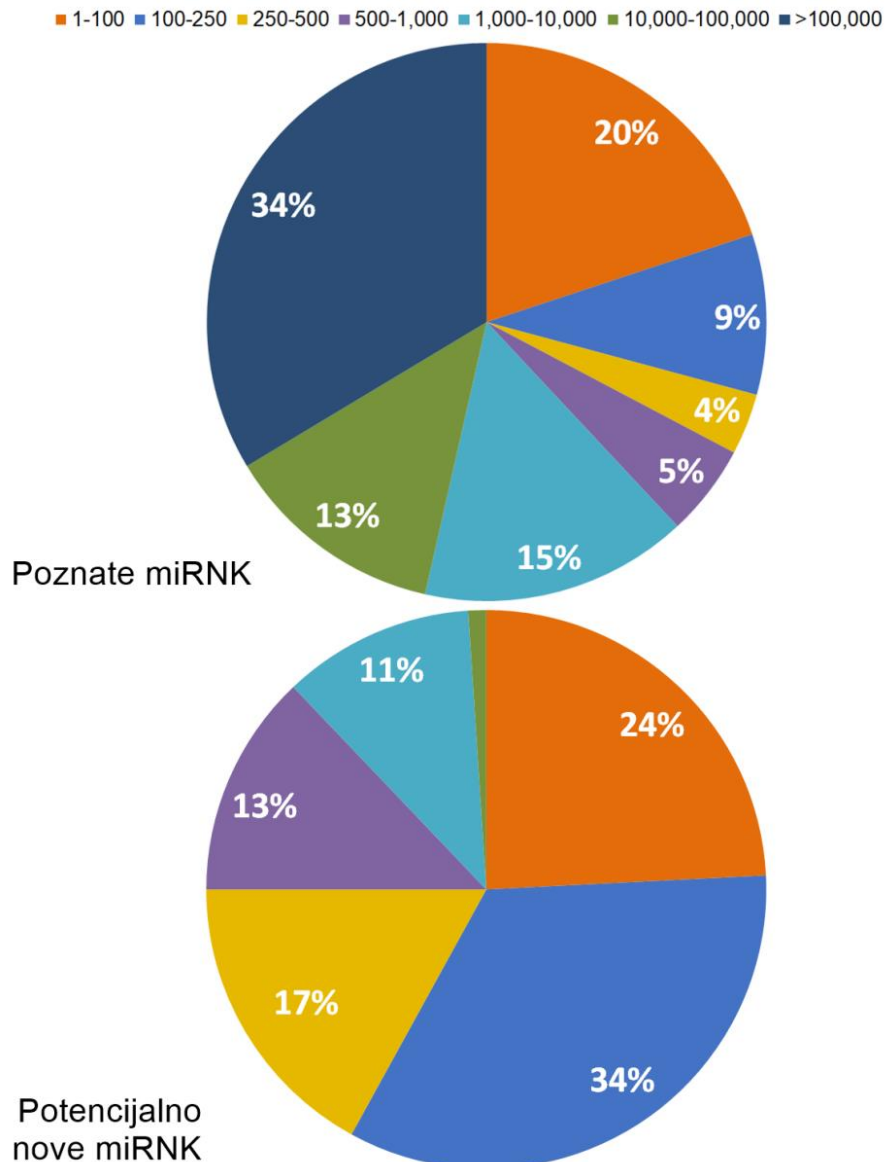
**Slika 4.44 Raspodela potencijalno novih miRNK između tretmana i linija, odnosno ispitivanih uzoraka. A** Potencijalno nove miRNK identifikovane kod linije  $L_T$ , u uslovima tretmana i kontrole, nakon 6 i 24h. **B** Potencijalno nove miRNK identifikovane kod linije  $L_S$ , u uslovima tretmana i kontrole, nakon 6 i 24h.

**Tabela 4.13 Zajedničke potencijalno nove miRNK specifične za uzorke tretirane niskim temperaturama.** Navedene potencijalno nove miRNK nisu identifikovane u kontrolnim uzorcima, već samo tretiranim ( $L_T$ -T-6,  $L_T$ -T-24,  $L_S$ -T-6 i  $L_S$ -T-24), pronađene kod obe linije. Ukoliko je miRNK pronađena u uzorku obeležena je sa +, u suprotnom sa -.

miRNK	$L_T$ -T-6	$L_T$ -T-24	$L_S$ -T-6	$L_S$ -T-24
novel_178	+	+	+	-
novel_234	+	+	+	-
novel_260	+	+	+	+
novel_283	+	+	+	-
novel_286	+	+	+	+
novel_302	-	+	+	-
novel_307	+	+	+	-
novel_426	+	+	+	-
novel_700	+	+	+	-
novel_749	+	-	+	-
novel_804	+	+	+	-
novel_817	+	+	+	-
novel_847	+	+	+	+
novel_850	+	+	+	-
novel_863	+	+	+	-
novel_887	+	+	+	-
novel_889	+	+	+	-
novel_898	+	+	+	-
novel_943	+	+	+	-
novel_944	+	+	+	-
novel_960	+	+	+	-
novel_974	+	+	+	-
novel_988	+	+	+	-
novel_997	+	+	+	-

#### 4.4.6.3. Kvantifikacija identifikovanih miRNK

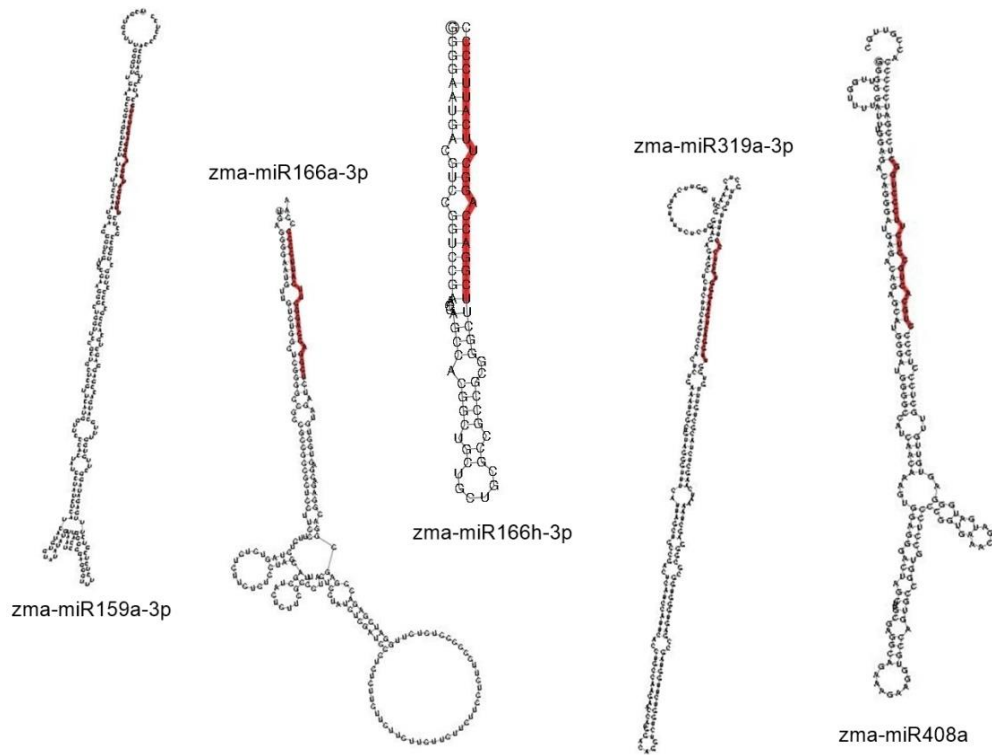
Kvantifikacija već poznatih i potencijalno novih miRNK je urađena tokom njihove identifikacije primenom *miRDeep2* alata. Rezultati su izraženi kao TPM vrednosti. Poznate miRNK su se odlikovale značajno većim TPM vrednostima od potencijalno novih: u proseku, TPM vrednosti za pojedinačne poznate miRNK za sve uzorke bile su  $\approx 50000$ , dok su za potencijalno nove miRNK bile  $\approx 650$ . Distribucija TPM vrednosti već poznatih i potencijalno novih miRNK u svim uzorcima je prikazana na Slici 4.45. Među poznatim miRNK, najveći udeo (34%) su činile one sa vrednostima TPM  $>100000$ , dok je više od polovine imalo vrednosti TPM veće od 10,000. Potencijalno nove miRNK su se odlikovale nižim nivoima ekspresije od poznatih i skoro 60% je bilo zastupljeno sa TPM vrednošću  $<250$ .



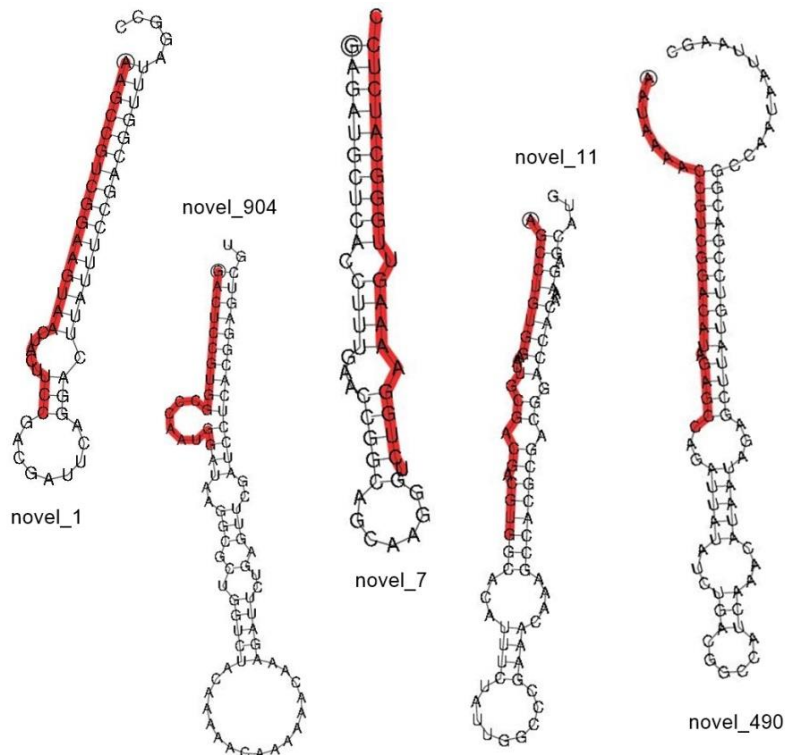
Slika 4.45 Distribucija TPM vrednosti poznatih i potencijalno novih miRNK u svih osam uzoraka. Vrednosti procentualne zastupljenosti miRNK za poznate miRNK su prikazane na gornjem grafiku, a za potencijalno nove na donjem.

Najzastupljenija poznata miRNK bila je *zma-miR159a-3p* sa ukupnom TPM vrednošću za svih osam uzoraka većom od tri miliona. Zatim slede *zma-miR166a-3p* i *zma-miR166h-3p* sa  $\approx 850000$  TPM, odnosno *zma-miR319a-3p* i *zma-miR408a* sa  $\approx 450000$  TPM. Sekundarne strukture najzastupljenijih poznatih miRNK su prikazane na Slici 4.46. Sa druge strane,

potencijalno nova miRNK sa najvećom ukupnom TPM vrednosti za svih osam uzoraka bila je novel\_1 sa TPM vrednošću  $\approx 30,000$ . Potencijalno nova miRNK novel\_904 se odlikovala sa TPM vrednošću  $\approx 20000$ , a novel\_490, novel\_11 i novel\_7 sa TPM vrednošću  $\approx 15000$ . Sekundarne strukture najzastupljenijih potencijalno novih miRNK su prikazane na Slici 4.47.



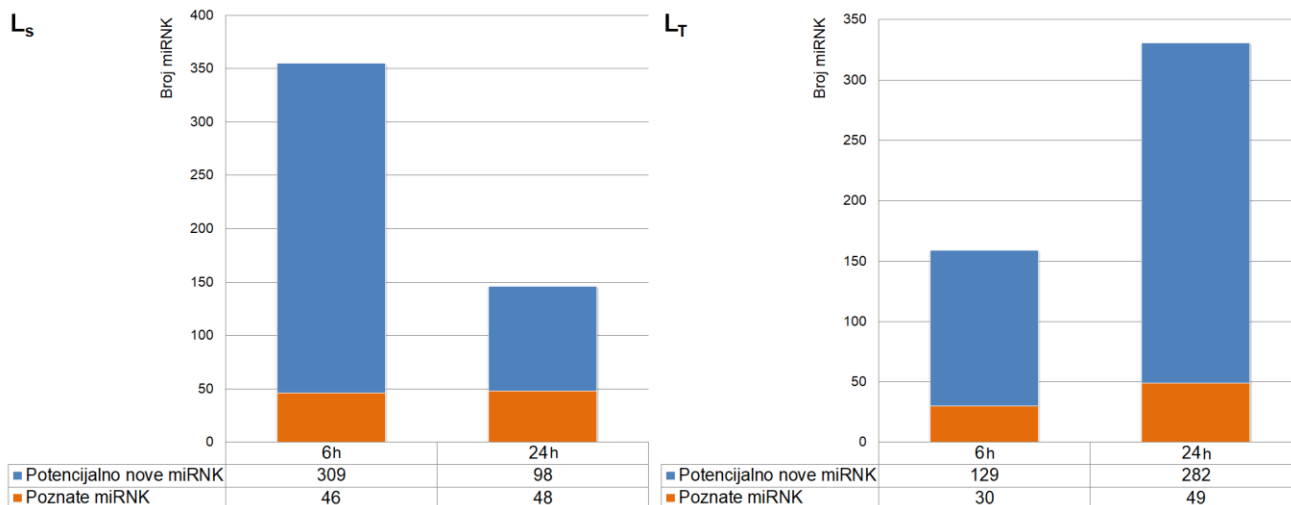
Slika 4.46 Sekundarne strukture najzastupljenijih poznatih miRNK.



Slika 4.47 Sekundarne strukture najzastupljenijih potencijalno novih miRNK.

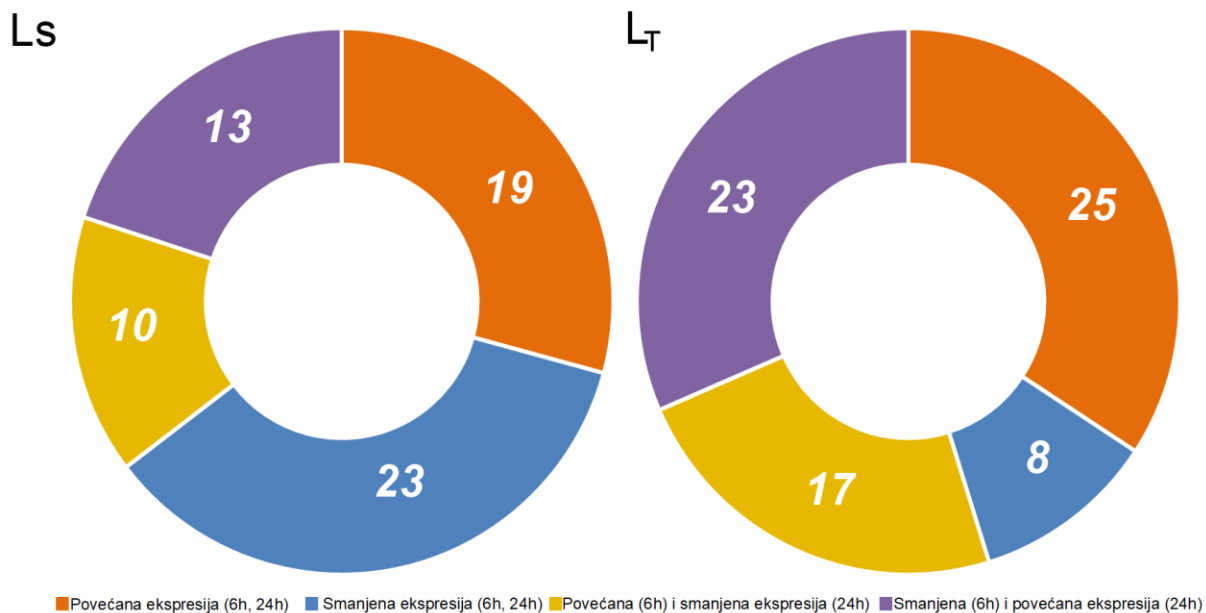
#### 4.4.6.4. Diferencijalno eksprimirane miRNK

Analiza diferencijalne ekspresije miRNK je urađena na 933 miRNK sa ekspresijom TPM >5 –119 poznatih i 814 potencijalno novih miRNK. Rezultati su pokazali da je 649 miRNK diferencijalno eksprimirano između kontrolnih i tretiranih uzoraka: 89 poznatih i 560 potencijalno novih miRNK. Kod linije L<sub>S</sub>, pronađeno je 436 DE miRNK – 355 nakon 6h i 146 nakon 24h tretmana, a kod linije L<sub>T</sub> 417 DE miRNK – 159 nakon 6h i 331 nakon 24h tretmana (Slika 4.48).



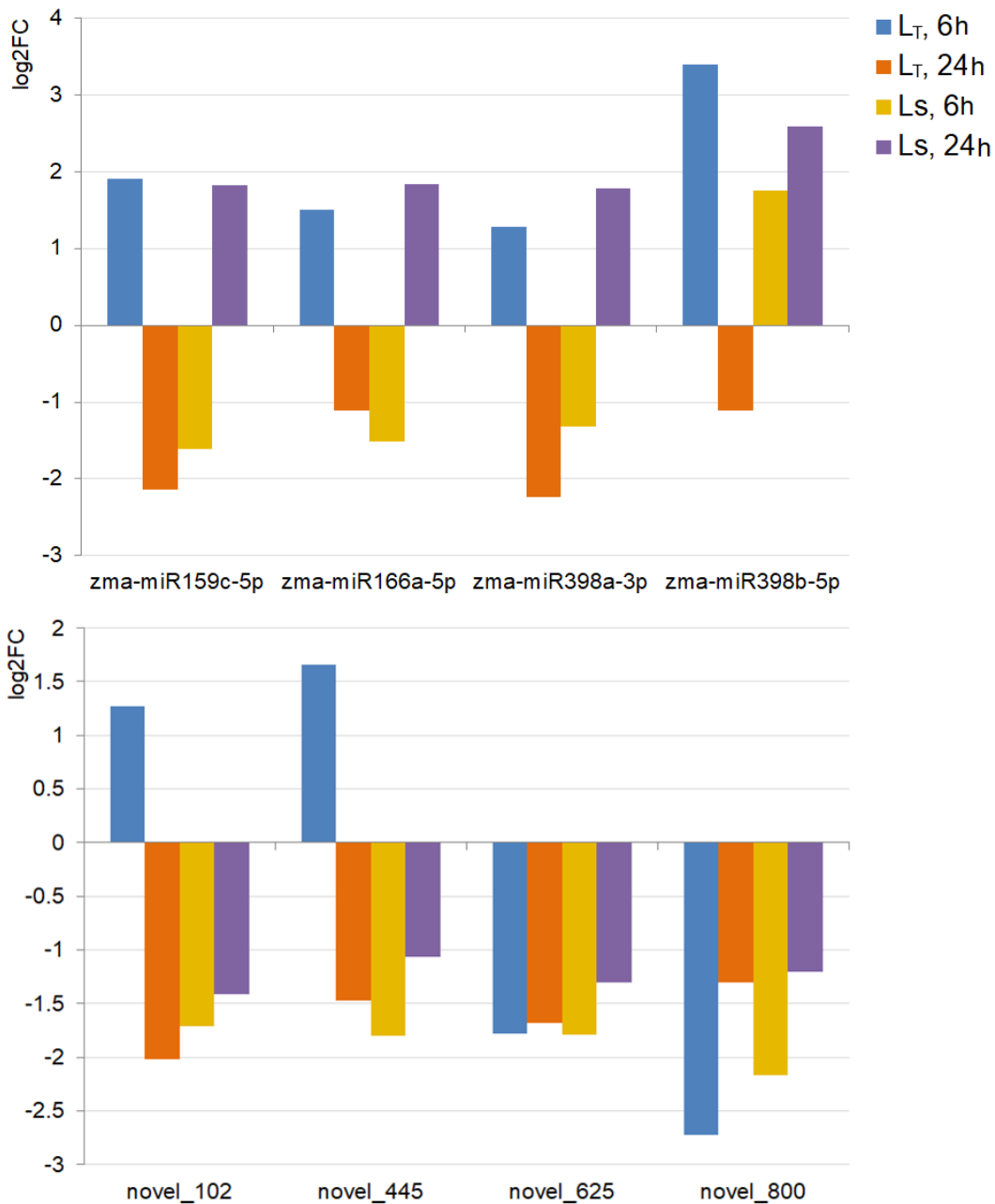
Slika 4.48 Diferencijalno eksprimirane (DE) miRNK kod linija L<sub>S</sub> i L<sub>T</sub>.

Među DE miRNK kod L<sub>S</sub>, 65 miRNK su bile zajedničke za obe vremenske tačke. Od toga, 42 miRNK su pokazale iste obrasce ekspresije i nakon 6 i nakon 24h, dok su 23 miRNK imale suprotne obrasce ekspresije (Slika 4.49). Kod L<sub>T</sub>, od 73 DE miRNK zajedničkih za obe vremenske tačke, manje od polovine je pratilo iste obrasce ekspresije u obe vremenske tačke (33 DE miRNK), dok je 40 DE miRNK imalo suprotne ekspresione obrasce u dve vremenske tačke (Slika 4.49).



Slika 4.49 Obrasce ekspresije diferencijalno eksprimiranih (DE) miRNK zajedničkih za obe vremenske tačke (6 i 24h) kod linija L<sub>S</sub> i L<sub>T</sub>. Sa leve strane su prikazane DE miRNK za liniju L<sub>S</sub>, a sa desne za liniju L<sub>T</sub>.

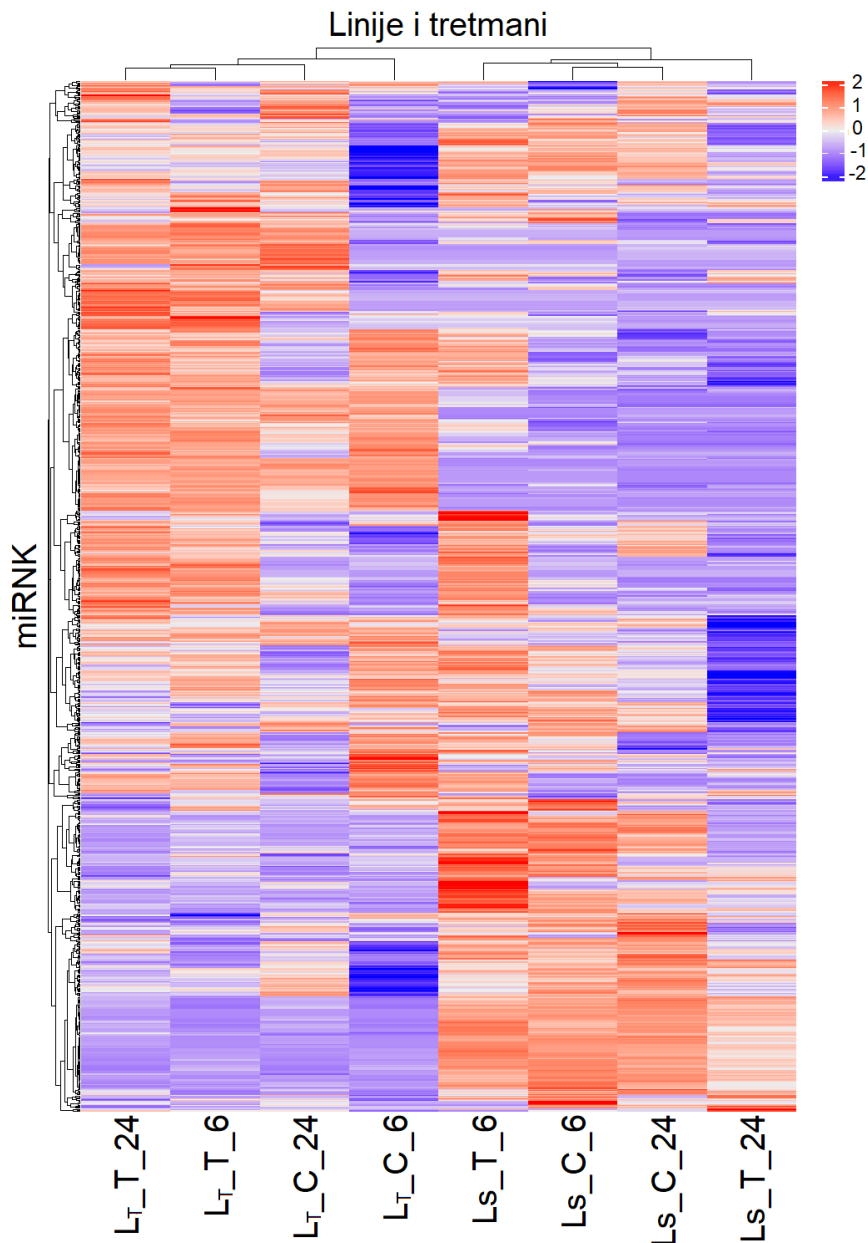
Od 459 miRNK DE nakon 6h tretmana niskim temperaturama u obe linije, 55 je bilo zajedničko i za  $L_S$  i  $L_T$ . Polovina (28 DE miRNK) je pratila isti obrazac ekspresije u oba genotipa: detektovano je 18 DE miRNK sa povećanom ekspresijom i 10 sa smanjenom. Sa druge strane, 12 miRNK je imalo povećanu ekspresiju kod  $L_T$ , dok je kod linije  $L_S$  bila smanjena. Ekspresija 15 miRNK je bila povećana kod linije  $L_S$  nakon 6h, a smanjena kod linije  $L_T$ . Kada je reč o miRNK DE nakon 24h, od 426 miRNK, 51 je bila zajednička za obe linije. Većina zajedničkih DE miRNK je pokazala iste obrasce ekspresije i kod  $L_S$  i kod  $L_T$ : 12 sa povećanom i 19 sa smanjenom ekspresijom nakon 24h. Sveukupno, osam DE miRNK je bilo zajedničko za sve četiri tačke poređenja ( $L_T$ , 6h;  $L_T$ , 24h;  $L_S$ , 6h;  $L_S$ , 24h): zma-miR159c-5p, zma-miR166a-5p, zma-miR398a-3p, zma-miR398b-5p, novel\_102, novel\_445, novel\_625, i novel\_800 (Slika 4.50). Obrasci ekspresije istaknutih miRNK su detaljno prikazani u Prilogu 4.



Slika 4.50 Zajedničke diferencijalno eksprimirane (DE) miRNK za obe vremenske tačke (6 i 24h) i obe linije ( $L_S$  i  $L_T$ ).

#### 4.4.6.5. Hijerarhijska analiza grupisanja miRNK

HCA analiza miRNK je urađena korišćenjem TPM vrednosti, pomoću *cluster* R paketa. Sklonost ga grupisanju identifikovanih 1012 već poznatih i potencijalno novih miRNK (TPM>5) je proverena Hopkinsovom statističkom metodom. Vrednost H je bila 0,978, što je ukazivalo da tendencija ka grupisanju postoji. Potom su formirane Pirsonove matrice distanci i urađena je AGNES analiza sa Vordovom metodom minimalne varijanse. Dobijena hit-mapa i dendrogram su prikazani na Slici 4.51.



**Slika 4.51 Hijerarhijska analiza grupisanja (HCA) identifikovanih miRNK.** Boja svakog polja na hitmapi prikazuje određenu, normalizovanu, skaliranu TPM vrednost u opsegu od -2 (plava boja), preko 0 (bela boja) do 2 (crvena boja).

Rezultati AGNES-HCA analize na osnovu ekspresije miRNK su pokazali da se, za razliku od grupisanja na osnovu gena, ispitani uzorci prvo grupišu prema linijama. Nakon toga, unutar jedne linije grupisanje se vršilo na osnovu eksperimentalnih uslova (tip – kontrola i tretman; dužina izlaganja – 6h ili 24h).

#### 4.4.7. Interakcije između različitih klasa RNK

Uloge nekodirajućih RNK u regulaciji ekspresije kodirajućih RNK, samim tim i odgovarajućih gena, su istraživane tokom dugog perioda i u brojnim istraživanjima, tako da je veliki broj mehanizama kojim se regulacija uspostavlja dobro poznat. Mreže interakcije lncRNK/circRNK-miRNK-iRNK mogu biti formirane na osnovu pojedinačnih interakcija između RNK (miRNK-iRNK, miRNK-lncRNK, miRNK-circRNK i lncRNK-iRNK), pa ih je neophodno prvo predvideti i definisati.

##### 4.4.7.1. Interakcije između miRNK i drugih klasa RNK

Rezultati analize su pokazali da 1822 gena sadrži potencijalna mesta vezivanja za identifikovane miRNK. Od 145 identifikovanih poznatih miRNK, 138 se potencijalno vezuje i reguliše ekspresiju 678 ciljnih gena. Sa druge strane, 440 novih miRNK potencijalno utiče na 1241 ciljni gen. Manji broj ciljnih gena, svega 69 je regulisano od strane i poznatih i potencijalno novih miRNK. Na primer, gen *TGA1* (Zm00001eb175150), koji kodira SBP transkripcioni faktor koji je verovatno uključen u domestifikaciju kukuruza, je prema predikciji interakcija regulisan od strane sledećih miRNK: zma-miR156d-5p, zma-miR156j-5p, zma-miR156k-5p, zma-miR529-5p i novel\_898. Od identifikovanih miRNK koje potencijalno imaju uticaj na ekspresiju 1822 gena, 329 je bilo diferencijalno eksprimirano između kontrole i tretmana u nekoj od vremenskih tačaka i linija: 75 poznatih miRNK i 254 potencijalno novih. Prema GO analizi, ciljni geni navedenih DE miRNK su bili uključeni u različite procese: rastenje i razviće (germinacija, razvoj korenova, razvoj listova, održavanje meristema, cirkadijalni ritam), proteinski metabolizam (sinteza aminokiselina, sinteza proteina, degradacija proteina), sekundarni metabolizam (sinteza terpenskih jedinjenja, sinteza fenolnih jedinjenja), kao i odgovor na stres. Mnogi ciljni geni su kodirali transkripcione faktore uključene u odgovor na abiotičke faktore stresa: HSF, faktori regulacije rastenja (eng. *growth regulating factors*, GRF), ERF (eng. *ethylene responsive factors*, ERF), WRKY, HOX, MYB, bZIP. Takođe, mnogi ciljni geni su bili uključeni u signalnu transdukciju tokom odgovora na stres: CRK (eng. *cysteine-rich protein kinases*, CRKs), SAPK (eng. *serine/threonine protein kinases*, SAPKs), kalcijum-zavisni jonski transporteri, univerzalni proteini stresa, USP.

U ovom istraživanju je ustanovljeno da je mali broj ciljnih gena bio diferencijalno eksprimiran – svega 27, od čega je samo sedam bilo DE u istoj vremenskoj tački i liniji kad i miRNK (Tabela 4.14). Ovih sedam gena se odlikovalo obrascima ekspresije suprotnim od miRNK sa kojim interaguju, ukazujući na moguću ulogu ovih miRNK u utišavanju ekspresije tih ciljnih gena. Dve potencijalno nove miRNK su prema predikciji miRNK-interakcija uticale na ekspresiju nekoliko već spomenutih gena, neophodnih za normalno odvijanje Kalvinovog ciklusa. Smanjenje ekspresije novel\_452 je imalo pozitivan efekat na ekspresiju *rbcx2* (Zm00001eb212460), dok je miRNK novel\_696 negativno uticala na ekspresiju *prk* (Zm00001eb188120). Takođe, miRNK su bile direktno uključene u regulaciju odgovora na abiotički stres: nivo ekspresije zma-miR164a-3p je povećan posle 24 sata u L<sub>s</sub>, a ekspresija predviđenog ciljnog gena, *HSFBa* (Zm00001eb428800) je značajno smanjena. Ostali ciljni geni imaju samo preliminarne anotacije u *Uniprot* bazi podataka, ili nisu potpuno okarakterisani.

**Tabela 4.14 miRNK i njihovi ciljni geni.** U tabeli su prikazane sve poznate i potencijalno nove miRNK čiji ciljni geni pokazuju suprotne obrasce ekspresije. Za svaku vremensku tačku i liniju su prikazane miRNK i vrednost (log<sub>2</sub>FC) i Statistička značajnost (q-vrednost) diferencijalne ekspresije, kao i ciljni gen i njihova log<sub>2</sub>FC vrednost i Statistička značajnost diferencijalne ekspresije.

	miRNK	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost	Gen	ID gena	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost
L <sub>s</sub> , 6h	novel_452	-1,4633	0,0033	<i>rbcx2</i>	Zm00001eb212460	2,9686	0,0041

	zma-miR156e-3p	4,2736	7,24 E <sup>-33</sup>	/	Zm00001eb325290	-4,1478	0,0008
<b>Ls, 24h</b>	novel_447	-1,0358	9,91 E <sup>-27</sup>	/	Zm00001eb065620	2,9399	0,0069
	zma-miR164a-3p	2,8002	3,78 E <sup>-87</sup>	HSFBA	Zm00001eb428800	-3,8162	4,12 E <sup>-05</sup>
	zma-miR444a	2,4812	1,33 E <sup>-37</sup>	/	Zm00001eb253580	-2,9744	0,0019
<b>Lr, 24h</b>	novel_696	1,0322	6,69 E <sup>-25</sup>	prk	Zm00001eb188120	-4,4660	0,0004
	novel_725	3,1903	5,45 E <sup>-13</sup>	/	Zm00001eb240340	-3,5093	0,0024

Kada je reč o miRNK-lncRNK interakcijama, pronađeno je sedam ciljnih lncRNK, čiju ekspresiju potencijalno reguliše devet miRNK (Tabela 4.15). Ipak, nijedan od miRNK-lncRNK parova nije bio DE u istim vremenskim tačkama, što je onemogućilo donošenje bilo kakvih zaključaka o regulaciji ekspresije lncRNK od strane miRNK.

**Tabela 4.15 miRNK i njihove ciljne lncRNK** U tabeli su prikazane sve poznate i potencijalno nove miRNK i ciljne lncRNK sa odgovarajućim mestom vezivanja prema alatu *PsRobot*, kao i ocena dodeljena od strane programa.

miRNK	lncRNK	psRobot ocena
zma-miR159a-3p	XLOC_002394	3
zma-miR166k-5p	XLOC_009553	3
zma-miR169f-5p	XLOC_010450	2,5
zma-miR169i-3p	XLOC_010450	1,5
zma-miR169p-5p	XLOC_010450	3
zma-miR169i-3p	XLOC_005314	3
zma-miR394a-5p	XLOC_015305	2,5
zma-miR169i-5p	XLOC_010450	2,5
novel_208	XLOC_002835	4,5
novel_904	XLOC_001373	5

Pronađeno je 11 ciljnih circRNK, potencijalno regulisanih od strane 11 miRNK. Međutim, s obzirom da nijedna identifikovana circRNK nije bila diferencijalno eksprimirana, ove interakcije nisu razmatrane za dalje analize (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16 miRNK i njihove ciljne circRNK** U tabeli su prikazane sve poznate miRNK i ciljne circRNK sa odgovarajućim mestom vezivanja prema alatu *PsRobot*, kao i ID roditeljskog transkripta circRNK i ocena dodeljena od strane programa.

miRNK	circRNK	Roditeljski transkript	psRobot ocena
zma-miR164b-3p	bnacirc_1767	Zm00001eb290190_T001	4
zma-miR164f-5p	bnacirc_828	Zm00001eb147480_T006	4
zma-miR166j-5p	bnacirc_872	Zm00001eb156600_T005	4
zma-miR167j-3p	bnacirc_374	Zm00001eb291750_T001	4
zma-miR169a-3p	bnacirc_824	Zm00001eb146550_T001	4
zma-miR169i-3p	bnacirc_824	Zm00001eb146550_T001	4
zma-miR169i-3p	bnacirc_1505	Zm00001eb336210_T001	3,5
zma-miR172c-5p	bnacirc_1166	Zm00001eb014960_T001	4
zma-miR172c-5p	bnacirc_1166	Zm00001eb014960_T002	4
zma-miR399b-3p	bnacirc_24	Zm00001eb411670_T002	4
zma-miR399b-3p	bnacirc_24	Zm00001eb411670_T003	4
zma-miR399b-3p	bnacirc_24	Zm00001eb411670_T001	4
zma-miR399e-3p	bnacirc_487	Zm00001eb235200_T001	4
zma-miR444a	bnacirc_2298	Zm00001eb370170_T002	3,5
zma-miR444a	bnacirc_2298	Zm00001eb370170_T003	3,5

zma-miR444a	bnacirc_2298	Zm00001eb370170_T001	3,5
zma-miR444a	bnacirc_2298	Zm00001eb370170_T007	3,5
zma-miR444a	bnacirc_2298	Zm00001eb370170_T004	3,5
zma-miR827-3p	bnacirc_905	Zm00001eb161040_T001	4

#### 4.4.7.2. Interakcije između lncRNK i iRNK

Ciljne iRNK, odnosno geni, lncRNK molekula su identifikovani na dva načina. Potencijalni *cis*-ciljni geni su traženi 100 kb uzvodno i nizvodno od genomske lokacije svake lncRNK primenom bioinformatičkog alata *bedtools*, dok je predviđanje *trans*-ciljnih gena urađeno pomoću alata *LncTar*.

Pronađeno je ukupno 362 potencijalnih *cis*-ciljnih gena za 63 DE lncRNK, ali je samo njih pet bilo DE (Tabela 4.17). Kada je reč o L<sub>s</sub>, utvrđeno je da je ekspresija XLOC\_006594 povezana sa genom *tic32* (Zm00001eb420380), a XLOC\_015072 sa genom *sweet* (Zm00001eb180830). Kod L<sub>T</sub>, na ekspresiju gena *rca* (Zm00001eb164390) uticala je lncRNK XLOC\_016169. Geni Zm00001eb113210 i Zm00001eb069040 nisu okarakterisani u *Uniprot* bazi podataka.

**Tabela 4.17 lncRNK i njihovi *cis*-ciljni geni.** U tabeli su prikazane sve identifikovane diferencijalno eksprimirane (DE) lncRNK i njihovi DE *cis*-ciljni geni. Za svaku vremensku tačku i liniju su prikazane lncRNK i vrednost (log<sub>2</sub>FC) i statistička značajnost (q-vrednost) diferencijalne ekspresije, kao i ciljni gen i njihova log<sub>2</sub>FC vrednost i statistička značajnost diferencijalne ekspresije.

	lncRNK	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost	Gen	ID gena	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost
<b>L<sub>s</sub>, 24h</b>	XLOC_010836	-2,6523	0,0010	/	Zm00001eb113210	-3,1093	0,0099
	XLOC_006594	-4,1114	0,0003	<i>tic32</i>	Zm00001eb420380	-3,6724	0,0012
	XLOC_015072	-3,8489	0,0002	<i>sweet</i>	Zm00001eb180830	-4,7411	9,89 E <sup>-06</sup>
<b>L<sub>T</sub>, 24h</b>	XLOC_009238	-2,5908016	2,63 E <sup>-05</sup>	/	Zm00001eb069040	-2,7978	0,0067
	XLOC_016169	5,1649100	3,38 E <sup>-05</sup>	<i>rca</i>	Zm00001eb164390	-3,4400	0,0005

Takođe, identifikovano je 191 *trans*-ciljnih gena, potencijalno regulisanih od strane 22 DE lncRNK. Među njima, 61 *trans*-ciljnih gena je bilo DE u istoj liniji i vremenskoj tački kad i odgovarajuća lncRNK (Prilog 4). Više od polovine *trans*-ciljnih gena nije imalo karakterizaciju u *Uniprot* bazi podataka pa nije moguće doneti ikakve zaključke o tim interakcijama, dok su okarakterisani navedeni u Tabeli 4.18. Kod linije L<sub>s</sub>, pet lncRNK je potencijalno uticalo na ekspresiju 14 gena. Nakon šest sati tretmana na ekspresiju gena *elip2* (Zm00001eb301270) pozitivno su uticale XLOC\_002167 i XLOC\_006091. Takođe, nakon 24h lncRNK XLOC\_012259 i XLOC\_007807 su imale suprotan efekat na ekspresiju gena *gasa1* (Zm00001eb051810): ekspresija XLOC\_012259 je bila smanjena, a XLOC\_007807 povećana. Takođe, XLOC\_012388 je negativno uticala na ekspresiju ovog gena. Pored *gasa1*, lncRNK XLOC\_012388 je uticala na ekspresiju 13 drugih gena, uključujući *hsp* gene (Zm00001eb188750, Zm00001eb010530), gene bitne za rastenje i razviće (Zm00001eb277660, Zm00001eb121050, Zm00001eb039750), fotosintezu (Zm00001eb147750, Zm00001eb106430) i odgovor na biotički stres (Zm00001eb135130, Zm00001eb167700). Gen *elip2* je potencijalno regulisan i od strane XLOC\_016783 kod L<sub>T</sub>, nakon šest sati, dok je Zm00001eb254440 koji kodira CASPL protein (eng. *Casparian strip membrane protein like*) bio pod uticajem XLOC\_005947 nakon 24 sata stresa.

**Tabela 4.18 lncRNK i njihovi *trans*-ciljni geni.** U tabeli su prikazane sve identifikovane diferencijalno eksprimirane (DE) lncRNK i njihovi DE *trans*-ciljni geni. Za svaku vremensku tačku i liniju su prikazane lncRNK i vrednost (log<sub>2</sub>FC) i statistička značajnost (q-vrednost) diferencijalne ekspresije, kao i ciljni gen i njihova log<sub>2</sub>FC vrednost i statistička značajnost diferencijalne ekspresije.

	lncRNK	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost	Gen	ID gena	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost
--	--------	---------------------	------------	-----	---------	---------------------	------------

<b>Ls, 6h</b>	XLOC_002167	7,1917	0,00500	<i>elip2</i>	Zm00001eb301270	3,2412	0,00273
	XLOC_006091	7,5432	0,00149			3,2412	0,00273
<b>Ls, 24h</b>	XLOC_012259	-2,2612	0,00181	<i>gasa1</i>	Zm00001eb051810	-2,7479	0,00484
	XLOC_007807	1,8664	0,00489			-2,7479	0,00484
	XLOC_012388	2,2976	0,00022	<i>atl32</i>	Zm00001eb238440	-7,8754	0,00288
				<i>s17p</i>	Zm00001eb147750	-4,5197	0,00001
				<i>saur37</i>	Zm00001eb313920	-3,9480	0,00080
				<i>barw1</i>	Zm00001eb167700	-3,8506	0,00080
				<i>epfl6</i>	Zm00001eb121050	-3,3364	0,00526
				<i>psbQ1</i>	Zm00001eb106430	-3,2862	0,00038
				<i>pdf1</i>	Zm00001eb277660	-3,2426	0,00122
				<i>wi</i> homolog	Zm00001eb069320	-3,1354	0,00122
				<i>zfp2,4</i>	Zm00001eb039750	-3,0757	0,00594
				<i>hsp26</i>	Zm00001eb010530	-2,8960	0,00612
				<i>gasa1</i>	Zm00001eb051810	-2,7479	0,00484
				<i>bbd1</i> homolog	Zm00001eb135130	2,7864	0,00745
<i>hsp17</i>	Zm00001eb188750	9,2755	0,00001				
<b>Lr, 6h</b>	XLOC_016783	2,6020	0,00006	<i>elip2</i>	Zm00001eb301270	3,7815	0,00017
<b>Lr, 24h</b>	XLOC_005947	7,3671	0,00252	<i>caspl</i>	Zm00001eb254440	-2,8712	0,00735

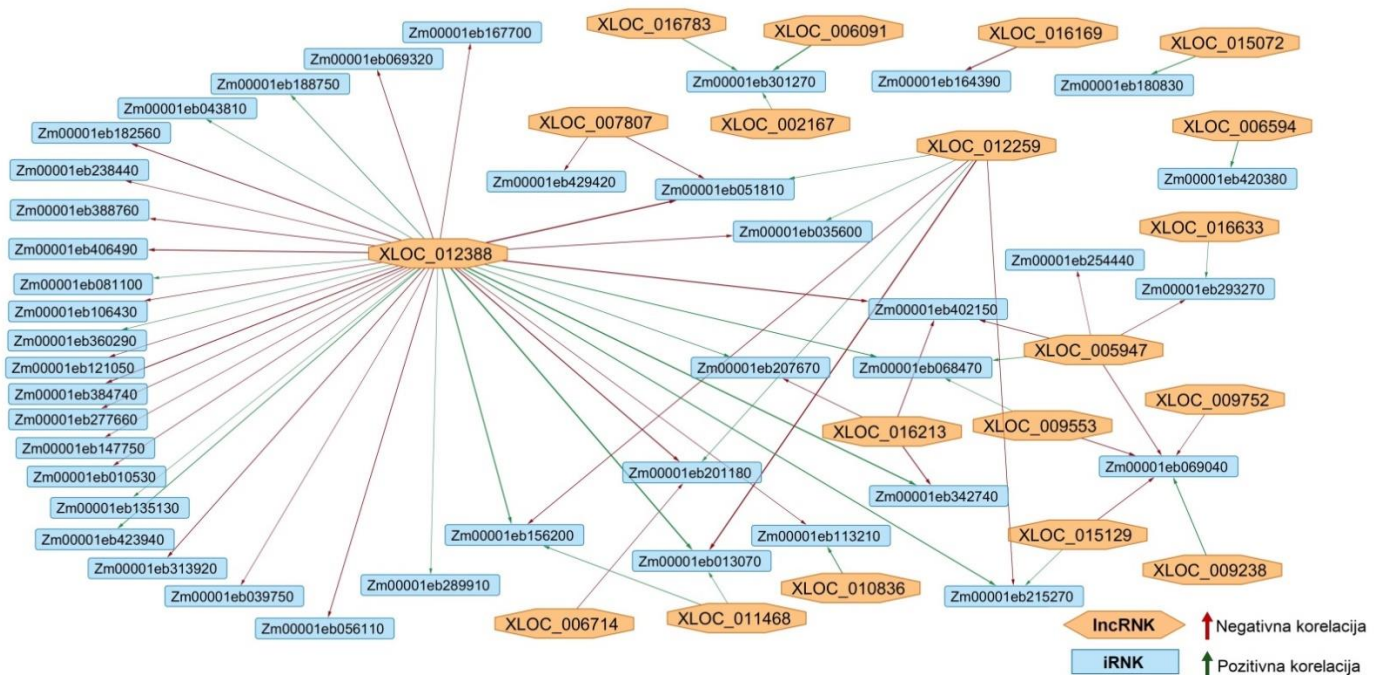
#### 4.4.7.3. Mreža interakcija

S obzirom da analize nisu pokazale postojanje DE ciljnih RNK – circRNK, kao i ciljnih lncRNK za odgovarajuće miRNK, jedini delovi mreže interakcija koji su mogli biti konstruisani su lncRNK-iRNK i miRNK-iRNK.

Kao što je već navedeno u poglavlju 4.4.7.1 *Interakcije između mikroRNK, miRNK i drugih klasa RNK*, pronađeno je sedam gena potencijalno regulisanih od strane sedam različitih miRNK (parovi miRNK i ciljnih gena: novel\_452-Zm00001eb212460, novel\_696-Zm00001eb188120, novel\_447-Zm00001eb065620, novel\_725-Zm00001eb240340, zma-miR164a-3p-Zm00001eb428800, zma-miR156e-3p-Zm00001eb325290, zma-miR444a-Zm00001eb253580). Pokazalo se da ovi miRNK-iRNK parovi nisu formirali nikakvu mrežu, već je svaki bio odvojeni entitet: nijedna miRNK nije uticala na ekspresiju više od jednog gena, niti je neki gen bio regulisan od strane više miRNK.

Sa druge strane, mreža interakcija lncRNK-iRNK je pokazala da je ekspresija 19 lncRNK u korelaciji sa 41 ciljnom iRNK (Slika 4.52). Među lncRNK-iRNK parovima, kod njih 30 je uočena pozitivna regulacija, odnosno povećana ekspresija lncRNK je rezultovala i povećanom ekspresijom ciljnog gena i suprotno. Sa druge strane, negativna regulacija je postojala kod njih 36, odnosno povećana ekspresija lncRNK je rezultovala smanjenom ekspresijom ciljnog gena i suprotno. lncRNK XLOC\_012388 je predstavljala glavno čvorište mreže i uticala je na ekspresiju najvećeg broja gena. Većina ovih ciljnih gena nije imala funkcionalne anotacije, ali oni koji su okarakterisani su uključeni u različite metaboličke i fiziološke procese. Nekoliko ciljnih gena XLOC\_012388 je kodiralo proteine neophodne za rastenje i razviće: *pdf1* gen koji kodira protodermalni faktor 1 neophodan za razvoj meristema (Zm00001eb277660), *epfl6* gen bitan za razvoj stomatalnih ćelija (Zm00001eb121050) i *zfp2.4* gen neophodan za razviće korenskih trihoma (Zm00001eb039750). Takođe, XLOC\_012388 je uključena u regulaciju fotosinteze preko gena *psbQ1* (Zm00001eb106430) i gena *s17p* (Zm00001eb147750), koji kodira hloroplastnu

sedoheptulozo-1,7-bisfosfatazu neophodnu za odvijanje Kalvinovog ciklusa. Navedena lncRNK reguliše i ekspresiju dva *hsp* gena: *hsp17* (Zm00001eb188750) i *hsp26* (Zm00001eb010530). Identifikovani su i geni regulisani od strane više lncRNK. Na primer, ekspresija *elip2* (Zm00001eb301270) je potencijalno regulisana od strane tri lncRNK: XLOC\_016783, XLOC\_002167 i XLOC\_006091. Takođe, pokazalo se da je *gasa1* (Zm00001eb051810) koji kodira protein regulisan giberelinom 1 (eng. *gibberellin-regulated protein 1*) bio pod uticajem tri lncRNK: XLOC\_012259, XLOC\_007807 i XLOC\_012388. Ipak, većina gena regulisana od strane više lncRNK, poput Zm00001eb069040, Zm00001eb215270, Zm00001eb293270, ili Zm00001eb156200, nije imala funkcionalnu karakterizaciju u Uniprot bazi podataka.



Slika 4.52 lncRNK-iRNK mreža interakcija. Čvorišta lncRNK su obeležena kao narandžasti rombovi, a ciljne iRNK kao plavi pravougaonici. Pozitivna korelacija između ekspresije lncRNK i iRNK prikazana je zelenom strelicom, dok je negativna prikazana crvenom.

## 4.5. Validacija rezultata sekvenciranja transkriptoma

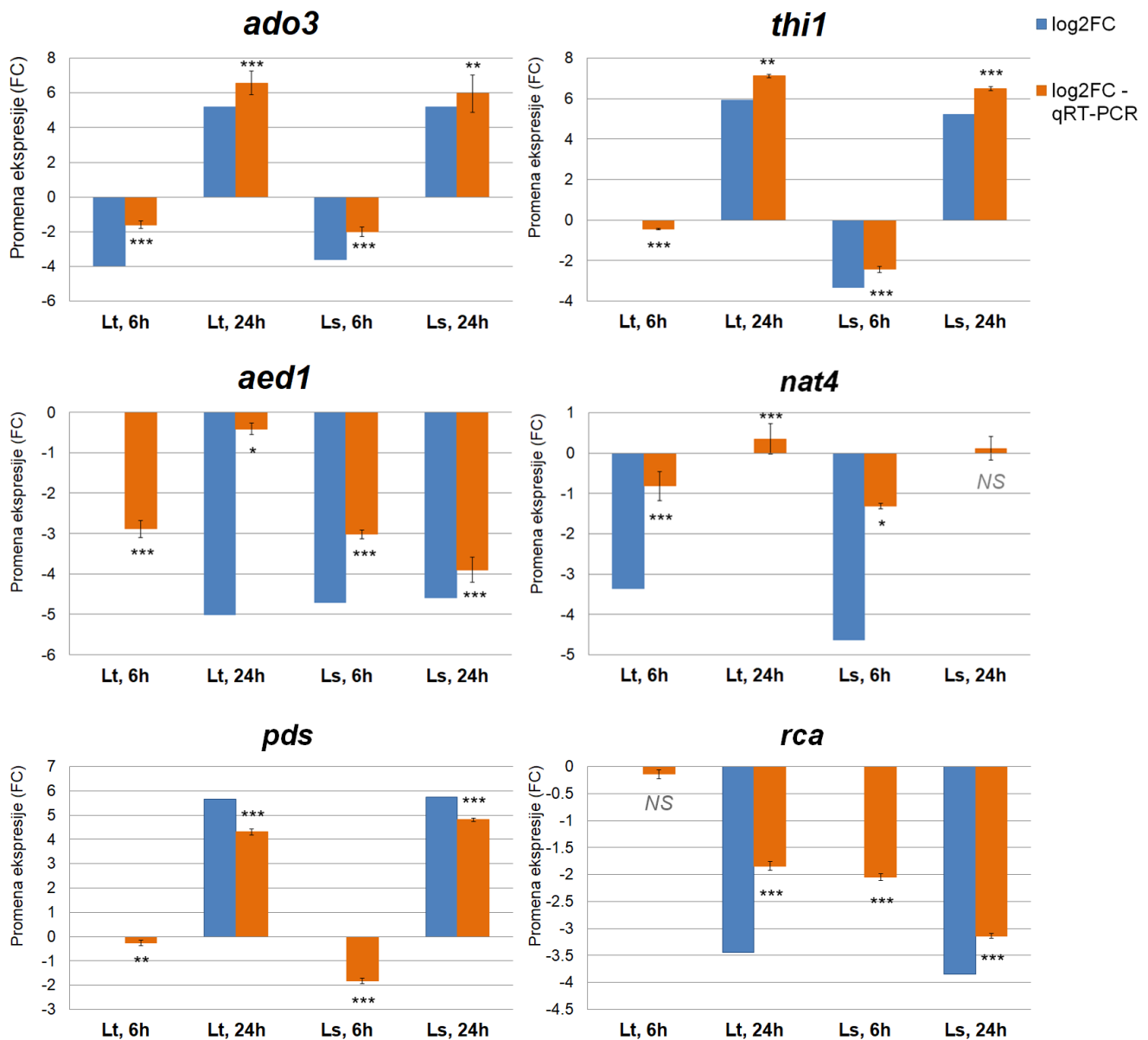
Izolovana i prečišćena RNK svih uzoraka je zadovoljavala sve prethodno definisane standarde kvaliteta i integriteta i iskorišćena je za sintezu cDNK. Sintaza cDNK iz istih uzoraka je izvršena više puta tokom validacije rezultata, i svaki put je uspešnost sinteze potvrđena kvalitativnom PCR reakcijom kojom je amplifikovan 26s rRNK gen i elektroforetskim razdvajanjem i vizuelizacijom fragmenta.

Validacija rezultata sekvenciranja je urađena primenom qRT-PCR metode umnožavanja šest DE gena, pet DE lncRNK i pet DE miRNK. Temperatura hibridizacije,  $T_H$ , prajmera za svaki od ovih gena i ncRNK je određena kvalitativnim PCR reakcijama. Izabrane  $T_H$  su prikazane u Prilogu 5. Efikasnost amplifikacije odabranih gena i ncRNK je proverena pre same analize ekspresije. Izračunate vrednosti koeficijenta efikasnosti amplifikacije su prikazani u Prilogu 6.

### 4.5.1. Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno eksprimiranih iRNK (gena)

Rezultati analize diferencijalne ekspresije iRNK, odnosno odgovarajućih gena, su potvrđeni qRT-PCR metodom, preko ekspresije šest DE gena: *ado3*, *thi1*, *aed1*, *nat4*, *pds*, *rca*; i prikazani na Slici 4.53. Generalno, obrasci ekspresije nakon validacije metodom qRT-PCR su se

poklapali sa obrascima dobijenim NGS sekvenciranjem i DE analizom, uz male razlike. Na primer, kod Lt-6h, promene u ekspresiji *aed1* i *thi1* su detektovane qRT-PCR metodom, ali ne i sekvenciranjem. Ipak, svaka promena ekspresije predviđena DE analizom na osnovu rezultata sekvenciranja je potvrđena i qRT-PCR analizom.

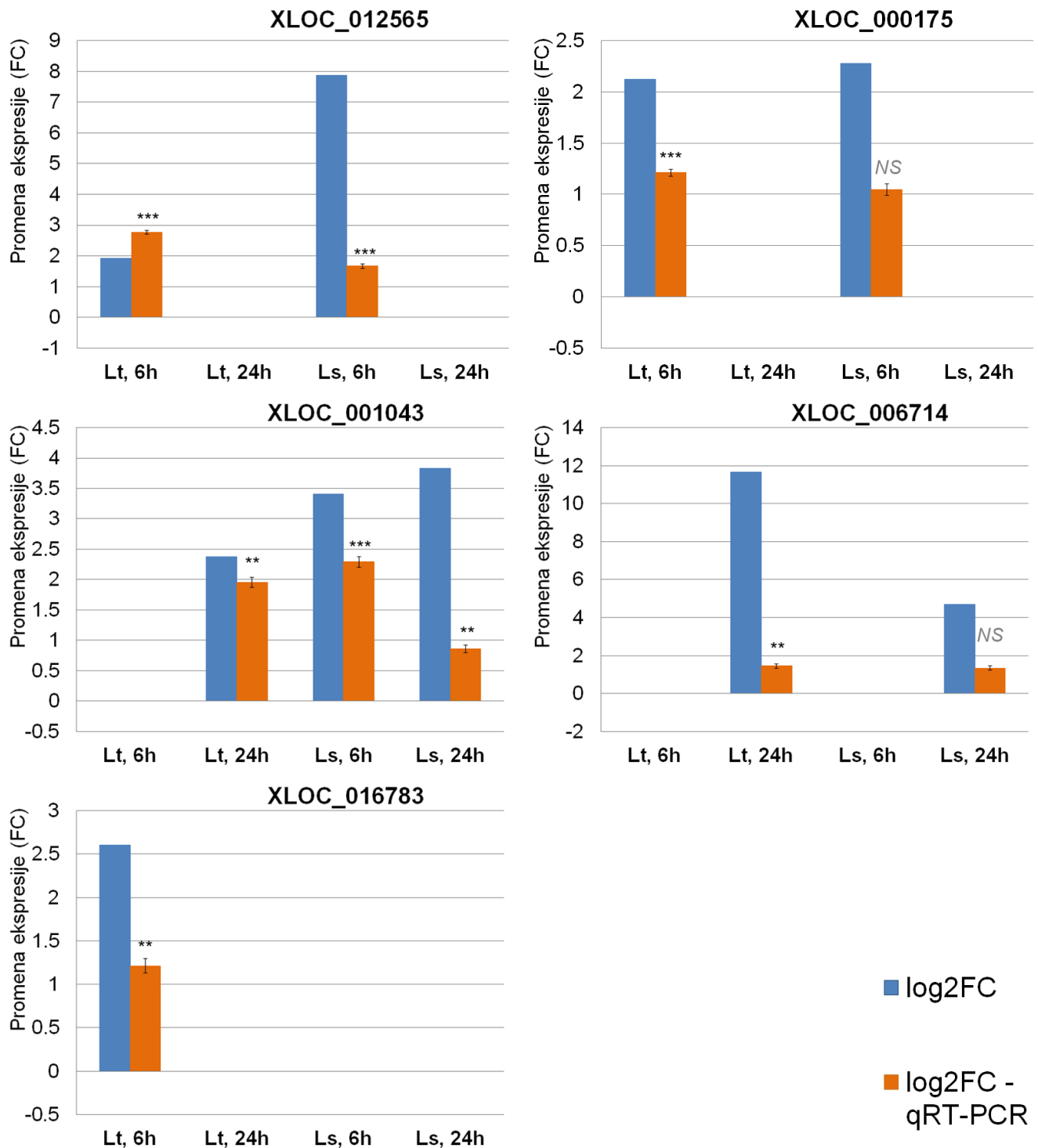


**Slika 4.53 Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno ekspimiranih iRNK, odnosno gena, primenom qRT-PCR metode.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije iRNK, odnosno odgovarajućih gena, su potvrđeni qRT-PCR metodom, preko ekspresije šest DE gena: *ado3*, *thi1*, *aed1*, *nat4*, *pds*, *rca*. Obrasci ekspresije dobijeni sekvenciranjem nove generacije su prikazani kao log2 vrednosti promene ekspresije (FC) između kontrolnih i tretiranih uzoraka. Obrasci promene ekspresije dobijeni qRT-PCR metodom su prikazani kao  $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$  vrednosti dobijene od vrednosti  $\Delta\Delta Ct$  iz kontrolnih i tretiranih uzoraka. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je utvrđena T-testom i prikazana je kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS (statistički nije značajno,  $p > 0,05$ ).

#### **4.5.2. Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno ekspimiranih lncRNK**

Rezultati validacije rezultata sekvenciranja diferencijalno ekspimiranih lncRNK (XLOC\_012565, XLOC\_000175, XLOC\_001043, XLOC\_006714, XLOC\_016783) primenom qRT-PCR

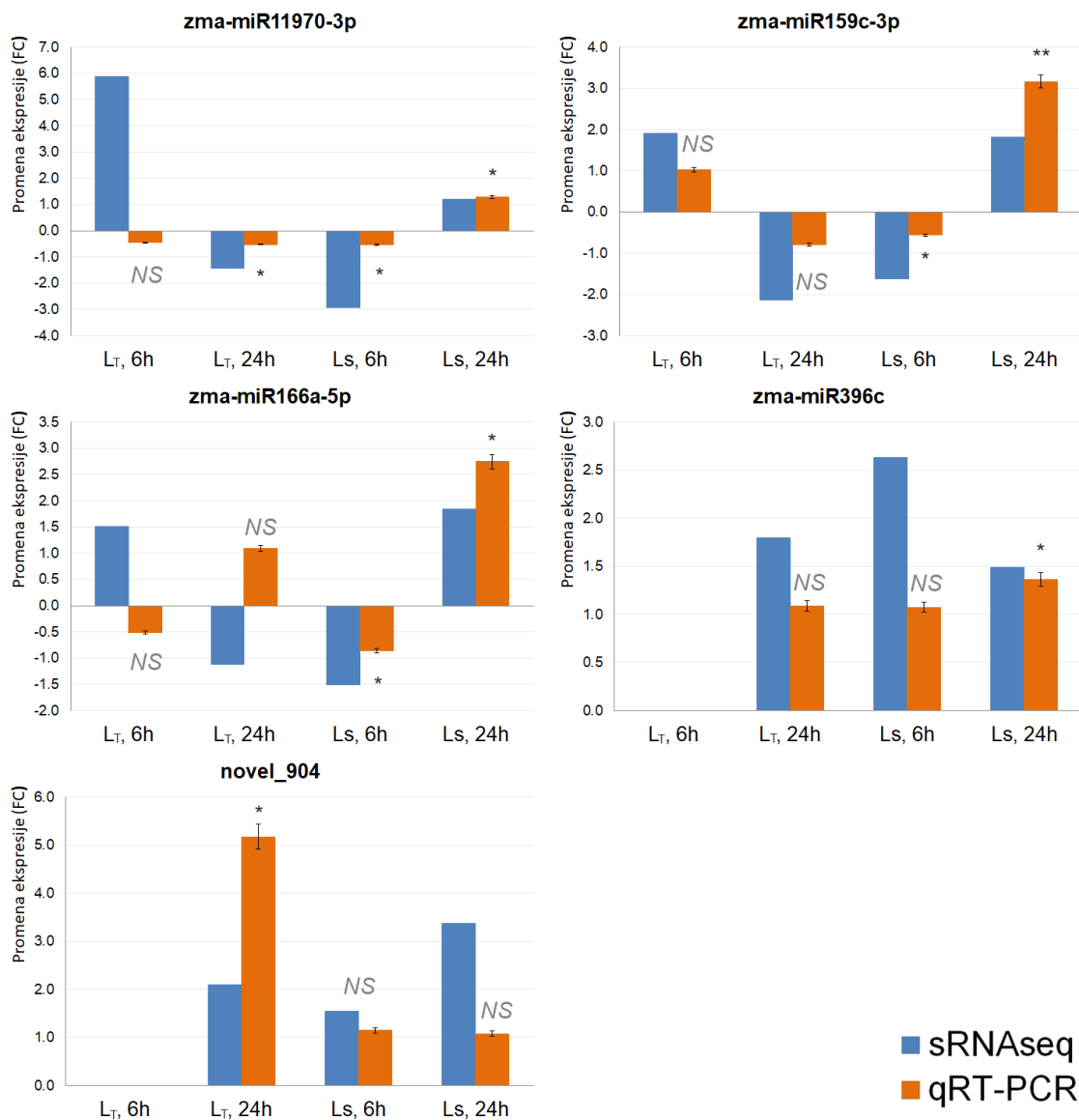
metode, su prikazani na Slici 4.54. Obrasci ekspresije detektovani sa obe metode se poklapaju, čime su rezultati sekvenciranja i DE analize za lncRNK potvrđeni.



**Slika 4.54 Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno ekspimiranih lncRNK primenom qRT-PCR metode.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije lncRNK su potvrđeni qRT-PCR metodom, preko ekspresije pet DE lncRNK: XLOC\_012565, XLOC\_000175, XLOC\_001043, XLOC\_006714, XLOC\_016783. Obrasci ekspresije dobijeni sekvenciranjem nove generacije su prikazani kao log2 vrednosti promene ekspresije (FC) između kontrolnih i tretiranih uzoraka. Obrasci promene ekspresije dobijeni qRT-PCR metodom su prikazani kao  $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$  vrednosti dobijene od vrednosti  $\Delta\Delta Ct$  iz kontrolnih i tretiranih uzoraka. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je utvrđena T-testom i prikazana je kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS (statistički nije značajno,  $p > 0,05$ ).

### 4.5.3. Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno eksprimiranih miRNK

Prikaz profila validacije rezultata sekvenciranja qRT-PCR metodom diferencijalno eksprimiranih miRNK (novel\_904, zma-miR11970-3p, zma-miR159c-5p, zma-miR166a-5p, zma-miR396c) je dat na Slici 4.55. Validacija miRNK ovom metodom se pokazala kao najmanje precizna, u odnosu na validaciju iRNK i lncRNK, najverovatnije zbog niskog početnog broja miRNK u uzorku, zbog čega je i broj amplifikovanih fragmenata nizak. Ovo dalje vodi do visokih  $C_T$  vrednosti, odnosno kasnog prelaženja praga amplifikacije, i smanjenja pouzdanosti analize. Iz ovog razloga, čak iako se većina obrazaca ekspresije detektovanih sa obe metode poklapaju, u malom broju tačaka je ova razlika između kontrolnih i tretiranih uzoraka statistički značajna.



**Slika 4.55 Validacija rezultata sekvenciranja diferencijalno eksprimiranih miRNK primenom qRT-PCR metode.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije miRNK su potvrđeni qRT-PCR metodom, preko ekspresije pet DE miRNK: novel\_904, zma-miR11970-3p, zma-miR159c-5p, zma-miR166a-5p, zma-miR396c. Obrasci ekspresije dobijeni sekvenciranjem nove generacije su prikazani kao log<sub>2</sub> vrednosti promene ekspresije (FC) između kontrolnih i tretiranih uzoraka. Obrasci promene ekspresije dobijeni qRT-PCR metodom su prikazani kao log<sub>2</sub>(2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> vrednosti) dobijene od vrednosti ΔΔC<sub>t</sub> iz kontrolnih i tretiranih uzoraka. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretmana je utvrđena T-testom i prikazana je kao \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) i NS (statistički nije značajno,  $p > 0,05$ ).

## **5. Diskusija**

### **5.1. Odabir genotipova kukuruza za analizu transkriptoma**

Kukuruz je biljna vrsta tropskog porekla, poznata po svojoj osetljivosti na niske temperature, pogotovo u ranim fazama razvića (Wijewardana i sar., 2015; Wang i sar., 2018b). Niske temperature tokom ranih faza razvića negativno utiču na stopu germinacije i vigor, odnosno životnu snagu klijanca, uzrokujući inhibiciju procesa rastenja i razvića (Yang i sar., 2011; Zhang i sar., 2020b). Ipak, s obzirom da je rana setva jedna od vodećih strategija očuvanja prinosa i produktivnosti useva u nepovoljnim uslovima izazvanim klimatskim promenama (Wijewardana i sar., 2015; Zhu i sar., 2022), identifikacija, selekcija i stvaranje hibrida tolerantnih na niske temperature je od izuzetne važnosti.

Proučavanje odgovora kukuruza na stres izazvan NT i definisanje ključnih mehanizama neophodnih za razvijanje tolerantnosti, zahteva poznavanje razlika između genotipova tolerantnih i osetljivih na ovaj faktor stresa. Stoga je izdvojeno šest genotipova iz kolekcije Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, roditeljskih komponenti komercijalnih hibrida, koji su izloženi tretmanu niskim temperaturama (10/8°C). Genotipovi su se razlikovali prema poreklu i tipu zrna, kao i po tolerantnosti na abiotički stres, procenjenoj na osnovu iskustva stečenog postavkom ogleada u polju. Nakon tretmana NT, analizirani su određeni morfološki (SP, SM, D<sub>rad</sub>, D<sub>kol</sub>, MK, MI, DK, DI, SMK i SMI) i fiziološki parametri (*chl*, *anth* i *flav*).

Inhibicija vitalnih ćelijskih procesa i funkcija, izazvana tretmanom NT, dovodi do usporavanja rastenja i razvića, a može uzrokovati i ireverzibilna oštećenja ćelija i tkiva koja dovode do uvenuća biljke (Hu i sar., 2017; Ma i sar., 2022). Stopa preživljavanja je bitan parametar za procenu tolerantnosti, odnosno osetljivosti na bilo koji faktor stresa, uključujući i NT (Mao i sar., 2017; Ma i sar., 2022). Iz tog razloga, SP je izabrana kao prvi, presudni nivo provere tolerantnosti linija kukuruza. Klijanci genotipa L6 su se odlikovali stopom preživljavanja od 100% nakon 24h tretmana niskim temperaturama, zbog čega se nakon prvog nivoa procene L6 izdvojio kao kandidat za tolerantni genotip za buduće analize. Sa druge strane, najnižom stopom preživljavanja su se odlikovali genotipovi L1 i L3, i oni su razmatrani kao potencijalno osetljivi genotipovi za dalje analize.

Drugi nivo procene podrazumevao je ispitivanje morfoloških parametara (SM, D<sub>rad</sub> i D<sub>kol</sub>) odmah nakon završenog tretmana niskim temperaturama. S obzirom na činjenicu da NT negativno utiču na rasteenje i razviće kukuruza, posebna pažnja je posvećena ispitivanju morfoloških parametara rastenja klijanaca u proceni tolerantnosti. Parametri mase klijanca, kao i dužine izdanka i korena, odnosno koleoptila i radikule, su često korišćeni parametri rastenja u analizi odgovora na stres izazvan niskim temperaturama (Mao i sar., 2017; Zhang i sar., 2024b) zbog značajnog uticaja NT na njihove vrednosti (Miroslavljević i sar., 2013; Farooqi i Lee, 2016). Genotipovi L1 i L6 su se odlikovali odsustvom statistički značajnih razlika između kontrole i tretmana za sva tri parametra i pokazali su najviši nivo tolerantnosti na NT. Ipak, ova dva genotipa su se međusobno izrazito razlikovala. L6 je imao veći vigor semena i klijanca – odlikovao se značajno većim vrednostima mase i dužine koleoptila i radikule. Iako nije bilo razlike između kontrole i tretmana kod klijanaca genotipa L1, parametri SM, D<sub>rad</sub> i D<sub>kol</sub> su imali najniže vrednosti u poređenju sa svim ostalim analiziranim genotipovima. Pобољшanje ranog vigora, koji uključuje vigor semena i klijanca, je ključno za adaptaciju kukuruza na uslove niske temperature (Hund i sar. 2004, 2008). Genotipovi sa visokim vigorom semena se odlikuju boljim i efikasnijim odgovorima na brojne faktore stresa, koji uključuju indukovanje složenih mehanizama tolerantnosti (Li i sar., 2021a). Kao najosetljiviji su se pokazali genotipovi L3 i L4,

jer su najizraženija smanjenja vrednosti SM,  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$  kod tretiranih klijanaca uočena upravo kod ovih genotipova. Nakon dva nivoa procene, L3 se izdvojio kao najosetljiviji – odlikovao se najnižim vrednostima SP i morfoloških parametara. Sa druge strane, L6 se pokazao kao najtolerantniji nakon dva nivoa procene.

Nakon oporavka u trajanju od sedam dana, klijanci su dostigli V1/V2 fazu rasteanja, u kojoj su potpuno razvijeni prvi ili prva dva lista. Stoga, morfološki i fiziološki parametri analizirani u toj tački nisu smatrani jednako značajnim kao oni ispitani tokom samog nicanja odmah nakon tretmana. Ipak, sposobnost oporavka nakon abiotičkog stresa je bitan parametar tolerantnosti (Wang i sar., 2018b), pa su i ovi rezultati uzeti u obzir. Genotip L3 se i posle oporavka pokazao kao najosetljiviji, jer nisu uočena značajna poboljšanja u ispitanim morfološkim parametrima. Kontrolne biljke su se odlikovale značajno većim vrednostima većine analiziranih parametara (MK, MI, DK, DI, SMK i SMI) od tretiranih, a ovaj genotip se odlikovao i lošim vigorom – L3 se odlikovao najnižim vrednostima većine parametara među ispitivanim genotipovima, čak i u kontrolnim uslovima. Kada je reč o genotipu L6, kod parametara *chl*, *fla*, *anth* nije bilo statistički značajne razlike između kontrole i tretmana, a vrednosti parametra SMK su bile veće kod tretiranih biljaka. Ipak, kod većine ispitivanih parametara su više vrednosti uočene kod kontrolnih biljaka (MK, MI, DK, DI i SMI). Međutim, genotip L6 se odlikovao velikim brojem lateralnih korenova, koji su često bili i duži i razvijeniji od samog primarnog korena koji je izmeren u ovom istraživanju. Značajna razlika u razvoju bočnog korenskog sistema u poređenju sa osnovnim se može uočiti i iz činjenice da se L6 odlikovao najvećom vrednošću suve mase korena i u kontrolnim i tretiranim biljkama, a jednom od najmanjih vrednosti dužine korena. Sa druge strane, kod genotipa L5 sa veoma razvijenim primarnim korenom je situacija bila suprotna – odlikovao se najvećom vrednošću dužine korena, dok je vrednost suve mase bila jedna od najnižih. Merenje dužine samo primarnog korena, izabrano radi mogućnosti merenja dužine korena svih genotipova (čak i onih bez razvijenih lateralnih korena), u ovom slučaju nije prikazivalo potpunu sliku kada je u pitanju reakcija ovog parametra na tretman niskim temperaturama. Korenov sistem sa veoma razvijenim lateralnim korenovima, je povezan sa postojanjem većeg vigora biljaka tokom ranih faza (Hund i sar., 2004; 2008), što je neophodno za razvoj složenih mehanizama tolerantnosti (Li i sar., 2021a). Kod kukuruza su lateralni korenovi odgovorni za veliki deo apsorpcije vode i nutrijenata (Wijewardana i sar., 2015), a pokazano je i da je njihova dužina u korelaciji sa boljim performansama u uslovima niskih temperatura (Hund i sar., 2008). Dodatno, usporavanje rasteanja izdanka u uslovima niskih temperatura može biti povezano sa direktnim efektom suboptimalnih temperatura, ali i smanjenim protokom nutrijenata kroz korenove (Hund i sar., 2004). Činjenica da se genotip L6 odlikovao najvišim vrednostima parametara koji su u vezi sa razvićem izdanka u kontrolnim kao i uslovima tretmana (MI, SMI i DI), dodatno ukazuje na njegovu tolerantnost na niske temperature.

Na osnovu svega navedenog, genotip L6 je izabran kao tolerantan ( $L_T$ ) za dalja istraživanja, a genotip L3 kao osetljiv ( $L_s$ ).

## **5.2. Biohemijska karakterizacija odgovora na niske temperature osetljivog i tolerantnog genotipa kukuruza**

Kao što je već navedeno, kukuruz je biljna vrsta osetljiva na niske temperature i mehanizmi koji leže u osnovi osetljivosti su proučavani dugi niz godina. Pored toga, dokazano je da biljke kukuruza imaju mogućnost da se aklimatizuju na uslove niske temperature, na šta utiče veliki broj faktora, uključujući sam genotip i njegovu genomsku strukturu (Sobkowiak i sar., 2016). Negativan uticaj stresa izazvanog NT dovodi do poremećaja u membranskim sistemima, redukcije fotosintetske aktivnosti i akumulacije toksičnih ROS, što može indukovati niz

fizioloških odgovora kod biljaka kukuruza, kao što su osmotsko prilagođavanje i aktivacija antioksidativnih mehanizama (Zhou i sar., 2022). Iz tih razloga su kod izabrana dva genotipa ( $L_S$  i  $L_T$ ) ispitani nivo oštećenja membranskih sistema i fotosintetska efikasnost, kao i sadržaj antioksidativnih enzima, fenolnih jedinjenja, šećera i šećernih alkohola. Na ovaj način je dodatno potvrđena kontrastna tolerantnost na niske temperature ova dva genotipa, a mehanizmi njihovog odgovora na NT detaljnije okarakterisani.

### **5.2.1. Promene u nivou fenolnih jedinjenja**

Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti među kojima su kod biljaka u najvećoj meri zastupljena polifenolna jedinjenja (fenolne kiseline, flavonoidi) (Pratyusha, 2022). Akumulacija polifenolnih jedinjenja je često u vezi za metaboličkim putevima uključenim u odgovor na različite faktore stresa (Chowdhary i sar., 2021; Kumar i sar., 2023). Ova klasa sekundarnih metabolita se odlikuje visokim antioksidativnim kapacitetima (Foyer, 2018; Mleziva i Ngumbi, 2024), zbog čega ima ulogu u neenzimskoj neutralizaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta i inhibiciji oksidativnih enzima (Pál i sar., 2020; Yu i sar., 2022). U okviru ovog istraživanja ispitani su ukupan sadržaj polifenolnih i flavonoidnih jedinjenja, sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina (p-kumarinska, kofeinska i 5-O-kafeoilhinska kiselina) i pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Pojedinačna fenolna jedinjenja su obuhvatila nekoliko klasa flavonoida: flavonole (kvercetin, izoramnetin), flavanone (naringenin) i flavon glukozide (rutin, viteksin, astragalín).

Kod oba ispitivana genotipa je došlo do statistički značajne redukcije u ukupnom sadržaju polifenolnih jedinjenja. Genotip  $L_T$  se odlikovao većom količinom prisutnih polifenola i u kontrolnim i u tretiranim uzorcima, ali i većim padom kod tretiranih u odnosu na kontrolne klijance. Takođe, utvrđeno je da je došlo i do smanjenja nivoa ukupnih flavonoida kod oba genotipa. Kao i kod ukupnog sadržaja polifenola, nivo flavonoida je bio veći kod genotipa  $L_T$ , ali je procenat smanjenja sadržaja flavonoida u tretiranim u odnosu na kontrolne klijance kod oba genotipa sličan -  $\approx 10\%$ . Kao što je već rečeno, sva fenolna jedinjenja, uključujući flavonoide imaju bitnu ulogu u odgovoru na abiotičke faktore stresa i tokom perioda abiotičkog stresa najčešće dolazi do povećanja njihove količine kod različitih biljnih vrsta, uključujući kukuruz (Li i sar., 2021c; Mazhar i sar., 2023). Flavonoidi se smatraju ključnim komponentama odgovora na stres izazvan NT (Genzel i sar., 2021; Li i sar., 2025) i njihova akumulacija je često povezana sa tolerantnošću na ovaj faktor stresa, što je potvrđeno i kod kukuruza (Yu i sar., 2022; Jiang i sar., 2023). Zbog toga je trend opadanja ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida kod klijanaca oba genotipa bio iznenađujuć. Ipak, postoje istraživanja čiji rezultati pokazuju i suprotno. Na primer, ukupan sadržaj flavonoida je kod biljaka bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) opadao tokom trajanja tretmana NT, dok je ukupan sadržaj polifenola rastao tokom prvih 24h, a zatim opao ispod nivoa kontrole (Rezaie i sar., 2020). Zabeleženo je i opadanje nivoa ovih sekundarnih metabolita i kod drugih tipova abiotičkog stresa – kod korenova peršuna (*Petroselinum crispum* L.) u uslovima povećanog nivoa cinka (Nawaz i sar., 2024), kod uljane repice izložene tretmanu suše (Hafez i sar., 2024), kod kukuruza izloženog povećanom koncentracijom soli u zemljištu (Ali i sar., 2023). Ipak, donošenje zaključaka o osetljivosti na bilo koji faktor stresa na osnovu ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida je otežano zbog metodologije primenjene za utvrđivanje njihovog nivoa. Alhaithloul i sar. (2021) su naveli da način pripreme tkiva i sama metoda izolacije utiču na dobijene vrednosti, kao i tip tkiva i životna faza, i stoga je potrebno detaljnije ispitati uticaj NT na sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

Analiza pojedinačnih flavonoida i fenolnih kiselina je dodatno pokazala da je uloga ovih sekundarnih metabolita u odgovoru na niske temperature kompleksna. Za razliku od  $L_T$ , kod kog je svako pojedinačno polifenolno jedinjenje prisutno u manjoj količini u tretiranim klijancima,

kod osetljivog genotipa je uočeno suprotno. Nivo rutina, kvercetina, izoramnetina i astragalina je bio značajno povećan u tretiranim klijancima. Navedena jedinjenja nastaju od naringenina i delovi su biosintetskih puteva antocijanina i nisu karakteristična za linije žutog kukuruza ispitivane u ovom istraživanju, već za obojene sorte (plavi, ljubičasti kukuruz) (Petroni i sar., 2014).

Poznato je da rutin i kvercetin imaju ulogu u zaštiti biljaka od štetnog UV zračenja (Suzuki i sar., 2015; Kreft i sar., 2022), ali nema mnogo podataka o njihovoj akumulaciji u odgovoru na stres izazvan NT. Alhaithloul i sar. (2021) su pokazali da kod paradajza nivo rutina i kvercetina raste nakon kratkotrajnog izlaganja niskim temperaturama (eng. *cold shock*). Prema Suzuki i sar. (2015), NT nisu dovele do akumulacije rutina kod jedne vrste heljde (*Fagopyrum tataricum*), ali su Song i sar. (2022) pokazali suprotno u svojim istraživanjima. Takođe, Nacif de Abreu i Mazzafera (2005) su pokazali da kod *Hypericum brasiliense* nivo ovih flavonoida opada kod biljaka izloženih NT. Oprečni rezultati istraživanja akumulacije ovih jedinjenja ukazuju da uloga flavonoida u odgovoru na NT nije jednostavna i zahteva dodatna izučavanja. Na primer, povećanje nivoa navedenih flavonoida samo kod osetljivog genotipa možda nije povezano sa direktnom ulogom ovih jedinjenja u odgovoru na abiotički stres. Naime, flavonoli i njihovi glukozidi preko različitih mehanizama utiču na gradijent i nivo auksina u ćelijama, a time i na rastenje biljnih organa (Zhang i Peer, 2017; Singh i sar., 2021). Jedan od tih mehanizama je regulacija oksidacije indol 3-sirćetne kiseline (eng. *indole 3-acetic acid*, IAA) i smanjenje nivoa IAA radikala sintetisanih tokom tog procesa (Singh i sar., 2021). Brunetti i sar. (2018) su pretpostavili da je ova regulacija auksina od strane flavonoida posredovana ROS molekulima. Kvercetin je poznat inhibitor auksina (Imin i sar., 2007) i takođe može modulirati rastenje korena ograničavajući proliferaciju ćelija (Tohge i Fernie, 2016; Xu i sar., 2019). Dakle, flavonoli i njihovi derivati mogu imati ulogu u represiji aktivnosti indukovanih auksinom, odnosno rasteća i morfogeneze, i stimulanju mehanizama zaštite od stresa. Stoga se njihov povećan nivo kod  $L_s$  može povezati sa smanjenjem  $SM$ ,  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$ . Sa druge strane, kod genotipa  $L_T$ , odsustvo statistički značajne razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka za  $SM$ ,  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$ , se može povezati sa opadanjem nivoa ovih flavonoida. Međutim, razjašnjavanje ovakvih rezultata zahteva dodatne analize.

Kada je reč o fenolnim kiselinama, promene su bile manje izražene. Sadržaj p-kumarinske kiseline se nije razlikovao između C i T, ni kod jedne od ispitivanih linija. Nivo 5-CQA je bio niži kod tretiranih biljaka oba genotipa, dok je samo kofeinska kiselina bila povećana kod tretiranih klijanaca genotipa  $L_s$ . Kod kukuruza, većina fenolnih kiselina se nalazi u vezanom obliku u okviru ćelijskog zida, a najzastupljenije slobodne fenolne kiseline su trans-ferulična i p-kumarinska (Adom i Liu, 2002). Kao i sva fenolna jedinjenja, i fenolne kiseline imaju ulogu u odgovoru na različite abiotičke faktore stresa, što je u vezi sa njihovim antioksidativnim svojstvima. Kod kukuruza je sadržaj fenolnih kiselina uglavnom ispitivan tokom stresa suše. Na primer, Kravić i sar. (2021) su pokazali da suša dovodi do pada nivoa kofeinske, protokatehuinske i sinapinske kao i do povećanja cinaminske i p-kumarinske kiseline. Novija istraživanja koja primenjuju metode metabolomike su otkrila nove fenolne kiseline uključene u odgovor na stres izazvan NT kod kukuruza. Jiang i sar. (2023) su utvrdili da je 87 metabolita diferencijalno eksprimirano između kontrolnih i tretiranih biljaka kukuruza, među kojima i kriptohlorogena kiselina. Yu i sar. (2022) su pokazali da je akumulacija fertarinske i miristoleinske kiseline u vezi sa tolerantnošću na stres izazvan NT. Ipak, u istraživanju ZP linija navedene fenolne kiseline nisu detektovane kod dva ispitana genotipa, dok se jedino nivo kofeinske kiseline razlikovao između  $L_T$  i  $L_s$  – kod oba genotipa je bio blago povećan kod tretiranih klijanaca u odnosu na kontrolne, ali je samo kod  $L_s$  ta promena bila statistički značajna. Iako je povećana akumulacija kofeinske kiseline često u vezi

sa tolerantnošću na različite faktore stresa kod brojnih biljnih vrsta (Jamalian i sar., 2013; Klein i sar., 2015), uključujući niske temperature (Li i sar., 2013; Wan i sar., 2014b; Mughal i sar., 2024), u literaturi nema mnogo podataka za kukuruz. Na primer, Kisa i sar. (2016) su pokazali da izlaganje teškim metalima dovodi do smanjenja nivoa kofeinske kiseline kod kukuruza. Sa druge strane, za sušu postoje oprečni podaci – ovaj faktor stresa može dovesti do smanjenja (Kravić i sar., 2021) ili povećanja nivoa kofeinske kiseline (Kolo i sar., 2023).

Na osnovu analize pojedinačnih fenolnih jedinjenja (rutin, kvercetin, astragalin, izoramnetin) može se zaključiti da kod genotipa L<sub>s</sub> dolazi do aktiviranja određenih zaštitnih mehanizama, po cenu odvijanja procesa rastenja i razvića, dok se kod L<sub>T</sub> to ne dešava.

### **5.2.2. Promene u nivou šećera i šećernih alkohola**

Osmotska reakcija, odnosno akumulacija jedinjenja niske molekulske mase (osmoprotektanti), je jedan od najvažnijih fizioloških mehanizama aklimatizacije biljaka na različite abiotičke faktore stresa (Zhou i sar., 2022b). Osmoprotektanti učestvuju u održavanju ćelijskog turgora i zadržavanju vode, kao i u zaštiti strukture makromolekula u ćeliji (Farhangi-Abriz i Torabian, 2017). Najznačajniji osmoliti su rastvorljivi šećeri i šećerni alkoholi, kao i rastvorljivi proteini i slobodni prolin (Zhou i sar., 2022b).

#### ***5.2.2.1. Promene u nivou šećera***

Rastvorljivi šećeri su izuzetno hidrofilni i smanjenjem vodnog potencijala pomažu u održavanju aktivnosti određenih makromolekula tokom perioda abiotičkog stresa (Guan i sar., 2009). Takođe, učestvuju i u uklanjanju ROS i stabilizaciji ćelijske membrane (Nadarajah, 2020). Biljke mogu iskoristiti tačno određene količine različitih šećera u ćelijama kao signal za modulaciju rastenja i razvića kao odgovor na abiotički stres, uključujući i NT (Uemura i sar. 2006; Heidarvand i Maali Amiri, 2010). Brojna istraživanja su pokazala da niske temperature dovode do povećanja sadržaja šećera kod kukuruza i da je ta akumulacija izraženija kod tolerantnih sorti (Zhou i sar., 2022b). Najznačajniji šećeri uključeni u ovaj odgovor su glukoza, saharoza, fruktoza, rafinoza i stahioza (Sami i sar., 2016).

U ovom istraživanju, pored faktora niskih temperatura, bilo je neophodno uzeti u obzir i životnu fazu u kojoj je tkivo uzorkovano. Naime, klijanci kukuruza su se nakon šest dana od postavljanja na germinaciju i dalje nalazili u stadijumu razvića koji se smatra pretežno heterotrofnim (Rosa i sar., 2009; Singh i Rajendran 2016; Lu i sar., 2021) i rastenje i razviće zavise od dostupnosti rezervnih materija u semenu (Santos i Buckeridge, 2004). Ugljeni hidrati (skrob, glukoza, saharoza, fruktoza) predstavljaju veliki udeo rezervnih materija koji se koriste dok klijanac ne postane potpuno autotrofan (Lima i sar., 2008; Siddiqui i sar., 2020). Dakle, šećeri u biljnim ćelijama tokom nicanja obuhvataju one poreklom iz rezervnih materija semena, čiji nivo može samo opadati i u manjoj količini, nosivši sintezu šećere, čiji nivo raste sa razvojem i uspostavljanjem fotosintetskog aparata. Stoga, ovaj životni stadijum je podložan fluktuacijama nivoa šećera, što je potrebno uzeti u obzir tokom analize (Rosa i sar., 2009). Istraživanja ovako ranih životnih stadijuma nisu zastupljena i podataka o nivou šećera nakon izlaganja nekom abiotičkom faktoru stresa nema mnogo. Na primer, Wang i sar. (2016a) su zaključili da izlaganje klijanaca pirinča niskim temperaturama tri, šest i devet dana od postavljanja na isključivanje, bez određenih pretretmana semena, dovodi do smanjenja sadržaja ukupne količine rastvorljivih šećera (eng. *total soluble sugar content*). Kada je reč o kukuruzu, Cao i sar. (2019) su pokazali da je kod klijanaca starih tri i pet dana izloženih niskim temperaturama došlo do opadanja nivoa saharoze i ukupne količine rastvorljivih šećera. Takođe, različiti šećeri imaju različite uloge povezane sa metabolizmom biljke pod uticajem određenog stresa (Almodares i sar., 2008). Na primer, saharoza i glukoza su supstrati ćelijske respiracije, a imaju i ulogu osmoprotektanata

(Gupta i Kaur, 2005), dok je fruktoza povezana sa sintezom sekundarnih metabolita poput lignina (Hilal i sar., 2004). Dakle, metabolizam rastvorljivih šećera je izrazito dinamičan proces koji istovremeno obuhvata reakcije sinteze i degradacije, što komplikuje ispitivanje njihove uloge u odgovoru na različite faktore stresa, uključujući i uticaj niskih temperatura. U ovom istraživanju, obrasci akumulacije rastvorljivih šećera su bili isti kod oba genotipa, a razlike su uočene samo kod dva šećera (glukoza i galaktoza).

L<sub>T</sub> i L<sub>S</sub> se razlikuju u akumulaciji glukoze – kod osetljivog genotipa je došlo do povećanja nivoa glukoze u tretiranim klijancima, dok je kod tolerantnog utvrđeno suprotno. Glukoza se, zajedno sa fruktozom, akumulira u ćeliji kao minorni produkt fotosinteze i razgradnje saharoze i nije transportni oblik šećera (Siddiqui i sar., 2019). Dodatno, nanošenje egzogene glukoze dovodi do povećanja nivoa ostalih rastvorljivih šećera (saharoza, fruktoza) i ABA (Li i sar., 2024a). Kao i ostali rastvorljivi šećeri, akumulira se i tokom abiotičkog stresa, uključujući niske temperature (Yoon i sar., 2017; Jiang i sar., 2021; Shen i sar., 2022). Glukoza je šećer od posebnog interesa, jer nema ulogu samo kao osmoprotektant, već glukozna signalizacija i interakcija sa biljnim hormonima imaju veliki uticaj na modulaciju procesa bitnih za rastenje i razviće (ćelijska deoba i elongacija, razvoj korenske arhitekture, formiranje organa, cvetanje, senescencija), kao i odgovora na promene u životnoj sredini (svetlost, temperatura, dostupnost vode i nutrijenata) (Leyser, 2018; Saksena i sar., 2020). Mishra i sar. (2009) su pokazali da glukoza posreduje u promenama u dužini korena, formiranju bočnih korenova, elongaciji korenskih dlaka, kao i devijaciji rastenja korena od vertikalnog i da ovu ulogu ostvaruje kroz interakcije sa auksinima, citokininima i etilenom. Na primer, egzogenim nanošenjem glukoze je došlo do stabilizacije auksinskog represora AXR3, što dokazuje da glukoza na taj način može uticati na signalne puteve auksina (Mishra i sar. 2009). Glukoza takođe utiče na germinaciju semena i može inhibirati rane stadijume razvića klijanaca (Gibson, 2005; Siddiqui i sar., 2019). Povećan sadržaj glukoze je negativno uticao na stopu germinacije i visinu izdanaka *Vigna radiata* (Dewi i sar., 2015), kao i na razvoj kotiledona i listova klijanaca *Arabidopsis thaliana* (To i sar., 2003). U slučaju L<sub>S</sub>, povećan nivo glukoze nije bio praćen povećanjem sadržaja saharoze i fruktoze, što može biti posledica nedostatka uspostavljene autotrofije, ali može ukazivati na značaj glukoze u regulaciji rastenja i razvića tokom tretmana niskim temperaturama. Kao i povećan nivo rutina, kvercetina, astragalina i izoramnetina, i povećan nivo glukoze se može povezati sa inhibiranim rastenjem kod genotipa L<sub>S</sub>. Akumulacija fruktoze i saharoze je takođe opisana kod mnogih biljnih vrsta tokom perioda stresa izazvanog niskim temperaturama (Jiang i sar., 2021; Shen i sar., 2022). U istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana su kod oba genotipa nivoi svih navedenih šećera bili sniženi kod tretiranih klijanaca, što se može povezati sa nemogućnosti odvijanja fotosinteze i sinteze ugljenih hidrata.

Rafinozni oligosaharidi (rafinoza, stahioza) su derivati saharoze i aktivirane galaktozil grupe (Yan i sar., 2022c). Zajedno sa saharozom, oni predstavljaju najveći udeo rezervnih ugljenih hidrata u semenu (Gangl i Tenhaken 2016). Rafinoza je široko rasprostranjena među biljkama i od velike je važnosti za tolerantnost na desikaciju semena (eng. *seed storability*) (Jing i sar., 2018; Yan i sar., 2022c). Visoki nivoi rafinoznih oligosaharida su se pokazali kao neophodni za održavanje konstantnog priliva redukujućih šećera neophodnih za tolerantnost na desikaciju od faze suvih semena sve do završene germinacije (Arunraj i sar., 2020). Tolerantnost na desikaciju je u korelaciji sa dugovečnošću i vigorom semena (Gurusinghe i Bradford, 2001; Yan i sar., 2022c), što može značiti i poboljšanje adaptacije na NT (Hund i sar., 2008; Li i sar., 2021a). Takođe, postoji sve više dokaza o učešću galaktinola i rafinoznih oligosaharida u odgovoru na NT (Han i sar., 2020a). Istraživanja su pokazala da tretman niskim temperaturama indukuje akumulaciju rafinoze i u tolerantnim i osetljivim sortama pirinča, kao i da je nivo ovog šećera veći

kod tolerantnih sorti (Morsy i sar., 2007; Nägele i Heyer, 2013). Nivo stahioze je takođe bio povećan nakon tretmana niskim temperaturama kod različitih biljnih vrsta (Gu i sar., 2018; Kwon i sar., 2022), dok se kod *Arabidopsis thaliana* ona nije akumulirala tokom abiotičkog stresa (Gangl i Tenhaken 2016). Han i sar. (2020a) su pokazali da utišavanje gena za rafinoza-sintazu (*ZmRS*) kod kukuruza dovodi do smanjene tolerantnosti na niske temperature. U ovom istraživanju, kod klijanaca starih pet dana je došlo do smanjenja nivoa rafinoze kod oba genotipa. Sa druge strane, nivo stahioze je bio povećan kod oba genotipa, ali je promena bila statistički značajna samo kod L<sub>s</sub>. Takođe, nivo dva ispitivana šećera je i u uslovima kontrole i tretmana bio veoma nizak kod oba genotipa – npr. kod L<sub>s</sub>, u kontrolnim klijancima je nivo rafinoze iznosio 0.49 g/100g, a u tretiranim 0.80 g/100g uzorka. Ovo je u poređenju sa drugim šećerima veoma nisko, pa je i njihov uticaj na sam odgovor na NT upitan.

Galaktoza se kod biljaka može pronaći kao sastavna komponenta nekoliko vrsta polimera ćelijskog zida, i kao komponenta rafinoznih oligosaharida uskladištenih u semenu (Gangl i Tenhaken 2016, Höftberger i sar., 2022). Tokom germinacije dolazi do razgradnje rafinoze i stahioze, čime se dobija saharoza i milimolarne količine galaktoze. Tada dolazi i do remodeliranja ćelijskih zidova, što takođe rezultuje oslobađanjem malih količina galaktoze. Ovaj šećer se potom brzo transformiše u svoj nukleotidni oblik, što omogućava recikliranje oslobođene galaktoze za biosintezu novih komponenti ćelijskog zida, poput glikoproteina (Höftberger i sar., 2022). L-galaktoza je bitan deo biosintetskog puta askorbinske kiseline kod biljaka (Castro i sar., 2023). Takođe, ovaj šećer u slobodnoj formi u višim koncentracijama može dovesti do inhibicije rastenja korena (Althammer i sar., 2022), zbog čega je nivo galaktoze strogo regulisan (Wang i sar., 2022). Nema mnogo podataka o akumulaciji galaktoze u uslovima abiotičkog stresa. Kod uzoraka topole (*Populus* spp.) je nivo galaktoze opao nakon izlaganja visokoj koncentraciji soli u podlozi (Liu i sar. 2021), a takođe je opadao i kod biljaka krastavca (*Cucumis sativus*) izloženih niskim temperaturama (Gu i sar., 2018). Li i sar. (2020a) su tokom analize uloge enzima rafinozo-sintaze u odgovoru na stres suše kod kukuruza, pokazali da je moguće da galaktoza učestvuje u tom odgovoru kao sastavna komponenta galaktinola, neophodnog za sintezu rafinoze. Iako je nivo galaktoze povećan kod tretiranih biljaka L<sub>T</sub>, za razliku od biljaka L<sub>s</sub>, nivo rafinoze je opao, pa je teško povezati akumulaciju galaktoze sa uspostavljanjem tolerantnosti na NT.

Od ispitivanih šećera, trehaloza je najpoznatija po svojoj ulozi u uspešnoj adaptaciji i odgovoru biljaka na raznovrsne promene u životnoj sredini, uključujući temperaturni stres (Hassan i sar., 2023; Raza i sar., 2024a). Trehaloza ima ulogu u zaštiti ćelijskog integriteta (Fernandez i sar., 2010; Hassan i sar., 2023) i stabilizaciji dehidriranih enzima, membrana i proteina (Raza i sar., 2024a). Takođe, učestvuje u ćelijskoj signalizaciji i koordinaciji adaptivnih odgovora na stres. Specifični trehalozni receptori omogućavaju brzu reakciju ćelije na promene nivoa trehaloze i inicijaciju specifičnih molekularnih mehanizama tokom temperaturnog stresa (Raza i sar., 2022; Hassan i sar., 2023). Enzimi koji učestvuju u sintezi trehaloze, poput trehalozo-6-fosfat sintaze (TPS), se aktiviraju u uslovima NT i dovode do povećanja nivoa ovog šećera u ćeliji (Teramoto i sar., 2008; Raza i sar., 2024a). Povećanje nivoa trehaloze predstavlja signal za aktivaciju gena uključenih u odgovor na NT, rezultujući povećanjem tolerantnosti na ovaj stres (Teramoto i sar., 2008; Liu i sar., 2020b). Stoga, nije iznenađujuće da su eksperimenti nanošenja egzogene trehaloze tokom stresa izazvanog NT kod različitih biljnih vrsta, pokazali da ovaj šećer dovodi do povećane stope preživljavanja, većih vrednosti parametara rastenja, akumulacije osmoprotektanata i antioksidativnih enzima (Raza i sar., 2024a). Nanošenje egzogene trehaloze je imalo sličan efekat i kod biljaka kukuruza izloženih niskim temperaturama (Liu i sar., 2018; Xuan i sar., 2018). Takođe, postoje podaci koji pokazuju da tokom stresa izazvanog NT i bez aplikacije trehaloze, biljke kukuruza aktiviraju gene neophodne za sintezu ovog šećera i iniciraju

njihovu akumulaciju. Na primer, Guo i sar. (2021a) su zabeležili aktivaciju nekoliko gena odgovornih za sintezu trehaloze tokom kombinovanog stresa suše i NT. Jończyk i sar. (2017) su naglasili ulogu trehaloze i njene interakcije sa stahiozom kao bitnu komponentu ćelijske signalizacije u okviru odgovora na NT. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je došlo do povećanja nivoa trehaloze kod klijanaca kukuruza i osetljivog i tolerantnog genotipa nakon izlaganja NT, što ukazuje na ulogu trehaloze u ćelijskoj signalizaciji tokom odgovora na NT, nezavisno od tolerantnosti genotipa na ovaj faktor stresa.

#### **5.2.2.2. Promene u nivou šećernih alkohola**

Šećerni alkoholi ili polioli su aldozni ili ketozni šećeri, redukovani do svoje hidroksilne grupe (Bhattacharya i Kundu, 2020). Ovi molekuli su detektovani kod velikog broja organizama nakon izlaganja nekom faktoru stresa i kao i šećeri, primarna uloga im je u osmotskoj reakciji, ublažavanju oksidativnih oštećenja, a imaju i ulogu molekularnih šaperona (Sengupta i sar. 2008). Akumulacija šećernih poliola ima važnu ulogu u uspostavljanju tolerantnosti na negativne promene životne sredine (Sami i sar. 2016), s obzirom na to da oni takođe učestvuju u stabilizaciji proteina i membrana, održavanju ćelijskog turgora, ćelijskog signalizaciji i održavanju redoks homeostaze (Roychoudhury i sar. 2015). Šećerni alkoholi uključeni u navedene procese su u najvećem broju slučajeva manitol, sorbitol i inozitoli (Bhattacharya i Kundu, 2020).

Manitol je široko rasprostranjen heksitol, rastvorljiv u vodi i strukturno sličan manozu (Stoop i sar. 1996). Ovaj alkoholni šećer, pored uloge u odgovoru na faktore stresa može služiti i za skladištenje zaliha ugljenika, kao kompatibilni osmolit u fotohemijskim impulsima i kao glavni transportni ugljeni hidrat u slučaju nedostataka saharoze (Bhattacharya i Kundu, 2020). Uloga manitola u uspostavljanju tolerantnosti na različite faktore stresa je potvrđena eksperimentima pretretmana semena ili biljaka. Pretretman semena pšenice 10 mM manitolom je rezultovao u poboljšanoj tolerantnosti na stres soli kod klijanaca ublažavanjem negativnih efekata ROS (Alhudhaibi i sar., 2024). Isti efekat manitola je potvrđen i kod klijanaca pšenice izloženih visokoj koncentraciji hroma u podlozi (Adrees i sar., 2015). Nanošenje manitola na listove je imalo isti rezultat i kod biljaka kukuruza izloženih povećanom nivou hroma (Habiba i sar., 2019) ili soli (Afzal i sar., 2023) – rezultovalo je boljim rastenjem, uvećanom biomasom i nivoom fotosintetskih pigmenata. Ipak nema mnogo podataka u literaturi o ulozi ovog šećernog alkohola u uslovima stresa izazvanog NT. Na primer, Bocian i sar. (2015) su pokazali da kod *Lolium perenne* ne dolazi do značajne akumulacije manitola tokom aklimatizacije na NT. Sanie Khatam i sar. (2024) su pokazali da pretretman semena manitolom, melatoninom i sirćetnom kiselinom rezultuje poboljšanim antioksidativnim kapacitetima i akumulacijom fenolnih jedinjenja kod *Citrus aurantifolia*. U ovom istraživanju, kod klijanaca kukuruza starih pet dana, nivo manitola je bio viši kod tretiranih klijanaca osetljivog genotipa, dok je kod L<sub>T</sub> akumulacija manitola bila veća u kontrolnim klijancima.

Sorbitol je, kao i manitol, rasprostranjen kod velikog broja biljnih vrsta, i nastaje od glukozo-6-fosfata (G6P) ili glukoze (Almaghamsi i sar., 2021). Ovaj šećerni alkohol je zastupljen u najvećim količinama kod biljaka porodice *Rosaceae* i ima važnu ulogu u osmotskoj reakciji kod ovih vrsta u uslovima abiotičkog stresa, kao što je suša (Almaghamsi i sar., 2021). Ipak, i kod vrsta gde sorbitol predstavlja minorni sekundarni metabolit dolazi do njegove akumulacije tokom stresa suše – *Arabidopsis thaliana* (Nosarzewski i sar. 2012), ječam (Chen i sar. 2007), vinova loza (Conde i sar. 2015). Biosinteza sorbitola tokom perioda abiotičkog stresa, kada je stopa fotosinteze redukovana, je od velikog značaja jer ovaj šećer ima ulogu značajnog akceptora elektrona (eng. *electron sink*), preko regeneracije NADPH/H<sup>+</sup> od NADP<sup>+</sup>, ublažavajući visok

pritisak elektrona iz fotosistema i na taj način smanjuje rizik od prekomerne produkcije ROS. Takođe, sorbitol se odlikuje većom količinom uskladištene energije, usled hemijske redukcije, u poređenju sa šećerima. Zahvaljujući ovoj odlici, mnoge biljne vrste ga koriste za preživljavanje i aklimatizaciju na različite abiotičke faktore stresa prilagođavanjem njegovog sadržaja, raspodele i metabolizma (Jiménez i sar. 2013; Pleyerová i sar., 2022). Iako je uloga sorbitola poznata i opisana u odgovoru na stres suše i osmotskom stresu koji ona izaziva, manje se zna o njegovoj ulozi u odgovoru na NT. Ipak, postoje dokazi da je akumulacija sorbitola bitan aspekt aklimatizacije na niske temperature. Williams i Raese (1974) su pokazali da postoji negativna korelacija između temperature i sadržaja sorbitola kod *Malus sylvestris*. Takođe, NT su izazvale akumulaciju sorbitola kod listova i plodova breskve (*Prunus persica*) (Zhou i sar., 2023a). Istraživanja na *P. persica*, *M. domestica* i *Pyrus* sp. su pokazala da NT dovode i do povećanja ekspresije gena za sorbitol-6-fosfat dehidrogenazu (S6PDH), jednog od dva enzima neophodna za sintezu sorbitola (Kanayama i sar. 2006, 2007). Niske temperature takođe dovode do povećane ekspresije transportera za sorbitol, PmPMT1 i PmPMT2 (Ho i sar. 2020). Utvrđeno je da se sorbitol može sintetisati iz ugljenih hidrata endosperma pomoću sorbitol dehidrogenaze (SDH) kod klijanaca kukuruza (de Sousa i sar., 2009), ali nema mnogo podataka o akumulaciji ovog šećernog alkohola u uslovima abiotičkog stresa. Li i sar. (2023) su pokazali da nanošenje egzogenog sorbitola rezultuje povećanom tolerantnošću na sušu kod klijanaca kukuruza. Bocchini i sar. (2018) su pokazali da biofortifikacija podloge selenom dovodi do povećane ekspresije SDH tokom perioda suše, što je rezultovalo boljim preživljavanjem klijanaca kukuruza. Nisu pronađeni podaci o akumulaciji sorbitola tokom stresa NT kod kukuruza u do sada objavljenim naučnim studijama. U ovom istraživanju je utvrđeno da je došlo do značajnog povećanja nivoa ovog šećernog alkohola samo kod tretiranih klijanaca genotipa L<sub>T</sub>. Utvrđeni obrazac akumulacije sorbitola kod oba genotipa se može povezati sa obrascem akumulacije glukoze. Naime, jedan od puteva sinteze sorbitola uključuje redukciju glukoze, katalizovanu već pomenutim enzimom SDH (Almaghamsi i sar., 2021) i negativna korelacija između ova dva molekula nije iznenađujuća. Moguće je da se snižavanje nivoa glukoze kod tretiranih klijanaca genotipa L<sub>T</sub> može povezati sa sintezom sorbitola, kao i da je niži nivo sorbitola kod tretiranih klijanaca genotipa L<sub>s</sub> posledica njegove oksidacije u glukozu, čiji je nivo povišen kod ovog genotipa.

Inozitoli su familija esencijalnih cikloheksitiola i ovi šećerni alkoholi se u biljnim ćelijama mogu naći u slobodnom obliku, ali i u okviru nekoliko važnih biomolekula – inozitol-pirofosfati, fitinska kiselina, sfingolipidi (Tartaglio i sar., 2017; Marolt i Kolar, 2021). Inozitoli imaju važnu ulogu u procesima rastenja i razvića i odgovora na stres (Valluru i Van den Ende, 2011; Jia i sar., 2019). Inozitol se sintetiše od G6P ili se regeneriše od svojih derivata i svi eukariotski organizmi imaju sposobnost da izvrše njegovu fosforilaciju i na taj način sintetišu različite inozitol-fosfate koji imaju bitne uloge u signalnoj transdukciji (Su i Saiardi, 2024). Značajnu ulogu tokom odgovora na abiotički stres, imaju inozitol i inozitol fosfati, poput inozitol(1,4,5)trifosfata (IP<sub>3</sub>) i fosfatidilinozitol(4,5)bisfosfata, koji su esencijalni delovi jednog od najbitnijih signalnih puteva u biljnim ćelijama – inozitol-fosfolipidnog signalnog puta (Heilmann i Heilmann, 2015; Hou i sar., 2016). U okviru tog signalnog puta, signalizacija se vrši preko vezivanja ili uklanjanja lipida ili fosfatnih grupa sa inozitola, katalizovanih od strane niza sintaza, kinaza, fosfolipaza i fosfataza (Jia i sar., 2019). Inozitol fosfati imaju bitnu ulogu u daljoj signalizaciji. Oni mogu biti prekursori važnog sekundarnog glasnika diacilglicerola (DAG) ili su, poput IP<sub>3</sub>, sami sekundarni glasnici neophodni za inicijaciju Ca<sup>2+</sup>-signalnog puta, najvažnijeg u odgovoru na abiotički stres, uključujući NT (Jia i sar., 2019; Iqbal i sar., 2022). Takođe, mnogi autori su potvrdili da nakon izlaganja NT kod mnogih biljnih vrsta dolazi do akumulacije inozitola (Yan i sar., 2022a; Salam i

sar., 2023), uključujući i kukuruz (Urrutia i sar., 2021; Xuhui i sar., 2022). U ovom istraživanju je takođe došlo do akumulacije inozitola i kod tretiranih klijanaca kukuruza genotipova L<sub>S</sub> i L<sub>T</sub>. Rezultati ukazuju na važnost obezbeđivanja dovoljne količine inozitola za sintezu inozitol-fosfata i pokretanje signalne kaskade neophodne za odgovor na NT, nezavisno od genotipa.

Eritritol je poliol sa četiri atoma ugljenika, zastupljen u malim količinama u plodovima malog broja biljnih vrsti – kruška, vinova loza, lubenica (Mazi i Stanhope, 2023), i nema mnogo podataka o njegovoj ulozi u odgovoru na promene u životnoj sredini. Zabeležena je njegova akumulacija kod nekoliko vrsta trava tolerantnih na desikaciju – *Sporobolus stapfianus* (Oliver i sar., 2011) i *Oropetium thomaeum* tokom stresa vodnog deficita i soli, ali ne i NT (Zhang i sar., 2018). Takođe, retki su i podaci o sadržaju ovog šećera kod kukuruza, nevezano za odgovor na abiotički stres. Vincent i sar. (2019) i Zhang i sar. (2020c) su detektovali eritritol u veoma malim količinama kod nekoliko sorti kukuruza. U istraživanju klijanaca kukuruza ZP linija u fazi nicanja, usled stresa izazvanog NT, kod L<sub>T</sub> je došlo do blagog povećanja nivoa ovog šećernog alkohola kod tretiranih klijanaca, dok se kod L<sub>S</sub> desilo suprotno. Međutim, bez podataka o biosintetičkim putevima eritritola i potencijalne uloge kod biljaka, nije moguće doneti nikakve konkretne zaključke.

### **5.3. Fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature osetljivog i tolerantnog genotipa**

Fotosinteza je jedan od najvažnijih metaboličkih procesa kod biljaka i njeno uspešno odvijanje je krucijalno za rastenje i razviće (Muhammad i sar. 2021). Niske temperature negativno utiču na ovaj proces, što je dodatno izraženo kod C-4 biljaka sa osetljivijim fotosintetskim aparatom, kojima pripada kukuruz (Gururani i sar., 2015; Bilska-Kos i sar., 2018). Niske temperature pored direktnog uticaja na ćelijski integritet i metaboličke procese, takođe dovode i do stvaranja oksidativnog stresa – fotoinhibicija i ćelijska oštećenja rezultuju akumulacijom ROS (Zhou i sar., 2022b). Povećan sadržaj ROS uzrokuje dodatna oštećenja fotosintetskog aparata i inhibiciju njegove popravke (Gururani i sar., 2015). Dodatna procena i karakterizacija uticaja niskih temperatura na izabrana dva genotipa je urađena određivanjem nivoa oštećenja membranskih sistema na osnovu lipidne peroksidacije (odmah nakon završenog tretmana NT) i analizom fotosintetske efikasnosti (nakon perioda oporavka).

Tolerantnost biljaka na stres izazvan NT se takođe ogleda i u njihovoj sposobnosti da indukuju zaštitne mehanizme i na taj način neutrališu negativne efekte ROS. Biljke mogu aktivirati enzimske i neenzimske antioksidativne mehanizme koji eliminišu reaktivne kiseonične slobodne radikale i pomažu u održavanju normalnih fizioloških aktivnosti (Nadarajah, 2020). U ovom istraživanju je ispitivana uloga enzima APX, SOD, CAT i GSH-Px u odgovoru na stres izazvan NT.

#### **5.3.1. Nivo lipidne peroksidacije**

MDA je glavni proizvod peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina koje su deo strukture plazma membrana i koristi se kao marker za oksidativni stres. MDA takođe može ograničiti aktivnost zaštitnih enzima i dodatno ubrzati peroksidaciju membrane (Zhou i sar., 2022b). Stoga, MDA je u negativnoj korelaciji sa tolerantnošću na NT kod različitih genotipova kukuruza. Brojna istraživanja su pokazala da snižavanje temperature i produžavanje izlaganja stresu NT rezultuje povećanim sadržajem MDA, kao i da je to povećanje slabije izraženo kod tolerantnih genotipova (Zhao i sar., 2022b; Zhou i sar., 2022b).

U ovom istraživanju, analiza nivoa lipidne peroksidacije nije pokazala očekivane rezultate. Naime, kod osetljivog genotipa je došlo do statistički značajne akumulacije MDA kod tretiranih

klijanaca, što je na osnovu prethodno navedenog i očekivano. Međutim, kod  $L_T$ , je nivo MDA bio značajno veći kod kontrolnih klijanaca. Poznato je da je lipidna peroksidacija posledica dugotrajnog skladištenja semena (Wojtyla i sar., 2016; Lin i sar., 2022), i time bi se mogao objasniti visok nivo MDA u kontrolnim klijancima, ali ne niže vrednosti kod tretiranih klijanaca.

### **5.3.2. Aktivnost peroksidaze (POD)**

Peroksidaze obuhvataju veliku familiju enzima odgovornih za katalizu oksidacije  $H_2O_2$  kao donora elektrona pomoću različitih supstrata kod raznovrsnih organizama (Cheng i sar., 2022). Ovi enzimi učestvuju u peroksidnom, oksidativnom i hidrosil ciklusu i na taj način omogućuju i eliminaciju i formiranje ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , and  $OH^-$ ) (Kidwai i sar., 2020). Dakle, peroksidaze se smatraju bifunkcionalnim enzimima, neophodnim za održavanje optimalnih intracelularnih nivoa  $H_2O_2$  – koncentracija u kojima funkcioniše kao sekundarni glasnik, a ne izaziva oksidativni stres (Passardi i sar., 2004). Kod biljaka se peroksidaze mogu podeliti na tri klase slične trodimenzionalne strukture. Fokus najvećeg broja istraživanja kod biljaka su peroksidaze klase III (POD) koje kao supstrate koriste fenolna jedinjenja. Ovi enzimi su identifikovani kod velikog broja biljnih vrsta (Cheng i sar., 2022) i pokazano je da imaju veliki broj raznovrsnih uloga u mnogim fiziološkim i procesima razvića, uključujući metabolizam ćelijskog zida, tolerantnost na abiotički stres i otpornost na biotičke faktore stresa (Pandey i sar., 2017b).

Pokazano je da niske temperature dovode do povećane ekspresije različitih gena koji kodiraju POD kod različitih biljnih vrsta (Kim i sar., 2012; Kidwai i sar., 2020). Povećan nivo POD, kao i ekspresije gena koji ih kodiraju, je potvrđen i kod kukuruza nakon izlaganja različitim abiotičkim faktorima stresa, uključujući niske temperature (Jin i sar., 2021b; Ramazan i sar., 2021; Zhao i sar., 2022b). U ovom istraživanju su dobijeni očekivani rezultati – došlo je do povećanja nivoa POD kod tretiranih klijanaca kukuruza oba genotipa, što ukazuje na to da POD predstavljaju značajnu komponentu antioksidativnih mehanizama, uključen u odgovor na NT nezavisno od genotipa.

### **5.3.3. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX)**

Askorbat-peroksidaze pripadaju velikoj familiji hem-peroksidaza, kao i POD, odgovornih za  $H_2O_2$ -zavisnu oksidaciju velikog broja organskih molekula. U slučaju APX to je askorbinska kiselina (Pandey i sar., 2017a). Aktivnost APX se često povećava u prisustvu drugih antioksidativnih enzima, poput SOD i glutation reduktaze, što ukazuje na međusobnu regulaciju i interakciju između određenih antioksidativnih enzima. Različiti izozimi APX su klasifikovani na osnovu njihove ćelijske lokalizacije (citosol, peroksisomi, hloroplasti i mitohondrije) i kodirani su od strane više *apx* gena iz iste multigeneske familije. Zastupljenost različitih formi enzima u više subćelijskih kompartmenata, kao i činjenica da je cela familija indukovana tretmanom ABA, naglašava njihov značaj u procesima rastenja i razvića, kao i uspostavljanju tolerantnosti na stres (Pandey i sar., 2017a).

Ekspresija *apx* gena i akumulacija APX su indukovane različitim oblicima biotičkog (patogeni, herbivori) i abiotičkog stresa (soli, suša, ekstremne temperature). Step en akumulacije APX je u direktnoj korelaciji sa dužinom izlaganja i intenzitetom stresa (Pandey i sar., 2017a). Akumulacija APX nakon izlaganja NT je dokazana kod velikog broja biljnih vrsta (Dreyer i Dietz, 2018), uključujući kukuruz. Brojna istraživanja su pokazala da NT indukuje ekspresiju *apx* i da je akumulacija ovog enzima veća kod tolerantnih genotipova (Ramazan i sar., 2021; Zhao i sar., 2022b; Lainé i sar., 2023). U ovom istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana, nivo APX je bio niži kod tretiranih klijanaca oba genotipa, međutim ustanovljena razlika nije statistički značajna. Ramazan i sar. (2021) su utvrdili da APX kod kukuruza ima specifične vremenske obrasce akumulacije – tokom prvih 8h se njihov nivo povećava nakon izlaganja NT, nakon čega

opada. Na primer, nakon 12h je nivo APX kod tretiranih biljaka skoro četiri puta niži nego nakon 8h. Prema tome, moguće je da su APX uključene u antioksidativne mehanizme u inicijalnom odgovoru na stres, a nakon dužeg izlaganja stresu njihova aktivnost opada, što bi objasnilo nedostatak statistički značajne razlike između kontrole i tretmana kod L<sub>s</sub> i L<sub>T</sub>.

#### **5.3.4. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX)**

Glutation-peroksidaze (GPX), za razliku od POD i APX, ne sadrže hem kao kofaktor u svom aktivnom mestu, već cistein. Biljne GPX su široko rasprostranjeni enzimi, prisutni u različitim biljnim tkivima, ćelijskim odeljcima i stadijumima razvića, a njihova aktivnost se može povezati sa aktivnošću glutation transferaza (GST). Takođe, biljne GPX su efikasnije u redukciji organskih i lipidnih peroksida u odnosu na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rodriguez Milla i sar., 2003). Uloga GPX u detoksifikaciji lipidnih peroksida i drugih ROS je uočena kod različitih biljnih vrsta i tokom izlaganja raznovrsnim abiotičkim faktorima stresa (He i sar., 2017; Hasanuzzaman i sar., 2020; Madhu i sar., 2023).

Sugimoto i Sakamoto (1997) su uočili povećanu ekspresiju *AtGPX6* nakon tri dana izlaganja temperaturi od 4 °C kod *Arabidopsis thaliana*. Slično je pokazano i za *AtGPX7* – nakon tretmana NT od 24h, ekspresija ovog gena je bila značajno povećana (Islam i sar. 2014). Povećana ekspresija određenih *GPX* gena je uočena i kod pirinča (Passaia i sar. 2013; Zhao i sar. 2015), indijskog lotosa, *Nelumbo nucifera* (Diao i sar. 2014), i ginsenga (*Panax ginseng*) (Kim i sar. 2014). Nema mnogo podataka o ulozi GPX u odgovoru na abiotičke faktore stresa kod kukuruza. Zhan i sar. (2017) su pokazali da izlaganje biljaka kukuruza povećanoj koncentraciji kadmijuma rezultuje akumulacijom GPX. Rohman i sar. (2019) su uočili da akumulacija GPX ima ulogu u odgovoru na povećan nivo soli u podlozi, kao i na nedostatak fosfora. U istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana nije uočena statistički značajna razlika između nivoa GPX u kontrolnim uslovima i uslovima tretmana, kod obe ispitivane linije kukuruza (L<sub>s</sub> i L<sub>T</sub>), što ukazuje na mogućnost da ovi enzimi nemaju značajnu ulogu u antioksidativnim mehanizmima tokom faze nicanja kod kukuruza.

#### **5.3.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)**

Superoksid dismutaza (SOD) je antioksidativni enzim odgovoran za dismutaciju superoksidnih radikala (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) na molekularni kiseonik i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, rasprostranjen kod velikog broja prokariotskih i eukariotskih organizama. SOD su prisutne u različitim delovima ćelije (citosol, hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi) i kompartmentalizacija SOD izozima je od presudnog značaja za brzi odgovor i zaštitu ćelijskih organela od oksidativnog stresa indukovano različitim abiotičkim faktorima. Takođe, s obzirom da u reakciji koju katalizuju SOD dolazi do oslobađanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aktivnost navedenih enzima je važna i za regulaciju nivoa ovog molekula u ćeliji (del Río i sar., 2018).

Superoksid dismutaze predstavljaju prvu liniju odbrane i neutralizacije toksičnih ROS (Gill i Tuteja, 2010) i aktivnost ovih enzima predstavlja deo glavnih mehanizama uklanjanja kiseoničnih slobodnih radikala u biljnim ćelijama (Rajput i sar., 2021). Stoga, nije iznenađujuće da je njihova akumulacija vezana za odgovor na raznovrsne abiotičke faktore stresa (Rajput i sar., 2021; Ali i sar., 2024). Nivo aktivnosti SOD kod kukuruza je bio povećan kod biljaka izloženih stresu NT u velikom broju istraživanja (Sun i sar., 2020; Ramazan i sar., 2021; Meng i sar., 2022; Zhao i sar., 2022b). Takvi rezultati su uočeni i u istraživanju kukuruza u VE fazi – nivo SOD je bio veći kod tretiranih klijanaca oba genotipa. Interesantno je da je akumulacija SOD bila izraženija kod genotipa L<sub>s</sub> (≈30%), što pokazuje da je odgovor na oksidativni stres izazvan NT bio izraženiji. Ipak, kod genotipa L<sub>T</sub> je nivo SOD u kontrolnim uslovima bio sličan onom kod tretiranih klijanaca

genotipa  $L_s$ . Ovo ukazuje na mogućnost da je tolerantan genotip bio prilagođeniji za reakciju na promene u životnoj sredini, te nagla akumulacija ovog enzima nije bila preko potrebna.

### **5.3.6. Aktivnost katalaze (CAT)**

Katalaze (CAT) su enzimi locirani u biljnim peroksizomima i zajedno sa POD, one su ključni enzimi odgovoran za katalitičku neutralizaciju  $H_2O_2$ , transformacijom u vodu i molekularni kiseonik (Leung, 2018). Za razliku od POD i APX, CAT ne zahtevaju prisustvo redukujućeg agensa za svoju katalitičku aktivnost, već u tu svrhu koriste jone gvožđa prisutne u aktivnom mestu enzima. Kao POD i APX, i CAT su uključene u proces održavanja nivoa  $H_2O_2$  u minimalnim koncentracijama, koje ne izazivaju ćelijska oštećenja. Ipak, katalaze imaju veće vrednosti Mikhaeliseve konstante ( $K_m$ ) za  $H_2O_2$ , što znači da su aktivnije pri većim koncentracijama ovog molekula (Rajput i sar., 2021). Aktivnost katalaza raste kao deo antioksidativne odbrane, u okviru odgovora na različite abiotičke faktore stresa (Leung, 2018; Rajput i sar., 2021). Navedena uloga katalaza je potvrđena i u različitim istraživanjima na kukuruзу (Ali i sar., 2024). Kada je reč o niskim temperaturama, brojna istraživanja potvrđuju povećanje aktivnosti ovog enzima kod biljaka kukuruza izloženih ovom faktoru stresa (Cao i sar., 2019; Ramazan i sar., 2021; Zhao i sar., 2022b). Ipak, postoje rezultati istraživanja koji pokazuju suprotno. Meta analiza Lainé i sar. (2023) je pokazala da ne postoji korelacija između izlaganja NT i akumulacije CAT kod kukuruza.

Iako je došlo do povećane akumulacije CAT u tretiranim klijancima oba genotipa, ova razlika između kontrole i tretmana je bila statistički značajna samo kod genotipa  $L_s$ . Veća aktivnost CAT kod  $L_s$  se potencijalno može povezati sa već pomenutom činjenicom da je ovaj enzim aktivniji pri većim koncentracijama  $H_2O_2$  – moguće je da temperature tretmana kod  $L_T$  ne dovode do oksidativnog stresa istog intenziteta kao i kod  $L_s$ , zbog čega nivo aktivnosti antioksidativnih enzima nije povišen u istoj meri kao kod osetljivog genotipa.

### **5.3.7. Fotosintetska efikasnost**

Niske temperature negativno utiču na fotohemijsku efikasnost PSI i PSII, sintezu hlorofila, aktivnost enzima Kalvinovog ciklusa kao što je Rubisco (Muhammad i sar. 2021), a ROS nastale tokom abiotičkog stresa dodatno oštećuju fotosisteme (Gururani i sar., 2015). Početni koraci fotosinteze koji se odvijaju u okviru PSI i PSII, gde dolazi do transformacije svetlosne u redoks energiju su veoma osetljivi na NT. Niske temperature indukuju gubitak fotosintetičkog kapaciteta tako što smanjuju broj funkcionalnih PSII reaktivnih centara i time ograničavaju maksimalnu gustinu fotona koja se može iskoristiti za transformaciju energije. Takođe, NT dovode i do redukovanog kapaciteta transfera elektrona. Inhibirana sinteza hlorofila prouzrokuje neravnotežu između fotosistema i antena-kompleksa. Izlaganje niskim temperaturama pri dovoljnom svetlosnom intenzitetu izaziva lipidnu peroksidaciju hloroplastnih membrana i hlorozu, što rezultuje fotoinhibicijom. Fotoinhibicija takođe limitira mogućnost popravke fotosistema, dodatno pojačavajući negativan efekat NT (Ensminger i sar. 2006; Paredes i Quiles, 2015; Banerjee i Roychoudhury, 2019).

Parametri fluorescencije hlorofila ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $Y(NO)$ ,  $Y(NPQ)$ , ETR) su direktni pokazatelji efikasnosti PSII, naročito  $F_v/F_m$  (Adams i sar., 2014; Hajihashemi i sar., 2018). Negativan uticaj niskih temperatura na efikasnost fotosintetskog transporta elektrona je potvrđen pomoću ovih parametara kod brojnih biljnih vrsta (Hajihashemi i sar., 2018; Li i sar., 2019a; Xu i sar., 2022b), uključujući i kukuruz (Riva-Roveda i sar., 2016; Wu i sar., 2022). Takođe, u nekim slučajevima, navedeni vid redukcije fotosintetske efikasnosti može biti vid zaštite fotosintetskog aparata od nepovoljnih promena u životnoj sredini, ali mora biti praćen povećanjem disipacije svetlosne energije u obliku toplote ( $Y(NPQ)$ ) (Hajihashemi i sar., 2018). U ovom istraživanju nakon sedam dana oporavka nije bilo statistički značajne razlike između

kontrole i tretmana za većinu parametara kod oba genotipa (Y(NO), Y(NPQ), ETR). Ipak, statistički značajna razlika je uočena za maksimalni kvantni prinos fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) i fotohemijsku efikasnost fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ). Naime kod osetljivog genotipa, vrednosti ovih parametara su bile niže kod tretiranih klijanaca nakon oporavka. S obzirom na to da nije došlo do povećanja Y(NPQ), navedena redukcija nije povezana sa zaštitom fotosistema, već potvrđuje negativan uticaj NT na normalno odvijanje fotosintetskih procesa kod  $L_s$ . Negativan uticaj nije uočen kod biljaka genotipa  $L_T$ , što ukazuje da NT nisu značajno oštetile fotosintetski aparat ili da se on brže oporavlja od posledica niskih temperatura.

### **5.3.8. Karakterizacija odgovora na niske temperature**

Analiza fizioloških i biohemijskih parametara nakon izlaganja niskim temperaturama klijanaca  $L_s$  i  $L_T$  genotipa je dodatno potvrdila kontrastnu tolerantnost na NT, prethodno utvrđenu na osnovu stope preživaljavanja i morfoloških parametara, i ukazala na potencijalne mehanizme koji se nalaze u njenoj osnovi.

Intenzitet negativnog uticaja niskih temperatura na ćelijski integritet i normalno odvijanje fizioloških procesa izabranih genotipova je utvrđen na osnovu nivoa fotosintetske efikasnosti i oštećenja membranskih sistema. Pokazano je da su niske temperature imale izraženiji negativni efekat na biljke genotipa  $L_s$  – fotosintetska efikasnost je redukovana kod tretiranih biljaka, a takođe je povećan i nivo MDA, što ukazuje na oštećenja membranskih sistema. Ove promene nisu uočene kod  $L_T$ , što vodi ka zaključku da je taj genotip ima izraženije sposobnosti za ublažavanje negativnih efekata NT.

Aktivacija odbrambenih mehanizama je takođe ispitana kod genotipa  $L_s$  i  $L_T$  – analiziran je sadržaj flavonoida, fenolnih kiselina, šećera i šećernih alkohola, kao i nivo aktivnosti antioksidativnih enzima (POD, APX, GPX, SOD, CAT). Životna faza u kojoj su se klijanci nalazili tokom izlaganja niskim temperaturama je negativno uticala na uspešan odgovor na ovaj faktor stresa. Naime, klijanci su u trenutku uzorkovanja bili u heterotrofnoj fazi, u kojoj još uvek nije u potpunosti uspostavljena fotosinteza i hranljive materije su poreklom iz endosperma semena. U ovoj fazi sinteza neenzimskih antioksidanasa (polifenolna jedinjenja) i osmoprotektanata (šećeri i šećerni alkoholi) se u najvećoj meri zasnivala na transformaciji već dostupnih rezervnih materija. Ovo je moguće objašnjenje za opadanje nivoa ukupnih fenolnih jedinjenja i većine šećera kod tretiranih klijanaca oba genotipa (fruktoza, saharoza, rafinoza). Sa druge strane, sadržaj jedinjenja sa poznatom ulogom u odgovoru na NT, poput trehaloze i inozitola, je bio povećan kod tretiranih klijanaca oba genotipa. Od značaja za razumevanje razlike u tolerantnosti ova dva genotipa jeste i činjenica da su kod tretiranih klijanaca genotipa  $L_s$  uočeni povećani nivoi molekula koji signaliziraju potrebu za inhibicijom rastenja i aktivacijom signalnih puteva odgovornih za odgovor na stres – flavonoli (rutin, kvercetin, izoramnetin, astragalin) i glukoza. Ovi obrasci nisu uočeni kod  $L_T$ , što se može povezati i sa većim vrednostima izmerenih morfoloških parametara ovog genotipa ( $SM$ ,  $D_{rad}$  i  $D_{kol}$ ). Takođe, potvrdom potencijalne aktivacije odbrambenih mehanizama, po cenu rastenja i morfogeneze, može se smatrati činjenica da je nivo aktivnosti antioksidativnih enzima bio veći kod genotipa  $L_s$ . Navedeno potvrđuje da je  $L_T$  značajno tolerantniji na stres izazvan NT, od genotipa  $L_s$ .

## **5.4. Promene na nivou transkriptoma izazvane niskim temperaturama**

Obezbeđivanje zadovoljavajuće proizvodnje i visokog prinosa kukuruza, uprkos izazovnim uslovima koje uzrokuju klimatske promene, je od izuzetnog značaja za poljoprivredu i zadovoljavanje potreba za hranom sve veće ljudske populacije. Budući da je rana setva jedna od najperspektivnijih strategija za postizanje ovog cilja (Collins i Chenu, 2021; Zhu i sar., 2022),

stvaranje genotipova tolerantnih na stres izazvan niskim temperaturama u ranim vegetativnim fazama postaje prioritet. U ovom istraživanju, fokus je bio na analizi promena izazvanih tretmanom NT na nivou transkriptoma kod klijanaca kukuruza u VE fazi. Urađeno je sekvenciranje ukupnog transkriptoma, praćeno opsežnim bioinformatičkim analizama kako bi se izvršila kategorizacija, kvantifikacija i funkcionalna anotacija različitih klasa RNK molekula i otkrile moguće interakcije između njih, radi boljeg razumevanja svih aspekata odgovora na niske temperature u fazi nicanja kukuruza. Bioinformatičkim analizama identifikovano je više hiljada gena, miRNK, lncRNK i circRNK eksprimiranih u klijancima oba genotipa. Diferencijalna ekspresija između kontrolnih uslova i tretmana i time moguća uloga u odgovoru na stres NT u uspostavljanju tolerantnosti detektovana je za 508 gena, 63 lncRNK i 649 miRNK.

### **5.4.1. Geni uključeni u odgovor na NT**

#### **5.4.1.1. PCA i HCA**

Odnosi i korelacije u ekspresiji gena između kontrole i tretmana, dužine izlaganja stresu (6h i 24h), kao i između dva genotipa su analizirane pomoću PCA i HCA analize. PCA analiza je pokazala da se više od 70% varijabilnosti u genskoj ekspresiji može objasniti pomoću prve dve glavne komponente, PC1 i PC2. Na osnovu obrazaca ekspresije gena koji su bili obuhvaćeni sa prve dve glavne komponente, uočeno je jasno razdvajanje između uzoraka. PC1 je obuhvatala sve gene čija se ekspresija jasno razlikovala između kontrole i tretmana, dok je PC2 istakla razlike koje postoje između dva genotipa, nezavisno od tretmana.

Sa druge strane, HCA je pokazala da se uzorci prvo grupišu na osnovu eksperimentalnih uslova – osam uzoraka je prvo razdvojeno na osnovu tipa tretmana (kontrola i tretman NT), u okviru te skupine, sledilo je grupisanje na osnovu dužine tretmana (6h ili 24h), a tek na kraju na osnovu linije, odnosno porekla. Rezultati pokazuju da je tretman niskim temperaturama imao značajan efekat na ekspresiju gena nevezano od genotipa, kao i da postoje sličnosti u odgovoru na ovaj faktor stresa kod ispitivanih linija.

#### **5.4.1.2. Diferencijalno eksprimirani geni uključeni u proces fotosinteze**

Na osnovu GO analize, najveći procenat DE gena je bio funkcionalno obogaćen za proces fotosinteze. Negativan uticaj niskih temperatura na fotosintezu je opisan u prethodnom poglavlju (5.3 Fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature osetljivog i tolerantnog genotipa). U ovom istraživanju je pokazano da kod kukuruza u fazi nicanja, niske temperature utiču na sklapanje i uspostavljanje PSI i PSII, uspostavljanje i stabilnost LH kompleksa i aktivnost enzima Rubisco. Takođe, niske temperature su aktivirale i određene odbrambene odgovore neophodne za ublažavanje oksidativnih oštećenja uzrokovanih destabilizacijom fotosintetskog aparata.

##### **5.4.1.2.1. Uticaj niskih temperatura na fotosisteme**

Niske temperature su imale negativan uticaj na integritet oba fotosistema. Geni koji kodiraju strukturne proteine reaktivnih centara PSI i PSII, kao i komponente antena kompleksa su se odlikovali smanjenim nivoom ekspresije kod tretiranih klijanaca oba genotipa. Među ovim genima bili su *psa* geni neophodni za sklapanje reaktivnog centra PSI (Ozakca, 2013), *psb* geni potrebni za uspostavljanje i stabilnost reaktivnog centra PSII (Pagliano i sar., 2013) i nekoliko gena odgovornih za ekspresiju hloroplastnih hlorofil a/b vezujućih proteina (eng. *chlorophyll a-b binding*, CAB) LH kompleksa (*cab*, *lhca* geni). CAB proteini su sastavni delovi antena LH kompleksa oba fotosistema (Zhao i sar., 2020). Antena (LH) kompleksi su neophodni za inicijaciju fotohemijskih reakcija, održavanje strukture tilakoidnih membrana i regulaciju distribucije ekscitacione energije između PSI i PSII (Gan i sar., 2019).

Smanjena ekspresija *psa*, *psb*, *lhc* i *cab* gena u uslovima niskih temperatura je opisana kod brojnih biljnih vrsta uključujući kukuruz. Na primer, nivo *psaB* i *psbA* kod *Arabidopsis thaliana* se smanjivao sa produžavanjem izlaganja niskim temperaturama (Velitchkova i sar., 2020). Utišavanje *SILhcb1.11* gena je rezultovalo većom osetljivošću na niske temperature kod paradajza (Meng i sar., 2025). Yu i sar. (2021a) su pokazali da je kod kukuruza nakon 12h tretmana NT došlo do smanjene ekspresije *psb29*, a Balassa i sar. (2022) da je nakon 24h tretmana detektovana smanjena ekspresija više *psa*, *psb* i *lhc* gena. Banović Đeri i sar. (2022) su takođe detektovali smanjenu ekspresiju gena *psbE* i *psbI*.

Kod klijanaca kukuruza starih pet dana ispitivanih u ovom istraživanju je uočena interesantna razlika u obrascima ekspresije ovih gena kod  $L_S$  i  $L_T$ . Kod osetljivog genotipa, 13 gena se odlikovalo smanjenom ekspresijom nakon 6h (*psaD*, *psaE*, *psaG*, *psaH*, *psaL*, *psaN*, *psbP*, *psbQ-1*, *cab1*, *cab7*, *cab48*, *lhcA-p4*, *lhcB5*) i većina navedenih gena se odlikovala sniženom ekspresijom i nakon 24h (*psaE*, *psaG*, *psaL*, *psaN*, *psbP*, *psbQ-1*, *cab1*, *cab7*). Ovi rezultati pokazuju da se kod  $L_S$  fotosistemi ne oporavljaju nakon 24h – ne dolazi do aklimatizacije i ekspresija gena neophodnih za uspostavljanje PSI i PSII je i dalje snižena. Sa druge strane,  $L_T$  se odlikovao manjim brojem gena čija je ekspresija bila snižena nakon 6h (*psaD*, *psaG*, *psaL*, *psbP*, *psbQ-1*, *lhcA-p4*, *lhcB5*, *cab1*, *cab7*, *cab48*), od čega je ekspresija svega tri gena (*psaG*, *psbQ-1*, *cab7*) bila smanjena u obe vremenske tačke. Dakle, kod tolerantnog genotipa, već nakon 24h tretmana, nije bilo statistički značajne razlike između kontrole i tretmana kod većine navedenih gena, što pokazuje bržu aklimatizaciju na uslove NT i može da se poveže sa bržim oporavkom nakon vraćanja u optimalne uslove, što je pokazano u prethodnom poglavlju (5.2.2.7 *Fotosintetska efikasnost*).

#### 5.4.1.2.2. Uticaj niskih temperatura na enzime Kalvinovog ciklusa

Više gena uključenih u regulaciju Kalvinovog ciklusa i aktivnost enzima Rubisco je bilo diferencijalno eksprimirano između kontrolnih i uslova NT, uključujući gene koji kodiraju Rubisco aktivazu (*rca*), proteine neophodne za sklapanje enzima Rubisco (*rbcx2*) i fosforibulokinaze (*prk*).

Aktivnost enzima Rubisco je jedan od glavnih faktora koji određuje stopu i pravilno odvijanje fotosinteze u optimalnim i u uslovima niskih temperatura – naročito kod C4 biljaka. C4 biljke se odlikuju nižim nivoom aktivnosti i manjim kapacitetima ovog enzima, u poređenju sa C3 biljkama (Salesse-Smith i sar., 2020). Salesse-Smith i sar. (2020) su takođe pokazali da povećana količina enzima Rubisco rezultuje tolerantnošću na niske temperature. Stoga, obezbeđivanje visoke aktivnosti ovog enzima je esencijalno za održavanje intenziteta fotosinteze neophodnog za preživljavanje tokom abiotičkog stresa. Rubisco aktivaza (RCA), kodirana od strane *rca* gena, je odgovorna za regulaciju aktivnosti ovog enzima (Bracher i sar., 2017). Povećana ekspresija *rca* rezultuje i povećanom stopom fotosinteze i većom produktivnošću (Zhang i sar., 2019e; Feng i sar., 2023). Analiza više od 400 genotipova kukuruza je pokazala pozitivnu korelaciju između ekspresije ovog gena i prinosa (Zhang i sar., 2019e). Ne postoji mnogo podataka o uticaju niskih temperatura na *rca*, ali je njegova ekspresija bila povećana pod uticajem drugih abiotičkih faktora stresa kod kukuruza (Salesse-Smith i sar., 2018; Sparrow-Muñoz i sar., 2023). Perdomo i sar. (2017) su pokazali da visoke temperature i kombinacija visokih temperatura i vodnog deficita dovode do povećanja nivoa RCA u ćelijama, dok sam vodni deficit izaziva redukciju u količini ovog enzima. U ovom istraživanju, kod klijanaca starih pet dana izloženih niskim temperaturama, ekspresija *rca* je bila smanjena kod oba genotipa. Interesantno je što je ekspresija *rbcx2* gena koji kodira jedan od proteina neophodnih za sklapanje i uspostavljanje enzima Rubisco, hloroplastnog RbcX proteina nalik na šaperonin 2, bila povećana kod oba genotipa nakon 6h. Poznato je da RbcX proteini imaju ulogu šaperona tokom uspostavljanja enzima Rubisco kod

cijanobakterija (Li i sar., 2022c), ali su njihovi homolozi pronađeni i kod viših biljaka, gde imaju sličnu ulogu (Kolesiński i sar., 2011). Kod kukuruza i *Arabidopsis thaliana* postoje dva *rbcx* gena – *rbcx1* i *rbcx2*. Navedeni geni su eksprimirani i u mezofilu, a *rbcx2* se odlikuje većim nivoima ekspresije od *rbcx1* (Wostrikoff i sar., 2012). Smatra se da RbcX2 ima ulogu neke vrste pojačivača prilikom sklapanja enzima Rubisco – čak i u njegovom odsustvu doćiće do formiranja enzima Rubisco, ali u 50% manjoj meri nego u njegovom prisustvu (Aigner i sar., 2017; Vitlin Gruber i Feiz, 2018). Prema saznanju autora, ovo je prvi put da je opisana diferencijalna ekspresija *rbcx2* u uslovima bilo kog abiotičkog stresa i bilo koje biljne vrste.

Ekspresija gena koji kodira fosforibulokinazu (*prk*) je bila smanjena nakon 24h. Fosforibulokinaze su uključene u fazu regeneracije Kalvinovog ciklusa (Gurrieri i sar., 2021). PRK katalizuju ATP-zavisnu fosforilaciju ribulozo-5-fosfata (Ru5P), čime se formira ribulozo-1,5-bisfosfat neophodan za fiksaciju CO<sub>2</sub> (Yu i sar., 2020). Tokom ekspanzije listova u optimalnim uslovima dolazi i do asimilacije enzima Kalvinovog ciklusa, uključujući PRK (Yamaoka i sar., 2016). Ekspresija *prk* gena je bila smanjena kod oba genotipa nakon izlaganja niskim temperaturama u ovom istraživanju što ukazuje na to da su niske temperature imale negativan efekat na ekspanziju listova – taj efekat je bio izraženiji kod osetljivog genotipa. Kao i za *rca* i *rbcx2*, ne postoji mnogo podataka o ekspresiji *prk* tokom abiotičkog stresa kod kukuruza. Hu i sar. (2012) su pokazali da suša izaziva redukciju u aktivnosti ovog enzima kod kukuruza. Jiang i sar. (2025) su pokazali da stres soli dovodi do smanjenja ekspresije *prk* u V3 fazi, dok podaci o ekspresiji *prk* tokom stresa izazvanog NT nisu pronađeni. Međutim, smanjena ekspresija ovog gena je utvrđena kod biljaka Iranske pšenice nakon izlaganja niskim temperaturama (Rinalducci i sar., 2011). Takođe, Banović Đeri i sar. (2022) su pokazali da kod kukuruza tokom stresa izazvanog NT postoji korelacija između ekspresije gena za hloroplastni CP12 protein Kalvinovog ciklusa (CCP12) i gena dva enzima – *prk* i hloroplastne gliceraldehid-3-fosfatne dehidrogenaze (GAPDH). CCP12 učestvuje u negativnoj regulaciji PRK i GAPDH, na šta utiče i koncentracija tireodoksina – povećana koncentracija redukovano tireodoksina sprečava formiranje GAPDH/CP12/PRK kompleksa. Takođe, tokom dužeg izlaganja niskim temperaturama genotipovi koji pripadaju Lankaster heterotičnoj grupi, kojoj pripada i Ls, se nisu odlikovali uspešnim povratkom na normalan nivo aktivnosti enzima GAPDH i PRK (Banović Đeri i sar., 2022).

Rezultati pokazuju da su niske temperature imale negativan efekat i na biohemijsku fazu fotosinteze kod klijanaca kukuruza starih pet dana, ograničavajući fiksaciju CO<sub>2</sub> i regeneraciju ribuloze kod oba genotipa. Međutim, negativne promene u ekspresiji *rca* i *prk* su bile izraženije kod Ls, dok je ekspresija *rbcx2* neophodnog za sklapanje esencijalnog enzima Rubisco bila veća kod Lr. Ovo je moguće objašnjenje za bolji oporavak Kalvinovog ciklusa nakon 24h kod tolerantnog genotipa.

#### 5.4.1.2.3. Uticaj niskih temperatura na fotoinhibiciju i aktivirane zaštitne mehanizme

Oštećenja oba fotosistema i redukcija aktivnosti enzima Kalvinovog ciklusa mogu dovesti do značajnog smanjenja fotosintetske efikasnosti. Niža fotosintetska efikasnost rezultuje inhibiranim elektronskim transportom, povišenim nivoom ROS i fotoinhibicijom (Gan i sar., 2019). U daljim koracima fotoinhibicija može dovesti do previsoke ekscitacije i gubitka strukturnog integriteta PSII (Tikkanen i Aro, 2014), kao i do onemogućavanja reparacije oštećenja na PSII (Nishiyama i Murata, 2014).

Protein D1, sastavni deo fotosistema II, je neophodan za njegovu reparaciju i kodiran je od strane *psbA* gena (Gururani i sar., 2015). U ovom istraživanju, *psbA* nije bio diferencijalno eksprimiran između kontrole i tretmana. Međutim, gen koji kodira karboksil peptidazu C-terminalne obrade 2 (*ctpa2*), neophodnu za obradu C-kraja i aktivaciju samog D1 proteina (Che i

sar., 2013) se odlikovao povećanom ekspresijom kod tretiranih klijanaca oba genotipa nakon 6h. CtpA katalizuju odsecanje (eng. *cleavage*) ekstenzije C-kraja od 8 do 16 aminokiselina prekursora proteina D1, tokom sklapanja ili reparacije PSII, čime se dobija njegova finalna forma (Lu, 2016). Sowiński i sar. (2020) su pokazali da niske temperature dovode do povećane ekspresije *ctp2* kod kukuruza. Na osnovu ekspresije gena neophodnih za sintezu i aktivaciju proteina D1 može se zaključiti da, iako se nije razlikovala između kontrolnih i uslova tretmana, aktivacija ovog proteina se vršila samo u uslovima niskih temperatura, kao način da se osiguravanja popravke oštećenja PSII.

Rezultati ukazuju da su, pored mera za obnavljanje fotosistema II, aktivirane i dodatne zaštitne mere, radi eliminacije štetnih efekata ROS i fotoinhibicije, kao što su sinteza ELIP proteina (eng. *early light-inducible protein*, ELIP) i glutaredoksina. ELIP proteini štite hloroplaste od foto-oštećenja, olakšavanjem disipacije energije koja štiti PSII od fotoinhibicije (Liu i sar., 2020c). Oni pripadaju grupi proteina sličnih proteinima LH kompleksa i odlikuju se hlorofil-vezujućim motivima. Geni koji kodiraju ELIP proteine se dugo proučavaju kao geni čija povećana ekspresija rezultuje i povećanjem tolerantnosti na stres izazvan previsokim intenzitetom svetlosti (Lee i sar., 2020). Kod kukuruza, kao i kod *Arabidopsis thaliana*, postoje dve izoforme ovog proteina – ELIP1 i ELIP2, kodirane od strane *elip1* i *elip2* gena za koje je poznato da imaju ulogu u fotooksidativnoj zaštiti pod visokim osvetljenjem (Heddad i sar., 2006; Lee i sar., 2020). Ipak, rana istraživanja sa *elip1/elip2* mutantima su ukazala na mogućnost modulacije ksantofilnog ciklusa od strane ovih proteina, kao i njihove zaštitne uloge tokom različitih tipova stresa (Rossini i sar., 2006). Slično tome, pokazano je da se ekspresija *elip* gena često povećava pri kombinovanim uslovima stresa, npr. svetlost visokog intenziteta i niske temperature (Han i Kim, 2013; Lee i sar., 2020). Više istraživanja je pokazalo da i samo izlaganje niskim temperaturama, pri normalnoj svetlosti, takođe dovodi do indukcije ekspresije *elip* gena kod različitih biljnih vrsta (Zhuo i sar., 2013; Wang i sar., 2014a; Hayami i sar., 2015). Međutim, za kukuruz nisu pronađeni podaci o ekspresiji navedenih gena tokom stresa izazvanog NT. U ovom istraživanju, kod  $L_S$  je došlo do povećane ekspresije *elip2*, a kod  $L_T$  i *elip1* i *elip2*. Iako nema podataka o regulaciji ekspresije ovih gena kod kukuruza, Rizza i sar. (2011) su pokazali da su *elip1* i *elip2* u uslovima abiotičkog stresa bili nezavisno regulisani kod *Arabidopsis thaliana*, što se poklapa sa rezultatima ovog istraživanja. Činjenica da je kod  $L_T$  bila povećana ekspresija oba *elip* gena, a kod  $L_S$  samo *elip2*, ukazuje na mogućnost aktivacije ovih gena kao faktora u uspostavljanju tolerantnosti na niske temperature kod klijanaca kukuruza starih pet dana.

Dva gena koja kodiraju glutaredoksine su pokazala povećanu ekspresiju kod tretiranih klijanaca nakon 6h - *GRXS17* kod  $L_S$ , i *GRXS5* i *GRXS17* kod  $L_T$ . Glutaredoksini (GRX) su male, široko rasprostranjene, GSH-zavisne oksidoreduktaze, uključene u odgovor na oksidativni stres kod velikog broja eukariota (Meyer i sar., 2009; Li, 2014). GRX su sposobni da reverzibilno redukuju disulfidne mostove proteina kroz nekoliko različitih mehanizama i na taj način post-translaciono utiču na proteinske ili transkripcione aktivnosti, modulacijom transkripcionih faktora (Li, 2014). Ovi enzimi su kod *Arabidopsis thaliana*, pirinča i kukuruza uključeni u razviće cvetnih organa, odbrambene odgovore na patogene i zaštitu od oksidativnog stresa. Smatra se da imaju ulogu u redoks-signalizaciji i post-translacionim modifikacijama tiola, i time u signalizaciji oksidativnog stresa (Li, 2014). Postoje podaci o njihovoj aktivaciji nakon izlaganja drugim abiotičkim faktorima stresa (Hu i sar., 2015; Martins i sar., 2020). Kod kukuruza, glutaredoksini su uglavnom povezani sa stresom suše i visokih temperatura (Sprague, 2018; Ding i sar., 2019a). Diferencijalno eksprimirani *GRXS* geni identifikovani u ovom istraživanju su povezani sa odgovorom na abiotički stres u prethodnim istraživanjima. Na primer, ekspresija *AtGRXS17* gena je bila povećana tokom stresa izazvanog visokim temperaturama kod *Arabidopsis thaliana*

(Martins i sar., 2020; Rao i sar., 2023). Takođe, povećana ekspresija *AtGRXS17* gena je dovela do povećanja tolerantnosti na NT kod paradajza (Hu i sar., 2015) i sušu i visoke temperature kod kukuruza (Sprague, 2018). Postoje podaci i o ulozi *GRXS5* u odgovoru na abiotički stres kod paprati *Pteris vittata*. Povećana ekspresija *PvGRXS5* kod *Arabidopsis thaliana* je indukovala i poboljšanja u tolerantnosti na visoke temperature i rezultovala u smanjenim oksidativnim oštećenjima (Sundaram & Rathinasabapathi, 2010). U ovom istraživanju je došlo do povećane ekspresije *GRXS5* i *GRXS17* nakon izlaganja klijanaca kukuruza niskim temperaturama, što zajedno sa prethodnim istraživanjima, ukazuje na aktivaciju ovih glutedoksina tokom perioda ekstremnih temperatura, bilo visokih ili niskih, kod različitih biljnih vrsta. U pregledanoj literaturi nisu pronađeni podaci o ustanovljenoj povećanoj ekspresiji ovih gena kod kukuruza nakon izlaganja NT. Takođe, razlika u ekspresiji ova dva gena kod *Ls* i *Lt*, zajedno sa *elip* genima, pokazuje da je zaštita od fotoinhibicije i oksidativnih oštećenja koje uzrokuje, značajan aspekt uspostavljanja tolerantnosti na stres izazvan NT kod kukuruza u ovoj fazi razvića.

Aktivirane fotozaštitne mere su uključivale i akumulaciju antioksidativnih pigmenata, poput karotenoida i antocijana i određeni geni uključeni u biosintetske puteve navedenih jedinjenja su bili diferencijalno ekspimirani. Poznato je da se nivo karotenoida povećava tokom perioda stresa, kao način ograničavanja oštećenja uzrokovanih fotoinhibicijom i povećanom koncentracijom toksičnih ROS (Uarrota, i sar., 2018), što je opisano kod velikog broja biljnih vrsta (Guo i sar., 2022; He i sar., 2023), uključujući i kukuruz (He i sar., 2020a; Waititu i sar., 2021). Niske temperature takođe uzrokuju akumulaciju karotenoida i poboljšanu fotoprotekciju, kroz promovisanje disipacije energije ekscitacije tokom fotosinteze (Zhao i sar., 2022b). Akumulacija ovih pigmenata je dokazana i kod kukuruza izloženog niskim temperaturama (Avila i sar., 2018; Zhao i sar., 2022b). Xiang i sar. (2023) su pokazali i da nanošenje egzogene ABA na klijance kukuruza izložene NT dovodi do povećanja sadržaja karotenoida. Najvažniji enzimi za sintezu karotenoida u mevalonatnom, izoprenoidnom putu su fitoen sintaze (PSY) i desaturaze (PDS). Fitoen sintaze katalizuju kondenzaciju dva molekula geranil-geranil pirofosfata (GGPP) i sintezu fitoena. Ova reakcija je glavna regulatorna tačka biosintetskog puta karotenoida i smatra se korakom koji ograničava stopu sinteze ovih pigmenata (eng. *bottleneck*) (Ruiz-Sola i sar., 2010; Wang i sar., 2021d). Transformaciju fitoena u likopen, prekursor ostalih karotenoida, katalizuju fitoen desaturaze (Wang i sar. 2021d). Kao i PSY, i korak katalizovan od strane PDS, ograničava stopu i brzinu sinteze karotenoida (Elmi Anaraki i sar., 2017). Fitoen sintaze su kodirane od strane *psy* gena, familije gena identifikovane kod velikog broja vrsta gde su uglavnom prisutni u fotosintetskim tkivima (Wang i sar. 2021d). Ekspresija *psy* gena je regulisana različitim faktorima, poput fitohormona i spoljašnjim faktorima, poput jakog svetla, ekstremnih temperatura, suše (Cazzonelli i Pogson, 2010; Nisar i sar., 2015; Kaur i sar., 2017). Kulakova i sar. (2024) su pokazali da kod krompira niske temperature dovode do aktivacije *StPSY1*, *StPSY2* i *StPSY3* i da su ovi enzimi uključeni u odgovor na stres izazvan NT. Xiang i sar. (2023) su pokazali i da nanošenje egzogene ABA na klijance kukuruza izložene NT dovodi do aktivacije i povećane ekspresije *psy3*. U istraživanju klijanaca kukuruza ZP linija, ekspresija gena koji kodira fitoen sintazu 2, *psy2*, je bila povećana i kod *Ls* i *Lt* nakon 6h tretmana, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima.

Familija *pds* gena kodira fitoen desaturaze (Elmi Anaraki i sar., 2017). Mnoga istraživanja zasnovana na utišavanju gena su pokazala da oni imaju ulogu u odgovoru na abiotičke faktore stresa (Wang i sar., 2010b; Elmi Anaraki i sar., 2017). Kato i sar. (2019) su pokazali da niske temperature dovode do povećane ekspresije *pds* gena kod vrste alge *Euglena gracilis*, međutim nisu pronađena istraživanja koja su analizirala ekspresiju ovih gena tokom stresa izazvanog NT kod cvetnica. U ovom istraživanju, ekspresija specifičnog *pds* gena koji kodira 15-cis-fitoen

desaturazu, je bila povećana kod oba genotipa nakon 24h i nije bilo značajne razlike u vrednostima promene ekspresije kod L<sub>S</sub> i L<sub>T</sub>.

Kao i karotenoidi, i antocijani se akumuliraju u vakuolama biljnih ćelija tokom perioda abiotičkog stresa (Naing i Kim, 2021) pod uticajem povećane koncentracije ROS, koje dovode do aktivacije važnih TF i biosintetskih gena antocijanina (Altangerel i sar., 2017). Nakon izlaganja niskim temperaturama, antocijani u listovima smanjuju nivo fotoinhibicije i oksidativnih oštećenja (Zhu i sar., 2018a; Zhang i sar., 2019b), povećavajući tolerantnost na ovaj faktor stresa što je potvrđeno kod više biljnih vrsta, uključujući kukuruz (Rodríguez i sar., 2014; Naing i Kim, 2021; Yu i sar., 2022). I pored toga, kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju (5.2 *Biohemijska i fiziološka karakterizacija odgovora na niske temperature osetljivog i tolerantnog genotipa*), kukuruz nije biljna vrsta poznata po visokom sadržaju flavonoida, uključujući i antocijanine, pa su istraživanja fokusirana na gene uključene u ove biosintetske puteve tokom perioda abiotičkog stresa slabo zastupljena. U ovom istraživanju je uočeno da niske temperature indukuju ekspresiju *UF3GT* gena, koji kodira antocijanidin 3-O-glukoziltransferazu (*UF3GT*) i to samo kod tolerantnog genotipa. Zhou i sar. (2016) su pokazali da niske temperature indukuju ekspresiju *UF3GT* gena kod *Fagopyrum tataricum*. Podaci o ekspresiji ovog gena kod kukuruza tokom odgovora na stres izazvan NT nisu pronađeni, ali postoje podaci koji pokazuju da su *UF3GT* geni uključeni u detoksifikaciju od herbicida (Sun i sar., 2023) i odgovor na povišen nivo soli (Zhao i sar., 2019). Inicijacija ekspresije ovog gena samo kod L<sub>T</sub>, ukazuje na još jedan vid razlike u odgovoru na ovaj faktor stresa između tolerantnog i osetljivog genotipa.

#### **5.4.1.3. Diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni u odgovor na abiotički stimulus**

GO analiza je pokazala da su, pored procesa fotosinteze, diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni i u odgovor na abiotički stimulus, odnosno na visoke i niske temperature, kao i na oksidativni stres.

##### **5.4.1.3.1. Diferencijalno eksprimirani hsp i HSF geni**

Diferencijalno eksprimirani geni funkcionalno obogaćeni za odgovor na abiotički stimulus su najvećem delom bili obogaćeni i za odgovor na visoke temperature. Većina je pripadala familiji *hsp* i *HSF* gena, i osim jednog (*hsp17*), svi geni su se odlikovali sniženom ekspresijom u tretiranim klijancima.

Proteini toplotnog stresa (HSP) su molekularni šaperoni, poznati po svojoj ulozi u modifikaciji konformacije i zaštiti od gubitka funkcije i degradacije novosintetisanih proteina tokom abiotičkog i biotičkog stresa (ul Haq i sar., 2019). Transkripcioni faktori toplotnog stresa (HSF), locirani u citoplazmi i podeljeni u tri klase (A, B i C), su transkripcioni faktori koji regulišu ekspresiju *hsp* gena (Jacob i sar., 2017; Abou-Deif i sar., 2019). U odgovoru na abiotički stres najviše su izučavani HSFA, ali postoje podaci da su HSFB i HSFC neophodni za efikasan odgovor na različite abiotičke faktore stresa (Jacob i sar., 2017; ul Haq i sar., 2019). Kao i svi tipovi stresa, i niske temperature su povezane sa narušavanjem funkcije i denaturacijom proteina, koje dovode do inicijacije akumulacije HSP (ul Haq i sar., 2019). Uočena je povećana ekspresija velikog broja *hsp* gena nakon izlaganja biljaka niskim temperaturama kod *Arabidopsis thaliana* (Bae i sar., 2003), duvana (Jin i sar., 2011), pšenice (Vítámvás i sar., 2012) i kukuruza (Kollipara i sar., 2002; Meng i sar., 2022). Ipak, pored podataka o povećanoj ekspresiji ovih gena kod kukuruza nakon izlaganja NT, ima dokaza o njihovoj negativnoj regulaciji (Li i sar., 2020b; Sowiński i sar., 2020). Sowiński i sar. (2020) su poredili veliki broj nezavisnih istraživanja odgovora klijanaca kukuruza na umeren (12-15°C) ili jak (ispod 8°C) stres izazvan NT, zasnovanih na analizi transkriptoma. Zaključili su da su se u oba slučaja *hsp* geni uglavnom odlikovali sniženom ekspresijom kod

tretiranih klijanaca, ali i da je broj *hsp* gena sa sniženom ekspresijom bio veći kod klijanaca izloženih jakom stresu izazvanom NT.

U istraživanju klijanaca kukuruza u VE fazi su *hsp* i *HSF* geni uglavnom bili negativno regulisani kod oba genotipa. Ipak, Ls se odlikovao većim brojem *hsp* i *HSF* gena (*hsp16*, *hsp17.4*, *hsp17.5*, *hsp17.6*, *hsp18*, *hsp21*, *hsp23*, *hsp26*, *hsp70-8*, *hsp70-17*, *hsp82*, *HSFB2a*, *HSFB2b*) kojima je ekspresija bila smanjena kod tretiranih klijanaca, za razliku od L<sub>T</sub> (*hsp16*, *hsp21*, *hsp23*, *HSFB2a*, *HSFA6b*, *HSFB2b*). Kada se ovi rezultati uporede sa rezultatima meta analize Sowiński i sar. (2020), može se zaključiti da su obrasci ekspresije gena kod genotipa Ls bili slični onima kod klijanaca kukuruza izloženih jakom stresu izazvanom NT – odnosno odgovaraju obrascima ekspresije uočenim kod klijanaca kukuruza nakon izlaganja nižim temperaturama od onih primenjenih u ovom istraživanju (10/8°C). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da su temperature tretmana u ovom istraživanju jače uticale na osetljivi genotip nego na tolerantni genotip. Jedino je gen *hsp17* imao povećanu ekspresiju kod tretiranih klijanaca genotipa Ls nakon 24h, međutim nisu pronađeni podaci o njegovoj ekspresiji tokom stresa izazvanog NT u drugim istraživanjima. S obzirom da je povećana ekspresija HSP i HSF često smatrana ključnim aspektom odgovora biljke na bilo koji abiotički faktor stresa (Janmohammadi i sar, 2015), može se pretpostaviti da nemogućnost da se denaturacija i disfunkcija proteina minimizuje, može biti značajan faktor u osetljivosti kukuruza na stres izazvan NT, ali i faktor koji uzrokuje razlike u osetljivosti između različitih genotipova kukuruza.

#### 5.4.1.3.2. Diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni u odgovor na NT

Pored *hsp* i *HSF* gena, prema rezultatima GO analize je još četiri gena bilo funkcionalno obogaćeno za odgovor na temperaturni stimulus i to niske temperature – *pds*, *THI1*, kao i dva gena bez funkcionalne karakterizacije u Uniprot bazi podataka (Zm00001eb027960, Zm00001eb109440). Gen *pds* je takođe uključen u proces fotosinteze i njegova ekspresija i uloga u odgovoru na NT su opisane u poglavlju 5.4.2.1.3 *Uticaj niskih temperatura na fotoinhibiciju i aktivirane zaštitne mehanizme*. Hloroplastna tiamin tiazol sintaza (*THI1*) je enzim odgovoran za sintezu tiazola, prekursora tiamina (vitamin B1) i kodira je gen *THI1*. Tiamin je potreban za veliki broj metaboličkih procesa, poput glikolize, pentozno fosfatnog puta i ciklusa trikarboksilne kiseline (Yusof, 2019), ali i za odgovor na abiotički stres (Yee i sar., 2016). Gen *THI1* je okarakterisan kod *Arabidopsis thaliana* i kukuruza (Rapala-Kozik i sar., 2012) i pokazano je da je njegova ekspresija regulisana od strane ABA i da aktivacija *THI1* gena dovodi do zatvaranja stoma i sprečavanja gubitka vode tokom perioda stresa (Li i sar., 2016a). Povećana ekspresija ovog gena detektovana je kod biljaka tokom suše i povećane koncentracije soli u podlozi kod *Arabidopsis thaliana* (Rapala-Kozik i sar., 2012; Li i sar., 2016a) i pamuka (Li i sar., 2022d), kao i kod *Medicago sativa* tokom suše (Yin i sar., 2022). Međutim, u ovom istraživanju je prvi put utvrđeno povećanje ekspresije *THI1* kod kukuruza tokom stresa izazvanog NT. Smanjena ekspresija ovog gena samo kod tretiranih klijanaca osetljivog genotipa se takođe može uzeti kao pokazatelj različitog nivoa tolerantnosti na NT između dva genotipa.

#### 5.4.1.3.3. Diferencijalno eksprimirani geni direktno uključeni u odgovor na oksidativni stres

Poslednja kategorija u kojoj su bili funkcionalno obogaćeni DE geni za odgovor na abiotički stimulus je odgovor na oksidativni stres, i obuhvatala je tri gena za peroksidazu (Zm00001eb410710, Zm00001eb204960, Zm00001eb009940). Iako ovi geni imaju funkcionalnu anotaciju i u GO i u Uniprot bazi podataka i postoje dokazi o njihovoj ulozi na nivou proteina, o njima se vrlo malo zna – osim genske oznake, oni nisu ni imenovani, pa donošenje zaključaka o njihovoj ulozi u ćeliji uopšte, a i u odgovoru na stres izazvan NT nije jednostavno. Takođe, analiza aktivnosti POD je pokazala da NT dovode do akumulacije ovog enzima, dok je ekspresija ovih

gena snižena kod tretiranih klijanaca oba genotipa, ukazujući na to da nemaju veliku ulogu u regulaciji nivoa POD u ćelijama.

#### **5.4.2. lncRNK uključene u odgovor na NT**

lncRNK imaju važne uloge u procesima rastenja i razvića biljaka, kao i u odgovoru na promene u životnoj sredini, uključujući i promene temperature (Biswas i sar., 2021). Ekspresija lncRNK u uslovima niskih temperatura je proučavana kod kukuruza (Waititu i sar., 2021; Xuhui i sar., 2022), ali prema saznanju autora, ovo je prvo istraživanje lncRNK u klijancima kukuruza u VE fazi.

Identifikovano je 786 transkripata koji zadovoljavaju sve kriterijume za klasifikaciju u lncRNK molekule. Među njima, veliki broj je svrstan u lincRNK (66,8%) i one su se odlikovale dužinom manjom od 1000 nt. Procentualna zastupljenost lincRNK u okviru svih lncRNK kod kukuruza izloženih abiotičkim faktorima stresa se razlikuje u različitim istraživanjima – 50% (Xuhui i sar., 2022), 70% (Pang i sar., 2019), 93,4% (Ma i sar., 2021b). Međutim, u svakom od navedenih istraživanja su lincRNK bile najzastupljenija klasa lncRNK, kao i u istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana. Utvrđeno je da su se lncRNK odlikovale manjim brojem egzona od kodirajućih gena. Među lncRNK genima, skoro svi su bili sa 1-2 egzona, za razliku od kodirajućih gena, kod kojih je udeo gena sa 1-2 egzona bio manji od polovine. Isti rezultati su dobijeni u istraživanju odgovora lncRNK kukuruza na sušu – 82% lncRNK gena je imalo do dva egzona, dok je prosečan broj egzona u kodirajućim genima bio 4 (Pang i sar., 2019). Hu i sar. (2022b) su pokazali da kod kukuruza izloženog stresu visokih temperatura su geni eksprimiranih lncRNK takođe imali do 2 egzona ( $\approx 98\%$ ), za razliku od kodirajućih gena ( $\approx 13\%$ ). Dužine transkripata lncRNK i kodirajućih gena su se takođe razlikovale. Približno dve trećine lncRNK transkripata je bilo kraće od 600 nt, a skoro sve su bile kraće od 1000 nt. Suprotno tome, procenat iRNK transkripata kraćih od 1000 nt je bio  $\approx 80\%$ . Slični rezultati poređenja dužine lncRNK i iRNK fragmenata su dobijeni i u drugim istraživanjima na kukuruzu u uslovima abiotičkog stresa. U istraživanju odgovora lncRNK kukuruza na sušu,  $\approx 88\%$  lncRNK je bilo kraće od 1000 nt, dok su iRNK te dužine zauzimale oko trećinu svih iRNK transkripata (Pang i sar., 2019). U uslovima visokih temperatura, većina eksprimiranih lncRNK je bila kraća od 500 nt (97%), dok je preko 75% iRNK bilo duže od 1200 nt (Hu i sar., 2022b).

Analiza aktivnosti 786 identifikovanih lncRNK gena je pokazala da je nivo ekspresije molekula ove RNK klase bio niži od nivoa ekspresije iRNK, odnosno kodirajućih gena. Na primer, prosečan broj očitanih transkripata po kodirajućem genu za svih osim uzoraka je bio  $\approx 7900$ , dok je broj očitanih lncRNK transkripata po odgovarajućem genu bio  $\approx 1500$ . Rezultati su u skladu sa prethodno navedenim istraživanjima ekspresije lncRNK u uslovima abiotičkog stresa kod kukuruza. Nizak nivo ekspresije lncRNK je moguće objašnjenje za identifikaciju samo 63 lncRNK, diferencijalno eksprimiranih između kontrole i tretmana, barem u jednoj vremenskih tački u jednom od dva analizirana genotipa. Detektovane niske vrednosti ekspresije lncRNK rezultuju i identifikacijom malog broja lncRNK sa statistički značajnom razlikom u diferencijalnoj ekspresiji. Takođe, za razliku od DE gena, nijedna DE lncRNK nije bila zajednička za sve četiri analizirane grupe uzoraka (L<sub>s</sub> 6h, L<sub>s</sub> 24h, L<sub>T</sub> 6h, L<sub>T</sub> 24h). Identifikovan je i modul čija je ekspresija bila u značajnoj vezi sa tretmanom NT. Međutim, od 41 lncRNK samo osam je bilo DE, a samo jedna, XLOC\_001043, je identifikovana kod oba genotipa. Nedostatak obrazaca ekspresije zajedničkih za oba genotipa je otežao donošenje zaključaka o značaju ekspresije određenih lncRNK u odgovoru na stres izazvan NT.

Dodatna otežavajuća okolnost u tumačenju rezultata dobijenih za lncRNK je i nedostatak sveobuhvatne i organizovane klasifikacije biljnih lncRNK, odnosno nepostojanje specijalizovanih

baza podataka za lncRNK, poput *miRBase* za miRNK. Najznačajnija i najčešće citirana baza podataka jeste *PLncDB* (Jin i sar., 2021a), koja sadrži preko milion unosa za 80 biljnih vrsta. Ipak, nivo provere tačnosti unetih podataka i provera unosa duplikata, odnosno sjedinjavanje istih sekvenci unetih više puta iz različitih istraživanja, se razlikuje u zavisnosti od vrste. Na primer, za model organizam *Arabidopsis thaliana* postoji preko 13 hiljada unosa, od čega je svega 1% verifikovan i validiran. Za *Nicotiana tabacum*, još jedan model organizam, je uneto više od 30 hiljada potencijalnih lncRNK, od čega su verifikovane svega dve. U bazu je takođe uneto preko 30 hiljada potencijalnih lncRNK kod kukuruza, dok je verifikovano samo 26. Nijedna od lncRNK identifikovanih kod klijanaca kukuruza u VE fazi se nije poklapala sa verifikovanim lncRNK iz *PLncDB* baze.

Istraživanje lncRNK kod svih organizama, ne samo biljaka, je i dalje u fazi identifikacije, a ne funkcionalne karakterizacije (Gonzales i sar., 2024), pa su i funkcionalna istraživanja biljnih lncRNK u odgovoru na različite faktore stresa u ranim fazama retka (Yu i sar., 2019b). Kao što je već rečeno, od kako je sekvenciranje nove generacije postalo široko dostupno i rasprostranjeno, identifikovan je ogroman broj biljnih lncRNK (Jin i sar., 2021a). Zbog toga, formirane su specifične lncRNK klase na osnovu njihovog položaja i orijentacije u genomu ili na osnovu njihove strukture i pretpostavljenih molekularnih funkcija (Budak i sar., 2020; Yang i sar., 2023a). Međutim, kao što se može videti iz *PLncDB* baze, to nije značajno pomoglo – ogroman broj pronađenih lncRNK je nesrazmeran broju lncRNK sa dodeljenim biološkim značajem ili funkcijom. Dodatna otežavajuća okolnost jeste da ekspresija lncRNK zavisi od tipa tkiva i životne faze, kao i od korišćenog eksperimentalnog sistema, što rezultuje slabom reproducibilnošću između različitih istraživanja (Huo i sar., 2022). Broj istraživanja velikog obima zasnovanih na sekvenciranju nove generacije takođe ukazuje na problem relevantnosti identifikovanih lncRNK molekula – da li su one biološki relevantne ili su jednostavno transkripciona buka (Gonzales i sar., 2024). Da bi se utvrdila relevantnost dobijenih rezultata rađene su analize interakcije identifikovanih lncRNK u ovom istraživanju sa drugim RNK klasama, opisane u poglavlju 5.4.5.2. *Interakcije između lncRNK i iRNK (gena).*

### **5.4.3. circRNK uključene u odgovor na NT**

circRNK su nekodirajuće RNK sa sličnim mehanizmom regulacije ekspresije gena kao i lncRNK, sa potvrđenom ulogom u odgovoru biljaka kukuruza na različite abiotičke faktore stresa – sušu (Zhang i sar., 2019a; Xu i sar., 2024), povećanu koncentraciju soli (Liu i sar., 2022b), nedostatak azota u zemljištu (Ma i sar., 2021a). Jedini podaci o ulozi circRNK u odgovoru na NT su pronađeni u meta analizi 21 transkriptoma prikupljenih iz *Phytozome* baze podataka (Tang i sar., 2018). Prema saznanju autora, ovo je prvi opis njihove identifikacije i ekspresije kod klijanaca kukuruza starih pet dana.

Analiza i detekcija circRNK, urađena bioinformatičkim alatom *CIRCexplorer2*, je rezultovala identifikacijom 6951 molekula circRNK. Međutim, prilikom kvantifikacije je uočeno da preko 90% potencijalnih circRNK ima nivo ekspresije niže od praga postavljenog za analizu diferencijalne ekspresije. Ovakvi rezultati pokazuju da je većina identifikovanih circRNK bila prisutna sa manje od 10 očitanih sekvenci u svih osam uzoraka. Da bi se osigurala pouzdana analiza obrazaca ekspresije ovih molekula, transkripti sa niskim nivoima ekspresije nisu uzeti u obzir i nisu smatrani eksprimiranim circRNK sa visokom stopom pouzdanosti. Stoga, samo 135 identifikovanih circRNK je korišćeno za dalje analize.

Većina identifikovanih circRNK se odlikovala dužinom od 200-800 nt, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima circRNK kukuruza, kao i circRNK drugih vrsta (Han i sar., 2020b; Ma i sar., 2021a). Najveći udeo su zauzimale egzonske cirkularne RNK (skoro 50%), zatim intronske

( $\approx 30\%$ ) i intergenske circRNK ( $\approx 20\%$ ). Klasifikacija circRNK na osnovu njihove pozicije veže sa „roditeljskim“ genom, odnosno gena od kojeg vode poreklo, nije uniformna kod biljaka kukuruza. Prethodna istraživanja su pokazala da tačan odnos između ove tri klase circRNK varira kod kukuruza. Međutim, egzonske circRNK uvek čine najveći udeo, dok se odnosi circRNK intronskog ili intergenskog porekla menjaju (Ma i sar., 2021a; Xu i sar., 2024). Interesantna odlika circRNK jeste mogućnost sinteze većeg broja ovih molekula sa istog BS mesta u istom genu – alternativni BS (Tang i sar. 2018). Kod klijanaca kukuruza starih pet dana pronađeno je 63 jedinstvenih alternativnih BS mesta. Međutim, većina „roditeljskih“ gena je bila odgovorna za sintezu samo jedne circRNK ( $\approx 86\%$ ). Kao što je bio slučaj i sa klasifikacijom circRNK, i ispitivanja alternativnih BS mesta kod kukuruza su dala različite rezultate kroz raznovrsna istraživanja. Luo i sar. (2019) su pokazali da kod kukuruza u optimalnim uslovima sa  $\approx 60\%$  gena se transkribuje samo jedna circRNK. Ma i sar. (2021a) su otkrili da kod kukuruza u uslovima nedostatka azota, među identifikovanih 3270 circRNK, 1249 (38.2%) je transkribovano sa odvojenih roditeljskih gena.

Među 135 identifikovanih circRNK, nijedna nije imala značajnu ulogu u odgovoru na NT, odnosno nijedna nije bila diferencijalno eksprimirana između kontrole i tretmana ni kod jednog genotipa. Nedostatak DE circRNK je onemogućio i analize interakcije ovih molekula sa drugim RNK, zbog čega nije bilo moguće doneti bilo kakve zaključke o ulozi ovih molekula u odgovoru na stres izazvan NT.

Poznato je da se cirkularne RNK odlikuju nižim nivoima ekspresije od linearnih RNK, i kod biljaka i kod životinja (Wang i sar., 2014b; Liu i sar., 2023). Tang i sar. (2018) su analizom transkriptoma iz preko 20 raznovrsnih uzoraka kukuruza (različiti organi, životne faze i tretmani), pokazali da je nivo ekspresije circRNK uglavnom bio 0–0.5 RPM (eng. *reads per million*), i da je kvantitativna distribucija circRNK bila više rasuta (eng. *dispersed*) od roditeljskih gena. Nivoi ekspresije detektovani u ovom istraživanju su još niži od onih navedenih u literaturi. Na primer, Han i sar. (2020b) su pokazali da je kod klijanaca kukuruza u V3 i V5/V6 fazama rastenja,  $\approx 70\%$  circRNK bilo eksprimirano sa manje od deset sekvenci u svim uzorcima, što je manje od udela circRNK pronađenih u ovom istraživanju. Moguće objašnjenje za to jeste ispitivana životna faza – pet dana od početka germinacije nije dovoljno vremena da se ovi molekuli akumuliraju i efikasno budu uključeni u odgovor na NT. Međutim za potvrdu ove hipoteze, neophodno je uraditi dodatna ispitivanja i sekvenciranja u kasnijim fazama razvića.

#### **5.4.4. miRNK uključene u odgovor na NT**

miRNK su zauzimale u proseku  $\approx 2\%$  od ukupnog broja sekvenciranih sRNK, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima sRNK na kukuruza (Sepúlveda-García i sar., 2020; Teng i sar., 2023). Takođe, najveći procenat miRNK je bio dužine 24–25 nt, što se poklapa sa rezultatima drugih istraživanja kod kukuruza (Fu i sar., 2017; Sepúlveda-García i sar., 2020; Zhou i sar., 2020). Uloga miRNK u regulaciji genske ekspresije kroz sečenje i/ili translacionu inhibiciju ciljnih iRNK je dobro poznata i opisana. U skorije vreme, mnoga istraživanja su potvrdila njihovu ulogu u odgovoru na abiotički stres kod biljaka (Millar, 2020). Ipak, izučavanja uloge miRNK u odgovoru na NT kod klijanaca kukuruza, posebno u VE/V1 fazi su retka. Ovo je prvo istraživanje uloge miRNK kod klijanaca kukuruza starih pet dana, obrazaca njihove ekspresije i interakcije sa drugim RNK klasama.

Identifikovano je 145 već poznatih miRNK anotiranih u *miRBase* bazi i klasifikovanih u 30 miRNK familija. Među njima su najzastupljenije bile miRNK dužine 24 nt, što je u skladu sa drugim istraživanjima miRNK kukuruza u uslovima stresa (Seeve i sar., 2019; Wang i sar., 2023b) i tokom germinacije (Liu i sar., 2020a). U svih osam uzoraka je bilo zastupljeno samo 68 miRNK, i to u najvećem broju pripadnici miR156 i miR159 familije. Četrnaest je pronađeno samo u

uzorcima tretiranim NT, a nijedna nije bila zajednička za sva četiri uzorka ( $L_S$  T 6h,  $L_S$  T 24h,  $L_T$  T 6h,  $L_T$  T 24h). Poređenjem identifikovanih poznatih miRNK sa miRNK pronađenim kod drugih biljnih vrsta, potvrđeno je da su evolutivno najočuvaniji (eng. *most conserved*) bili članovi miR156, mir166, miR169, miR395 i mir396 familija – pronađeni su kod velikog broja vrsta, od briofita do skrivenosemenica (Gramzow i Theißen, 2019). Ova podudarnost pokazuje da mnoge miRNK pripadaju evolutivno očuvanim regulatornim modulima koji imaju važnu ulogu u razviću biljaka (D'Ario i sar., 2017). Očekivano, kod kukuruza je prisutan velik broj istih miRNK kao i kod drugih monokotila kao što su pirinač i sirak. Ali, veliki broj zajedničkih miRNK je pronađen i kod soje i nekih vrsta drveća (*Malus domestica* i *Populus trichocarpa*). Ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost da su mnoge miRNK imale nezavisno poreklo, nevezano od njihovog filogenetskog stabla tokom evolucije, što znači da bi mogle biti homoplazijske, a ne homologe.

Na osnovu potencijalne strukture ukosnice, mesta isecanja od strane enzima sličnim dajserima i minimalne slobodne energije neanotiranih sRNK transkripata, predviđeno je 876 potencijalno novih miRNK. Broj potencijalno novih miRNK identifikovanih kod kukuruza u drugim istraživanjima veoma varira – od nekoliko desetina do nekoliko stotina (Fu i sar., 2017; Liu i sar., 2020a; Zhou i sar., 2020; Teng i sar., 2023). Takođe, u prethodnim istraživanjima su korišćeni različiti tipovi i broj uzoraka, parametri tokom filtriranja i predviđanja potencijalno novih miRNK, kao i način na koji su rezultati predstavljeni, stoga variranja u dobijenim rezultatima nisu iznenađujuća.

Kvantifikacija već poznatih i potencijalno novih miRNK je pokazala da su se već poznate miRNK odlikovale značajno većim nivoima ekspresije – u proseku, nivo ekspresije je bio i preko 80 puta veći od nivoa ekspresije potencijalno novih miRNK. Odnos nivoa ekspresije ova dva tipa miRNK se takođe razlikuje u prethodnim istraživanjima kod kukuruza, ali očuvane miRNK se uvek odlikuju višim nivoima ekspresije od potencijalno novih (Liu i sar., 2020a; Jiao i sar., 2022). Na osnovu AGNES-HCA analize klijanaca kukuruza starih pet dana izloženih NT, uočeno je da se kada se analizira samo ekspresija miRNK, uzorci primarno grupišu na osnovu porekla (prvo se razdvajaju dve linije), a potom na osnovu eksperimentalnih uslova. Rezultati pokazuju da, za razliku od gena, na ekspresiju miRNK najveći uticaj imaju same razlike koje postoje između linija, nezavisno od uslova sredine.

Rezultati analize su pokazali da je 649 miRNK diferencijalno eksprimirano između kontrolnih i tretiranih uzoraka: 89 već poznatih i 649 potencijalno novih miRNK. Sveukupno, samo je osam DE miRNK bilo zajedničko za sve četiri tačke poređenja ( $L_T$ , 6h;  $L_T$ , 24h;  $L_S$ , 6h;  $L_S$ , 24h).

#### **5.4.5. Interakcije između različitih klasa RNK**

Nekodirajuće RNK, uključujući klase ispitivane u ovom istraživanju (miRNK, lncRNK, circRNK) imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije i na taj način utiču na niz procesa kod biljaka poput rastenja i razvića i odgovora na promene u životnoj sredini (Yu i sar., 2019b; Millar, 2020). Stoga su u ovom istraživanju ispitane uloge ncRNK u regulaciji gena bitnih za odgovor na niske temperature u VE fazi kukuruza. Na osnovu analiziranih pojedinačnih interakcija (miRNK-iRNK, miRNK-lncRNK, miRNK-circRNK i lncRNK-iRNK) mogu se formirati i mreže interakcije lncRNK/circRNK-miRNK-iRNK, koje omogućavaju sagledavanje celovite slike promena na nivou transkriptoma kao odgovor na NT.

### 5.4.5.1. Interakcije između miRNK i drugih klasa RNK

#### 5.4.5.1.1. Interakcije između miRNK i iRNK (gena)

Utvrđeno je da su ciljni geni diferencijalno eksprimiranih miRNK uključeni u različite procese u ćeliji – rastenje i razviće, proteinski metabolizam, kao i odgovor na stres – antioksidativni odgovor, signalna transdukcija i regulacija sadržaja vode u ćeliji.

Pripadnici familija miR396, miR156, mir166, miR319 i miR159 su poznati po regulaciji gena uključenih u različite aspekte rastenja, razvića korena i izdanka, morfogenezu. mir396 imaju ulogu u regulaciji rastenja tkiva i organa modulacijom faktora rastenja (eng. *growth regulating factors*, GRF) i GRF-interagujućih faktora (GIF) (Liebsch i Palatnik, 2020). Pripadnici familije miR156 su glavni regulatori SPL proteina, koji su neophodni za promenu vegetativne faze i razviće izdanka i listova (Wu i sar., 2009; Gao i sar., 2019a). mir319 i mir159 regulišu ćelijske deobe lisnog meristema kroz interakciju sa nekoliko transkripcionih faktora poput GAMYB i TCP (Aydinoglu i Lucas, 2019; Millar i sar., 2019). Analiza interakcija miRNK i ciljnih gena kod klijanaca kukuruza starih pet dana izloženih niskim temperaturama je u skladu sa prethodno navedenim istraživanjima – za navedene miRNK kod kukuruza su predviđeni isti ciljni geni. Takođe, predviđena je uloga zma-miR528a i zma-miR408a u kontroli rastenja korena preko regulacije ekspresije bHLH transkripcionih faktora neophodnih za razvoj korenskih dlaka, diferencijaciju korenskih ćelija i lignifikaciju Kasparijeve trake. Analiza diferencijalne ekspresije ovih miRNK je pokazala da na njih utiču NT – uočena je povećana ekspresija zma-miR156d-5p i zma-miR156k-5p nakon 6h, kao i povećana ekspresija zma-miR319a-3p i zma-miR396c nakon 24 h. Rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima navedenih miRNK tokom abiotičkog stresa (Zhao i sar., 2016; Jerome Jeyakumar i sar., 2020; Ma i sar., 2021c).

Kada je reč o ulozi miRNK u regulaciji antioksidativnog odgovora, predikcija ciljnih gena DE miRNK je pokazala da zma-miR398a i zma-miR398b potencijalno regulišu gene *CSD1* i *CSD2* gene. Uloga ove familije miRNK u regulaciji CSD enzima je poznata, kao i činjenica da je ekspresija miR398 regulisana od strane ABA i određenih WRKY transkripcionih faktora, poznatih po ulozi u odgovoru na abiotički stres, uključujući i NT (Feng i sar., 2016; Jiang i sar., 2017; Li i sar., 2022a). Kod L<sub>s</sub>, ekspresija zma-miR398a i zma-miR398b je bila povećana u obe vremenske tačke, dok je kod L<sub>T</sub> ekspresija inicijalno povećana (posle 6h tretmana), a zatim snižena ispod nivoa kontrole nakon 24h. Negativna regulacija miR398 je povezana sa tolerantnošću na abiotičke faktore stresa i praćena je povećanom ekspresijom *CSD1* i *CSD2* (Park i Grabau, 2017; Lu i sar., 2020a). Rezultati su u skladu sa rezultatima analize ekspresije nakon 24h – kod L<sub>s</sub> je ekspresija miR398 povećana kod tretiranih klijanaca, a kod L<sub>T</sub> snižena. Prema saznanju autora, ovo je prvi opis diferencijalne ekspresije miR398 tokom tretmana NT kod kukuruza.

U antioksidativni odgovor su potencijalno uključene i nove miRNK – npr. prema predikciji ciljnih gena, novel\_16 reguliše ekspresiju 2-alkenal reduktaze potrebne za ublažavanje oksidativnog stresa kod kukuruza (Wang i sar., 2021b). Ekspresija novel\_16 je bila povećana kod oba genotipa nakon 24h, ukazujući na moguću negativnu regulaciju navedenog gena tokom stresa izazvanog NT, nezavisno od genotipa. Takođe, novel\_447 potencijalno utiče na sintezu askorbinske kiseline i uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kroz regulaciju L-gulonolakton oksidaze 2 (*gullo2*) i L-askorbat peroksidaze 2 (*apx2*). Oba enzima su neophodna za neutralizaciju štetnih efekata ROS i odgovor na abiotički stres (Thabet i sar., 2022). Iako je ekspresija novel\_447 bila smanjena nakon 6h kod oba genotipa, ukazujući na uklanjanje njihove negativne regulacije na ekspresiju ciljnih gena, kao što je *apx2*, nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti APX nakon 24h ni kod jednog genotipa (5.3.3 Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX)).

Predikcija ciljnih gena je pokazala i da nekoliko diferencijalno eksprimiranih miRNK (zma-miR156d-5p, novel\_447, zma-miR528a-5p, and novel\_342) reguliše gene uključene u Ca<sup>2+</sup>-signalnu transdukciju, neophodnu za odgovor na sve abiotičke faktore stresa (Jia i sar., 2019; Iqbal i sar., 2022). zma-miR156d-5p i novel\_447 su potencijalno uključene u regulaciju kalmodulin vezujućeg transkripcionog aktivatora 3 (CAMTA3), koji se aktivira pri povećanoj koncentraciji kalcijuma kao odgovor na stres izazvan NT (Aslam i sar., 2022). CAMTA su neophodni za NT-indukovanu ekspresiju brojnih transkripcionih faktora regulisanih od strane *COR* gena, kao što su DREB1B/CBF1, DREB1C/CBF2 i GOLS3 (Kidokoro i sar., 2017). Uloga miR156 u regulaciji CAMTA, kao i njihova uloga u regulaciji ovih transkripcionih aktivatora tokom perioda abiotičkog stresa su dokazane u više istraživanja (Büyük i sar. 2019; Kansal i sar., 2021). Cui i sar. (2015) su sugerisali da bi uloga miR156 tokom stresa mogla biti u balansiranju vegetativnog razvića i odgovora na NT. Ekspresija miR156 nakon izlaganja niskim temperaturama varira među vrstama. Na primer, smanjenje ekspresije miR156 je povezano sa povećanjem tolerantnosti na NT kod pirinča (Zhao i sar., 2022a), ali prekomerna ekspresija miR156 je poboljšala tolerantnost na ovaj faktor stresa kod duvana (Dong i sar., 2021). U istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana, promena ekspresije zma-miR156d-5p je, iako statistički značajna, bila malo izražena (kod oba genotipa je FC < 1.5), ukazujući da njihov efekat na odgovor na NT nije bio od presudne važnosti. Takođe, zma-miR528a-5p i novel\_342, potencijalno regulišu ekspresiju kalcijum-zavisne protein kinaze 27 (CDPK27). Navedeni enzimi, zajedno sa drugim CDPK, tokom tretmana NT, mogu indukovati interakciju između ROS, NO i MAPK. Na ovaj način se aktivira ABA, što ukazuje na njihov značaj u odgovoru na niske temperature (Lv i sar., 2018). miR528 imaju ulogu u odgovoru na različite abiotičke faktore (Sun i sar., 2018; Ravichandran i sar., 2019), i pokazano je da ih kod kukuruza aktiviraju NT (Aydinoglu, 2020). Kod klijanaca kukuruza u VE fazi do povećane ekspresije zma-miR528a-5p je došlo samo kod genotipa Ls nakon 24h, ali s obzirom na to da u literaturi ne postoje podaci o povezanosti ekspresije ove miRNK i tolerantnosti na abiotički stres, potrebno je uraditi dodatna istraživanja da bi se sa sigurnošću mogla opisati njena uloga u odgovoru na stres niskim temperaturama.

Diferencijalno eksprimirane miRNK zma-miR164f-3p, zma-miR169i-5p i zma-miR396c su prema predikciji ciljnih gena bile uključene u regulaciju sadržaja vode u ćeliji. Stres izazvan niskim temperaturama često izaziva slične odgovore kod biljaka kao i suša – kapacitet apsorpcije vode opada sa snižavanjem temperature. Oba faktora stresa izazivaju disbalans u vodnom statusu i dovode do povećanja nivoa ABA i zatvaranja stoma, kao i do smanjenja lisne površine i gustine stoma (Agurla i sar., 2018). zma-miR164f-3p potencijalno reguliše ekspresiju gena bitnog za razviće i raspored stoma, *SDD1* (eng. *stomatal density and distribution 1*), kod klijanaca kukuruza starih pet dana. Povišena ekspresija ovog gena je povezana sa redukovanom gustinom stoma, redukovanom transpiracijom i povišenom efikasnošću apsorpcije vode (Morales-Navarro i sar., 2018). Uloga miR164 u odgovoru na stres suše je dobro opisana kroz regulaciju NAC transkripcionog faktora (Fang i sar., 2014), dok podataka o ulozi u regulaciji *SDD1* u postojećoj literaturi nema. U istraživanju klijanaca kukuruza u fazi nicanja ekspresija zma-miR164f-3p je nakon 24h bila povećana kod Ls, a smanjena kod Lt, što ukazuje na to da je moguće povezati regulaciju broja stoma i stope transpiracije sa tolerantnošću na NT. zma-miR169i-5p ima ulogu u regulaciji nuklearnog faktora Y (NF-Y) koji takođe ima bitnu ulogu u modulaciji ABA signalnog puta i zatvaranja stoma usled abiotičkog stresa (Ni i sar., 2013; Yang i sar., 2017b). Brojna istraživanja su pokazala da članovi miR169 familije imaju ulogu u regulaciji ekspresije NF-Y u uslovima abiotičkog stresa kod brojnih biljnih vrsta (Ni i sar., 2013; Luan i sar., 2015), ali ne i kod kukuruza tokom tretmana NT. U nekim slučajevima povećana ekspresija miR169 je rezultovala u

povećanoj tolerantnosti na abiotički stres (Yu i sar., 2019a), ali ima dokaza i o suprotnom, odnosno o uticaju miR169 na smanjenje tolerantnosti (Ni i sar., 2013). U istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana nije bilo značajne razlike između osetljivog i tolerantnog genotipa – kod oba je ekspresija zma-miR169i-5p bila snižena nakon 6 h tretmana. Takođe, prema predikciji ciljnih gena, zma-miR396c učestvuje u regulaciji homologa humanog importina  $\beta$  (KPNB1). KPNB1 je negativni efektor tolerantnosti na sušu kod *Arabidopsis thaliana* i njegovo utišavanje rezultuje povećanim zatvaranjem stoma i smanjenjem gubitka vode (Luo i sar., 2013; Oh i sar., 2020). Uloga miR396c u regulaciji KPNB1 nije opisana u prethodnim istraživanjima, ali je poznato da imaju ulogu u odgovoru na stres suše (Akdogan i sar., 2016). Kao i za mir168, podaci o značaju mir396 za tolerantnost na abiotički stres su različiti – povećana ekspresija može dovesti do povećane tolerantnosti na sušu (Liu i sar., 2009), ali može dovesti i do suprotnog efekta (Fracasso i sar., 2021). U ovom istraživanju je kod oba genotipa ekspresija zma-miR396c bila neznatno povećana nakon 24h.

Nakon završene predikcije ciljnih gena, analizirani su obrasci ekspresije miRNK i navedenih gena kod klijanaca kukuruza starih pet dana. Ispitivana je korelacija između obrazaca ekspresije, radi utvrđivanja mogućih interakcija između DE miRNK i njihovih ciljnih gena. Rezultati su pokazali da je mali broj ciljnih gena bio diferencijalno eksprimiran u ovom istraživanju – samo je 27 bilo DE između kontrole i tretmana kod barem jednog od ispitanih genotipova. Od toga, svega sedam DE gena je pokazalo obrasce ekspresije koji su bili u negativnoj korelaciji sa ispitanim DE miRNK. Prethodno navedeni geni važni za procese rastenja i razvića, signalne transdukcije, antioksidativni odgovor i regulaciju vodnog statusa nisu bili uključeni. Mogući razlog za to je metoda primenjena za analizu. Naime, ne postoji konsenzus za najprikladniji alat i parametre analize koje treba zadati kada je reč o predikciji ciljnih gena za miRNK. Podaci iz literature pokazuju da je u ove svrhe korišćen širok spektar metoda a samim tim i različiti parametri (Sepúlveda-García i sar., 2020; Teng i sar., 2023; Gandham i sar., 2024). Iako su parametri striktnosti analize odabrani na osnovu više istraživanja i pretražene literature, moguće je da u ovom slučaju nisu bili dovoljno strogi. Takođe, predikcija ciljnih gena se radi samo na osnovu strukturnih odlika miRNK i gena, ne uzimajući u obzir eksperimentalne uslove i moguće je da su pronađene miRNK-gen interakcije validne, ali ne u uslovima koji su postojali u ovom istraživanju. Odnosno, moguće je da pronađene miRNK-iRNK interakcije nisu uključene u odgovor na NT kod klijanaca kukuruza starih pet dana.

Određeni identifikovani miRNK-gen parovi su se ipak pokazali kao bitni za odgovor na NT. Na primer, smanjenje ekspresije potencijalno nove miRNK, novel\_452, je imalo pozitivan efekat na ekspresiju *rbcx2* (Zm00001eb212460), dok je miRNK novel\_696 negativno uticala na ekspresiju *prk* (Zm00001eb188120), ukazujući na mogućnost učestvovanja ovih miRNK u regulaciji određenih aspekata Kalvinovog ciklusa. Regulacija ekspresije ovih gena od strane miRNK kod kukuruza nije prethodno opisana, a nema mnogo podataka ni za druge vrste. Za *rbcx2* nisu pronađeni nikakvi podaci, dok su *prk* geni potencijalno regulisani od strane bra-miR5721 kod *Brassica napus* (Pasandideh Arjmand i sar., 2024), i moguće je da je novel\_696 homolog navedenoj miRNK kod kukuruza. Ipak, neophodna su dodatna istraživanja da bi se to potvrdilo. Takođe, ekspresija zma-miR164a-3p je bila povećana nakon 24h kod Ls, a ekspresija predviđenog ciljnog gena *HSFba* (Zm00001eb428800) značajno smanjena. miR164a-3p su već povezane sa odgovorom na abiotičke faktore stresa (stres soli) kod kukuruza (Fu i sar., 2017) i paradajza (Wang i sar., 2021c). Prema saznanju autora ovo je prvi opis uloge zma-miR164a-3p u regulaciji HSF faktora kod kukuruza i učestvovanja u odgovoru na NT. Međutim, pored identifikacije značajnih miRNA-iRNK interakcija, ovi parovi nisu formirali mrežu već je svaki od njih bio

odvojen entitet – nisu identifikovane DE miRNK koje regulišu ekspresiju više gena niti je ijedan DE ciljni gen bio regulisan od strane više miRNK.

#### 5.4.5.1.2. Interakcije između miRNK i drugih nekodirajućih RNK

Analizom interakcija između miRNK i drugih klasa nekodirajućih RNK (lncRNK i circRNK) je pokazano da miRNK potencijalno utiču na ekspresiju sedam ciljnih lncRNK i 11 ciljnih circRNK. Ipak, nijedna od navedenih ciljnih RNK nije bila diferencijalno eksprimirana između kontrole i tretmana kod ispitanih genotipova, što je onemogućilo donošenje bilo kakvih zaključaka o regulaciji ekspresije lncRNK i circRNK od strane miRNK. Moguća objašnjenja su navedena u prethodnom poglavlju (5.4.5.1.1. *Interakcije između miRNK i iRNK (gena)*) – korišćena metoda, parametri analize, eksperimentalni uslovi.

#### 5.4.5.2. Interakcije između lncRNK i iRNK (gena)

Gonzales i sar. (2024) navode da je istraživanje lncRNK i dalje u fazi identifikacije velikog obima, dok je funkcionalna karakterizacija na početku. Funkcionalna istraživanja lncRNK se danas uglavnom zasnivaju na analizi interakcija molekula ove klase RNK sa drugim RNK, pre svega iRNK i miRNK. Interakcije lncRNK i miRNK su opisane u prethodnom poglavlju (5.4.5.1.2 *Interakcije između miRNK i drugih nekodirajućih RNK*). lncRNK mogu direktno uticati na ekspresiju iRNK, odnosno gena, na dva načina – putem *cis*-regulacije, gde se ciljni geni nalaze u blizini genomske lokacije određene lncRNK (100 kb uzvodno ili nizvodno) i *trans*-regulacije, gde su ciljni geni locirani na nezavisnim hromozomskim lokusima (Fatica i Bozzoni, 2014; Waseem i sar., 2021).

Identifikovano je 362 potencijalnih *cis*-ciljnih gena za 63 DE lncRNK od kojih je samo pet bilo diferencijalno eksprimirano. XLOC\_016169 su bile uključene u negativnu regulaciju već spomenutog *rca* gena kod tolerantnog genotipa, ukazujući na potencijalnu ulogu ove lncRNK u regulaciji aktivnosti enzima Rubisco. Sa druge strane, lncRNK su bile potencijalno uključene i u regulaciju fotohemijske faze fotosinteze – XLOC\_006594 su imale pozitivan uticaj na ekspresiju gena *tic32* koji kodira hloroplastni protein TIC32. Navedeni protein pripada SDR familiji, odnosno familiji dehidrogenaza/reduktaza kratkog lanca (eng. *short-chain dehydrogenase/reductase*) i deo je TIC kompleksa (eng. *translocon of the inner chloroplast envelopes*), neophodnog za genezu hloroplasta (Hörmann i sar., 2004) i unošenje prekursorskih proteina (Xing i sar., 2025). Nisu pronađeni podaci o ekspresiji navedenog gena kod kukuruza, ali je njegova ekspresija bila redukovana kod graška tokom tretmana visokim temperaturama (Dutta i sar., 2009). lncRNK su potencijalno regulisale i transport šećera na *cis*-način – ekspresija XLOC\_015072 je bila u pozitivnoj korelaciji sa jednim genom, članom *sweet* genske familije, koji kodiraju bidirekionalne transportere šećera SWEET (eng. *sugar will eventually be exported transporter*). SWEET transporteri su jedna od tri glavne klase transportera šećera kod biljaka i imaju važne uloge u floemskom transportu šećera, regulaciji rastenja, nalivanju zrna i odgovoru na abiotičke i biotičke faktore stresa (Gautam i sar., 2022). Pokazano je da tokom izlaganja niskim temperaturama dolazi do povećane ekspresije različitih *sweet* gena kod *Arabidopsis thaliana* (Liu i sar., 2016), pirinča (Gautam i sar., 2022), banane (Miao i sar., 2017) i kupusa (Zhang i sar., 2019c). Kod kukuruza je uloga SWEET transportera opisana samo nakon izlaganja biljaka povećanoj koncentraciji soli u podlozi (Wu i sar., 2023; Wang i sar., 2024b). U istraživanju klijanaca kukuruza starih pet dana snižena ekspresija navedenog *sweet* gena samo kod Ls potencijalno ukazuje na ulogu ovih transportera u uspostavljanju tolerantnosti na stres izazvan NT u VE fazi kukuruza.

Među 191 identifikovanih *trans*-ciljnih gena, potencijalno regulisanih od strane 22 DE lncRNK, više od trećine je bilo diferencijalno eksprimirano u istoj liniji i vremenskoj tački kao i lncRNK. Na žalost, većina tih gena nije funkcionalno okarakterisana i nema opis u *Uniprot* bazi podataka i nije moguće doneti zaključke o njihovim interakcijama. Od ciljnih gena sa poznatom funkcijom, 14 gena je bilo pod potencijalnom regulacijom od strane pet lncRNK kod linije L<sub>s</sub>. Na ekspresiju gena *elip2* nakon 6h tretmana, pozitivan uticaj imale su lncRNK XLOC\_002167 i XLOC\_006091, ukazujući na moguću ulogu lncRNK u uspostavljanju zaštitnih mehanizama od fotoinhibicije. Takođe, nakon 24h lncRNK XLOC\_012259, XLOC\_007807 i XLOC\_012388 su potencijalno regulisale ekspresiju gena *gasa1*, koji kodira giberelinom regulisan protein 1 (GASA1). Navedeni proteini su povezani sa procesima rasteња u mladim tkivima i imaju ulogu u ćelijskim deobama i ekspanziji (Bouteraa i sar., 2023). Takođe, oni su povezani i sa odgovorom na abiotički stres kod brojnih biljnih vrsta (Bouteraa i sar., 2023). Kada je reč o stresu izazvanom NT, nisu pronađeni podaci za kukuruz, ali Li i sar. (2011) su pokazali da su GsGASA1 kod *Glycine soja* uključeni u inhibiciju rasteња korena preko akumulacije DELLA proteina nakon dužeg izlaganja NT. Rezultati Li i sar. (2011) nisu saglasni sa rezultatima ovog istraživanja, jer je ekspresija *gasa1* smanjena samo kod L<sub>s</sub>, a klijanci tog genotipa su se odlikovali znatno slabije razvijenim korenovima od L<sub>T</sub>. Ipak potencijalna regulacija GASA1 od strane tri lncRNK ukazuje na moguću ulogu u odgovoru na stres izazvan NT. lncRNK XLOC\_012388 je potencijalno uticala na ekspresiju najvećeg broja ciljnih gena – ukupno 13. Pored *gasa1*, među njima su bili i *hsp* geni (*hsp17*, *hsp26*), geni bitni za rasteње i razviće, fotosintezu i odgovor na biotički stres. Među ciljnim genima bitnim za rasteње i razviće bili su uglavnom potencijalni transkripcioni faktori uključeni u ćelijske deobe u meristemskim tkivima – protodermalni faktor 1 (PDF1) i EPFL6 (eng. *epidermal patterning factor-like protein 6*). XLOC\_012388 potencijalno regulišu i već pomenut *psbQ1*, neophodan za uspostavljanje PSII, kao i gen za sedoheptulozo-1,7-bisfosfatazu (SBPaza). Istraživanja su pokazala da je enzim SBPaza ključan za protok ugljenika u Kalvinovom ciklusu i da njegova povećana ekspresija dovodi do poboljšane fotosintetske efikasnosti, većeg prinosa, kao i povećane tolerantnosti na temperaturni stres, uključujući NT (Ding i sar. 2016; Driever i sar. 2017; Li i sar., 2022e). S obzirom da je smanjena ekspresija gena uočena samo kod L<sub>s</sub>, moguće je da su kod kukuruza ekspresija gena za SBPazu, kao i ekspresija lncRNK koja ga potencijalno reguliše, važni faktori u uspostavljanju tolerantnosti na NT. Pored toga, povećana ekspresija XLOC\_012388 je detektovana samo kod osetljive linije, dok je većina ciljnih gena navedene lncRNK pokazivala smanjenu ekspresiju. Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost učestvovanja XLOC\_012388 u regulaciji mehanizama koji rezultuju osetljivošću na niske temperature, ali je to potrebno uraditi dodatna ispitivanja.

Sa druge strane, kod L<sub>T</sub>, lncRNK su učestvovala u regulaciji manjeg broja ciljnih gena. Gen *elip2* je potencijalno regulisan i od strane XLOC\_016783 kod L<sub>T</sub>, nakon 6h, dok je Zm00001eb254440 koji kodira CASPL protein (eng. *Casparian strip membrane protein like*) bio pod uticajem XLOC\_005947 nakon 24h. Ekspresija i XLOC\_016783 i *elip2* je bila povećana, ukazujući na pozitivnu regulaciju, dok je XLOC\_005947 potencijalno negativno delovala na ekspresiju *caspl* gena.

#### **5.4.5.3. Mreža interakcija između klasa RNK**

Formiranje potpune miRNK-lncRNK-circRNK-iRNK mreže interakcija nije bilo moguće jer se pokazalo da veliki broj potencijalnih ciljnih RNK nije bio diferencijalno eksprimiran u ovim analizama – nije detektovana nijedna DE circRNK, kao ni DE ciljne lncRNK za odgovarajuće miRNK. Stoga, bilo je moguće konstruisati samo lncRNK-iRNK i miRNK-iRNK, iako je bilo brojnih potencijalnih slučajeva. Na primer, predikcija ciljnih gena je pokazala da nekoliko lncRNK

(XLOC\_005314, XLOC\_010450) i circRNK (bna\_circ\_824, bna\_circ\_1505) imaju mesta za vezivanje zma-miR169i-3p, koja dele sa dva ciljna gena (Zm00001eb339510, Zm00001eb286120). Ovo ukazuje na potencijalnu ulogu lncRNK i circRNK u modulaciji regulacije ciljnih gena od strane zma-miR169i-3p, ali je potvrda izostala zbog nedostatka podataka o diferencijalnoj ekspresiji. Moguće objašnjenje za to je analizirana životna faza u kojoj su nivoi ekspresije svih RNK, a posebno nekodirajućih RNK, niži nego kod biljaka u kasnijim fazama razvića, što rezultuje onemogućenom detekcijom diferencijalne ekspresije.

Kada je reč o miRNK-iRNK mreži, u poglavlju 5.4.5.1.1 *Interakcije između miRNK i iRNK (gena)* je navedeno da identifikovani miRNK-iRNK parovi nisu formirali mrežu već je svaki od njih bio odvojen entitet. S obzirom da nisu identifikovane DE miRNK koje regulišu ekspresiju više gena, niti je ijedan DE ciljni gen bio regulisan od strane više miRNK, nije bilo moguće formirati ujedinjenu mrežu interakcija sa međusobno povezanim članovima.

Sa druge strane, lncRNK-iRNK mrežu koekspresije je činilo 19 lncRNK i 41 ciljnih iRNK, odnosno gena. Kao što je prethodno objašnjeno, lncRNK mogu uticati na ekspresiju ciljnih gena preko više mehanizama, uključujući direktno vezivanje za ciljne iRNK, čime se reguliše njihova stabilnost i na taj način i njihova transkripcija, kao i preko njihove interakcije sa miRNK, čime se ublažava utišavanje gena od strane miRNK – ceRNA hipoteza (He i sar., 2020b). Ovo rezultuje uspostavljanjem raznovrsnih obrazaca koekspresije, zabeleženih i u ovom istraživanju. lncRNK XLOC\_012388 se izdvojila kao potencijalni čvorišni (eng. *hub*) regulator, utičući na najveći broj ciljnih gena uključenih u širok opseg metaboličkih procesa – rastenje i razviće, fotosintezu, odgovor na abiotički stres. Ipak, precizno određivanje procesa koje lncRNK potencijalno regulišu kroz mrežu interakcija je bilo otežano činjenicom da većina identifikovanih ciljnih gena nije bila funkcionalno anotirana.

## 6. Zaključci

Na osnovu rezultata analize ukupnog transkriptoma (iRNK, lncRNK, circRNK, miRNK) i poređenja obrazaca ekspresije ispitivanih klasa RNK između osetljive i tolerantne linije kukuruza na niske temperature, u cilju proučavanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi odgovora na ovaj faktor stresa i doprinose ispoljavanju tolerantnosti, može se zaključiti:

- Najinformativnije morfološke i fiziološke osobine za ispitivanje osetljivosti, odnosno tolerantnosti na niske temperature linija kukuruza bile su stopa preživljavanja, sveža masa klijanca starog pet dana, dužina koleoptila i radikule i fotosintetska efikasnost.
- Rezultati analize nivoa lipidne peroksidacije i antioksidativnih enzima (POD, SOD, CAT) pokazuju da temperature tretmana ne predstavljaju stres jednakog intenziteta za ispitivane genotipove, jer su kod genotipa Ls uočena veća membranska oštećenja i aktiviran je veći broj antioksidativnih enzima.
- Klijanci su u trenutku uzorkovanja bili u pretežno heterotrofnoj fazi i sinteza polifenolnih jedinjenja, šećera i šećernih alkohola se u najvećoj meri zasnivala na transformaciji već dostupnih rezervnih materija.
- Morfološki parametri i akumulacija jedinjenja sa negativnim efektom na sintezu i signalne puteve auksina (rutin, kvercetin i glukoza) pokazuju da se genotip Ls odlikovao inhibicijom procesa rasta i morfogeneze u uslovima niskih temperatura, u cilju aktivacije mehanizama odgovora na abiotički stres.
- Akumulacija trehaloze i inozitola, u trenutku opadanja nivoa drugih ispitivanih šećera i šećernih alkohola, ukazuje na značaj ovih jedinjenja u odgovoru kukuruza na NT, nezavisno od genotipa.
- Niske temperature su imale značajan negativan uticaj na fotosintetske procese, nezavisno od genotipa i tolerantnosti, narušavanjem uspostavljanja fotosistema i njihovih antena kompleksa, kao i redukcijom aktivnosti krucijalnih enzima, kao što je Rubisco – uočena je smanjena ekspresija *psA*, *psB*, *cab*, *lhc*, *rca* i *prk* gena kod oba genotipa.
- Razlika u tolerantnosti na NT između dva genotipa je uočena u mehanizmima ograničavanja oštećenja NT-indukovane fotoinhibicije i akumulacije ROS. Genotip L<sub>T</sub> se odlikovao višim nivoima ekspresije gena za proteine i enzime neophodne za zaštitu od fotoinhibicije (*CTPA2*, *ELIPs*, *GRXs*, *UF3GT*).
- Ekspresija *hsp* i *HSF* gena, gena koji kodiraju molekularne šaperone i odgovarajuće transkripcione regulatore, neophodne za uspostavljanje pravilne konformacije i zaštitu od gubitka funkcije novosintetisanih proteina, je takođe bila negativno regulisana niskim temperaturama. Kod Ls je broj *hsp* i *HSF* gena smanjene ekspresije bio značajno veći, ukazujući da je stabilizacija proteina važan faktor uspostavljanja tolerantnosti na NT.
- Nivo ekspresije nekodirajućih RNK je bio niži od nivoa ekspresije iRNK, i niži od nivoa uočenih u istraživanjima ncRNK u kasnijim vegetativnim fazama kukuruza, što ukazuje da je tokom VE faze ekspresija ncRNK u začetku.
- circRNK nisu bile uključene u odgovor na tretman niskim temperaturama kod klijanaca kukuruza starih pet dana – nije identifikovana nijedna DE circRNK između kontrole i tretmana.
- Utvrđeno je da sedam miRNK učestvuje u regulaciji fotosinteze i održavanju pravilnih konformacija proteina, kroz interakciju sa specifičnim ciljnim genima u

uslovima niskih temperatura u VE fazi kukuruza – novel\_452- *rbcx2*; novel\_696-*prk*; zma-miR164a-3p-*HSFBa*.

- lncRNK su učestvovala u *cis*-regulaciji uspostavljanja fotosinteze i transporta šećera, regulacijom ekspresije gena uključenih u ove procese – XLOC\_016169- *rca*; XLOC\_006594- *tic32*, XLOC\_015072- *sweet*.
- lncRNK su učestvovala i u *trans*-regulaciji odgovora na fotoinhibiciju (XLOC\_002167/XLOC\_006091/XLOC\_016783-*elip2*), uspostavljanje PSII (XLOC\_012388-*psbQ1*), rastenje kroz regulaciju signalnih puteva giberelina (XLOC\_012259/XLOC\_007807/XLOC\_012388-*gasa1*) i ćelijske deobe (XLOC\_012388-*pdf1*) i održavanju pravilnih konformacija proteina (XLOC\_012388-*hsp17/hsp26*).
- lncRNK XLOC\_012388 se izdvojila kao potencijalni čvorišni regulator, utičući na najveći broj ciljnih gena uključenih u širok opseg metaboličkih procesa – rast i razviće, fotosintezu, odgovor na abiotički stres.
- Formiranje potpune miRNK-lncRNK-circRNK-iRNK mreže interakcija nije bilo moguće jer veliki broj potencijalnih ciljnih RNK nije bio diferencijalno ekspimiran. Stoga je bilo moguće konstruisati samo lncRNK-iRNK i miRNK-iRNK.

## **7. Literatura**

**Abou-Deif MH, Rashed MA-S, Khalil KM, Mahmoud FE-S** (2019) Proteomic analysis of heat shock proteins in maize (*Zea mays* L.). *Bull Natl Res Cent* **43**: 199

**Adams WW, Muller O, Cohu CM, Demmig-Adams B** (2014) Photosystem II Efficiency and Non-Photochemical Fluorescence Quenching in the Context of Source-Sink Balance. *In* B Demmig-Adams, G Garab, W Adams III, Govindjee, eds, *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 503–529

**Adom KK, Liu RH** (2002) Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* **50**: 6182–6187

**Adrees M, Ali S, Iqbal M, Aslam Bharwana S, Siddiqi Z, Farid M, Ali Q, Saeed R, Rizwan M** (2015) Mannitol alleviates chromium toxicity in wheat plants in relation to growth, yield, stimulation of anti-oxidative enzymes, oxidative stress and Cr uptake in sand and soil media. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **122**: 1–8

**Afzal M, Nawaz K, Hussain K, Iqbal I, Riaz H, Abdul Rouf Z, Javeria M, Akram R, Khaliq M, Attique A, et al** (2023) Foliar application of mannitol as an effective approach to ameliorate the salt stress-induced toxicity in two varieties of maize (*Zea mays* L.). *PAK J BOT.* doi: 10.30848/PJB2023-2(37)

**Agurla S, Gahir S, Munemasa S, Murata Y, Raghavendra AS** (2018) Mechanism of Stomatal Closure in Plants Exposed to Drought and Cold Stress. *In* M Iwaya-Inoue, M Sakurai, M Uemura, eds, *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications*. Springer, Singapore, pp 215–232

**Aigner H, Wilson RH, Bracher A, Calisse L, Bhat JY, Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2017) Plant RuBisCo assembly in *E. coli* with five chloroplast chaperones including BSD2. *Science* **358**: 1272–1278

**Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S, Unver T** (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Funct Integr Genomics* **16**: 221–233

**Akgul B, Aydinoglu F** (2025) Evaluation of zma-miR408 and its target genes function on maize (*Zea mays*) leaf growth response to cold stress by VIGS-based STTM approach. *Gene* **938**: 149161

**del Alamo D, Sala D, Mchaourab HS, Meiler J** (2022) Sampling alternative conformational states of transporters and receptors with AlphaFold2. *eLife* **11**: e75751

**Alhudhaibi AM, Ibrahim MAR, Abd-Elaziz SMS, Farag HRM, Elsayed SM, Ibrahim HA, Hossain AS, Alharbi BM, Haouala F, Elkelish A, et al** (2024) Enhancing salt stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings: insights from trehalose and mannitol. *BMC Plant Biol* **24**: 472

**Ali B, Hafeez A, Afridi MS, Javed MA, Sumaira, Suleman F, Nadeem M, Ali S, Alwahibi MS, Elshikh MS, et al** (2023) Bacterial-Mediated Salinity Stress Tolerance in Maize (*Zea mays* L.): A Fortunate Way toward Sustainable Agriculture. *ACS Omega* **8**: 20471–20487

**Ali Q, Sami A, Haider MZ, Ashfaq M, Javed MA** (2024) Antioxidant production promotes defense mechanism and different gene expression level in *Zea mays* under abiotic stress. *Sci Rep* **14**: 7114

- Almaghamsi A, Nosarzewski M, Kanayama Y, Archbold DD** (2021) Effects of abiotic stresses on sorbitol biosynthesis and metabolism in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Funct Plant Biol* **48**: 286–297
- Almodares A, Hadi MR, Dosti B** (2008) The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrate contents in sweet sorghum. *Research Journal of Environmental Sciences* **2**: 298–304
- Altangerel N, Ariunbold GO, Gorman C, Alkahtani MH, Borrego EJ, Bohlmeier D, Hemmer P, Kolomiets MV, Yuan JS, Scully MO** (2017) In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 3393–3396
- Althammer M, Regl C, Herburger K, Blöchl C, Voglas E, Huber CG, Tenhaken R** (2022) Overexpression of UDP-sugar pyrophosphorylase leads to higher sensitivity towards galactose, providing new insights into the mechanisms of galactose toxicity in plants. *Plant J* **109**: 1416–1426
- An S, Liu Y, Sang K, Wang T, Yu J, Zhou Y, Xia X** (2023) Brassinosteroid signaling positively regulates abscisic acid biosynthesis in response to chilling stress in tomato. *J Integr Plant Biol* **65**: 10–24
- Anders S, Huber W** (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**: R106
- Anderson R, Bayer PE, Edwards D** (2020) Climate change and the need for agricultural adaptation. *Current Opinion in Plant Biology* **56**: 197–202
- Andrews S** (2010) Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arunraj R, Skori L, Kumar A, Hickerson NMN, Shoma N, M V, Samuel MA** (2020) Spatial regulation of alpha-galactosidase activity and its influence on raffinose family oligosaccharides during seed maturation and germination in *Cicer arietinum*. *Plant Signal Behav* **15**: 1709707
- Assenov B, Andjelkovic V, Ignjatovic-Micic D, Vancetovic J, Nikolic A, Christov NK, Tsonev S, Abu-Mhadi N, Vassilev D, Muhovski Y, Ilchovska M, Todorovska E** (2013) Identification of SNP mutations in MYBYE-1 gene involved in drought stress tolerance in maize. *Bulg. J. Agric. Sci.* **19**: 181–185
- Aslam M, Fakher B, Ashraf MA, Cheng Y, Wang B, Qin Y** (2022) Plant Low-Temperature Stress: Signaling and Response. *Agronomy* **12**: 702
- Atlin GN, Cairns JE, Das B** (2017) Rapid breeding and varietal replacement are critical to adaptation of cropping systems in the developing world to climate change. *Global Food Security* **12**: 31–37
- Avila LM, Obeidat W, Earl H, Niu X, Hargreaves W, Lukens L** (2018) Shared and genetically distinct *Zea mays* transcriptome responses to ongoing and past low temperature exposure. *BMC Genomics* **19**: 761
- Aydinoglu F** (2020) Elucidating the regulatory roles of microRNAs in maize (*Zea mays* L.) leaf growth response to chilling stress. *Planta* **251**: 38
- Aydinoglu F, Lucas SJ** (2019) Identification and expression profiles of putative leaf growth related microRNAs in maize (*Zea mays* L.) hybrid ADA313. *Gene* **690**: 57–67

- Bae MS, Cho EJ, Choi E-Y, Park OK** (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J* **36**: 652–663
- Banerjee A, Roychoudhury A** (2019) Cold Stress and Photosynthesis. *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 27–37
- Bahraminia M, Zarei M, Ronaghi A, Sepehri M, Etesami H** (2020) Itonomic and biochemical responses of maize plant (*Zea mays* L.) inoculated with *Funneliformis mosseae* to water-deficit stress. *Rhizosphere* **16**: 100269
- Bahrman N, Hascoët E, Jaminon O, Dépta F, Hù J-F, Bouchez O, Lejeune-Hénaut I, Delbreil B, Legrand S** (2019) Identification of Genes Differentially Expressed in Response to Cold in *Pisum sativum* Using RNA Sequencing Analyses. *Plants* **8**: 288
- Balassa G, Oláh C, Balassa K, Rácz I, Kátay G, Kalapos B, Boldizsár I, Sárvári É, Solti Á, Pál M, et al** (2022) Physiological and Molecular Background of Maize Cold-Tolerance Enhancement with S-methylmethionine Salicylate. *J Plant Growth Regul* **41**: 2073–2091
- Banović Đeri B, Božić M, Dudić D, Vičić I, Milivojević M, Ignjatović-Micić D, Samardžić J, Vančetović J, Delić N, Nikolić A** (2022) Leaf transcriptome analysis of Lancaster versus other heterotic groups' maize inbred lines revealed different regulation of cold-responsive genes. *Journal of Agronomy and Crop Science* **208**: 497–509
- Barrero-Gil J, Huertas R, Rambla JL, Granell A, Salinas J** (2016) Tomato plants increase their tolerance to low temperature in a chilling acclimation process entailing comprehensive transcriptional and metabolic adjustments. *Plant, Cell & Environment* **39**: 2303–2318
- Bassu S, Fumagalli D, Toreti A, Ceglar A, Giunta F, Motzo R, Zajac Z, Niemeyer S** (2021) Modelling potential maize yield with climate and crop conditions around flowering. *Field Crops Research* **271**: 108226
- Beegum S, Walne CH, Reddy KN, Reddy V, Reddy KR** (2023) Examining the Corn Seedling Emergence-Temperature Relationship for Recent Hybrids: Insights from Experimental Studies. *Plants (Basel)* **12**: 3699
- Benitez-Alfonso Y, Soanes BK, Zimba S, Sinanaj B, German L, Sharma V, Bohra A, Kolesnikova A, Dunn JA, Martin AC, et al** (2023) Enhancing climate change resilience in agricultural crops. *Current Biology* **33**: R1246–R1261
- Berberich T, Sano H, Kusano T** (1999) Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Mol Gen Genet* **262**: 534–542
- Bernstein M** (2021) RNA-seq: the basics. Matthew N. Bernstein, [https://mbernste.github.io/posts/rna\\_seq\\_basics/](https://mbernste.github.io/posts/rna_seq_basics/)
- Berry J, Bjorkman O** (1980) Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 491–543
- Bertelsen AH, Velculescu VE** (1998) High-throughput gene expression analysis using SAGE. *Drug Discovery Today* **3**: 152–159
- Bhattacharya S, Kundu A** (2020) Sugars and Sugar Polyols in Overcoming Environmental Stresses. *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 71–101

- Bhutta ZA, Bhutta SZ, Raza S, Sheikh AT** (2022) Addressing the human costs and consequences of the Pakistan flood disaster. *Lancet* **400**: 1287–1289
- Bilska-Kos A, Panek P, Szulc-Głaz A, Ochodzki P, Cisło A, Zebrowski J** (2018) Chilling-induced physiological, anatomical and biochemical responses in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and maize (*Zea mays* L.). *J Plant Physiol* **228**: 178–188
- Biswas A, Sen B, Bandyopadhyay S, Mal C** (2021) Co-regulatory functions of miRNA and lncRNA in adapting biotic and abiotic stress in economically important dicot plants. *Plant Gene* **26**: 100275
- Bocchini M, D'Amato R, Ciancaleoni S, Fontanella MC, Palmerini CA, Beone GM, Onofri A, Negri V, Marconi G, Albertini E, et al** (2018) Soil Selenium (Se) Biofortification Changes the Physiological, Biochemical and Epigenetic Responses to Water Stress in *Zea mays* L. by Inducing a Higher Drought Tolerance. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018,00389
- Bocian A, Zwierzykowski Z, Rapacz M, Koczyk G, Ciesiołka D, Kosmala A** (2015) Metabolite profiling during cold acclimation of *Lolium perenne* genotypes distinct in the level of frost tolerance. *J Appl Genetics* **56**: 439–449
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B** (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120
- Bouterra MT, Ben Romdhane W, Baazaoui N, Alfaifi MY, Chouaibi Y, Ben Akacha B, Ben Hsouna A, Kačániová M, Čavar Zeljković S, Garzoli S, et al** (2023) GASA Proteins: Review of Their Functions in Plant Environmental Stress Tolerance. *Plants* **12**: 2045
- Bracher A, Whitney SM, Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2017) Biogenesis and Metabolic Maintenance of Rubisco. *Annu Rev Plant Biol* **68**: 29–60
- Brunetti C, Fini A, Sebastiani F, Gori A, Tattini M** (2018) Modulation of Phytohormone Signaling: A Primary Function of Flavonoids in Plant–Environment Interactions. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018,01042
- Budak H, Kaya SB, Cagirici HB** (2020) Long Non-coding RNA in Plants in the Era of Reference Sequences. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2020.00276
- Burgos G, Amoros W, Muñoa L, Sosa P, Cayhualla E, Sanchez C, Díaz C, Bonierbale M** (2013) Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling. *Journal of Food Composition and Analysis* **30**: 6–12
- Büyük İ, İlhan E, Şener D, Özsoy AU, Aras S** (2019) Genome-wide identification of CAMTA gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. *Mol Biol Rep* **46**: 2721–2732
- Cai G, Wang G, Wang L, Pan J, Liu Y, Li D** (2014) ZmMKK1, a novel group A mitogen-activated protein kinase gene in maize, conferred chilling stress tolerance and was involved in pathogen defense in transgenic tobacco. *Plant Sci* **214**: 57–73
- Calixto CPG, Tzioutziou NA, James AB, Hornyik C, Guo W, Zhang R, Nimmo HG, Brown JWS** (2019) Cold-Dependent Expression and Alternative Splicing of *Arabidopsis* Long Non-coding RNAs. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2019.00235

- Campbell B, Beare D, Bennett E, Hall-Spencer J, Ingram J, Jaramillo F, Ortiz R, Ramankutty N, Sayer J, Shindell D** (2017) Agriculture production as a major driver of the Earth system exceeding planetary boundaries. *Ecology and Society*. doi: 10.5751/ES-09595-220408
- Cao L, Lu X, Wang G, Zhang P, Fu J, Wang Z, Wei L, Wang T** (2021) Transcriptional regulatory networks in response to drought stress and rewatering in maize (*Zea mays* L.). *Mol Genet Genomics* **296**: 1203–1219
- Cao Q, Li G, Cui Z, Yang F, Jiang X, Diallo L, Kong F** (2019) Seed Priming with Melatonin Improves the Seed Germination of Waxy Maize under Chilling Stress via Promoting the Antioxidant System and Starch Metabolism. *Sci Rep* **9**: 15044
- Castro JC, Castro CG, Cobos M** (2023) Genetic and biochemical strategies for regulation of L-ascorbic acid biosynthesis in plants through the L-galactose pathway. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2023.1099829
- Catalá R, López-Cobollo R, Mar Castellano M, Angosto T, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J** (2014) The Arabidopsis 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation. *Plant Cell* **26**: 3326–3342
- Cazzonelli CI, Pogson BJ** (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **15**: 266–274
- Che Y, Fu A, Hou X, McDonald K, Buchanan BB, Huang W, Luan S** (2013) C-terminal processing of reaction center protein D1 is essential for the function and assembly of photosystem II in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 16247–16252
- Chen H, Chen X, Chai X, Qiu Y, Gong C, Zhang Z, Wang T, Zhang Y, Li J, Wang A** (2015) Effects of low temperature on mRNA and small RNA transcriptomes in *Solanum lycopersicoides* leaf revealed by RNA-Seq. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **464**: 768–773
- Chen N, Fan X, Wang C, Jiao P, Jiang Z, Ma Y, Guan S, Liu S** (2022) Overexpression of ZmDHN15 Enhances Cold Tolerance in Yeast and Arabidopsis. *Int J Mol Sci* **24**: 480
- Chen Z, Cuin TA, Zhou M, Twomey A, Naidu BP, Shabala S** (2007) Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4245–4255
- Cheng L, Ma L, Meng L, Shang H, Cao P, Jin J** (2022) Genome-Wide Identification and Analysis of the Class III Peroxidase Gene Family in Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Front Genet*. doi: 10.3389/fgene.2022.916867
- Chhogyel N, Pradhan N, Ghimiray M, Bajgai Y** (2016) Evaluation of short duration rice (*Oryza sativa*) varieties as a strategy to cope with climate change. *Proceedings of Bhutan Ecological Society* 91–103
- Chi C, Xu X, Wang M, Zhang H, Fang P, Zhou J, Xia X, Shi K, Zhou Y, Yu J** (2021) Strigolactones positively regulate abscisic acid-dependent heat and cold tolerance in tomato. *Hortic Res* **8**: 237
- Chinnusamy V, Stevenson B, Lee B, Zhu J-K** (2002) Screening for gene regulation mutants by bioluminescence imaging. *Sci STKE* **2002**: pl10
- Chowdhary V, Alooparampil S, Pandya RV, Tank JG, Chowdhary V, Alooparampil S, Pandya RV, Tank JG** (2021) Physiological Function of Phenolic Compounds in Plant Defense System.

Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications. doi: 10.5772/intechopen.101131

**Close TJ, Wanamaker SI, Caldo RA, Turner SM, Ashlock DA, Dickerson JA, Wing RA, Muehlbauer GJ, Kleinhofs A, Wise RP** (2004) A New Resource for Cereal Genomics: 22K Barley GeneChip Comes of Age. *Plant Physiology* **134**: 960–968

**Collins B, Chenu K** (2021) Improving productivity of Australian wheat by adapting sowing date and genotype phenology to future climate. *Climate Risk Management* **32**: 100300

**Conde A, Regalado A, Rodrigues D, Costa JM, Blumwald E, Chaves MM, Gerós H** (2015) Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of Experimental Botany* **66**: 889–906

**Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, Conos SA, Capovilla G, Cildir G, Jourdain A, Tergaonkar V, Schmid M, Zubieta C, et al** (2017) A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants* **3**: 17053

**Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF** (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 15243–15248

**Cooper JW, Hu Y, Beyyoudh L, Yildiz Dasgan H, Kunert K, Beveridge CA, Foyer CH** (2018) Strigolactones positively regulate chilling tolerance in pea and in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **41**: 1298–1310

**Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K** (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* **11**: 163

**Cui G, Chai H, Yin H, Yang M, Hu G, Guo M, Yi R, Zhang P** (2019) Full-length transcriptome sequencing reveals the low-temperature-tolerance mechanism of *Medicago falcata* roots. *BMC Plant Biol* **19**: 575

**Cui N, Sun X, Sun M, Jia B, Duanmu H, Lv D, Duan X, Zhu Y** (2015) Overexpression of OsmiR156k leads to reduced tolerance to cold stress in rice (*Oryza Sativa*). *Mol Breeding* **35**: 214

**Cushman JC, Bohnert HJ** (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 117–124

**D’Ario M, Griffiths-Jones S, Kim M** (2017) Small RNAs: Big Impact on Plant Development. *Trends Plant Sci* **22**: 1056–1068

**Das R, Mondal SK** (2021) Plant miRNAs: Biogenesis and its functional validation to combat drought stress with special focus on maize. *Plant Gene* **27**: 100294

**Deryng D, Conway D, Ramankutty N, Price J, Warren R** (2014) Global crop yield response to extreme heat stress under multiple climate change futures. *Environ Res Lett* **9**: 034011

**Deutsch CA, Tewksbury JJ, Tigchelaar M, Battisti DS, Merrill SC, Huey RB, Naylor RL** (2018) Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science* **361**: 916–919

**Dewi K, Parmi P** (2015) The effect of glucose and light quality on seed germination, vitamin E and chlorophyll content of green bean sprout (*Vigna radiata* (L.) Wilcz.). *Kne Life Sciences* **2**: 317

**Diao Y, Xu H, Li G, Yu A, Yu X, Hu W, Zheng X, Li S, Wang Y, Hu Z** (2014) Cloning a glutathione peroxidase gene from *Nelumbo nucifera* and enhanced salt tolerance by overexpressing in rice. *Mol Biol Rep* **41**: 4919–4927

- van Dijk AIJM, Beck HE, Crosbie RS, de Jeu RAM, Liu YY, Podger GM, Timbal B, Viney NR** (2013) The Millennium Drought in southeast Australia (2001–2009): Natural and human causes and implications for water resources, ecosystems, economy, and society. *Water Resources Research* **49**: 1040–1057
- Dimitrov RA, Zuker M** (2004) Prediction of hybridization and melting for double-stranded nucleic acids. *Biophys J* **87**: 215–226
- Ding F, Wang M, Zhang S, Ai X** (2016) Changes in SBPase activity influence photosynthetic capacity, growth, and tolerance to chilling stress in transgenic tomato plants. *Sci Rep* **6**: 32741
- Ding S, He F, Tang W, Du H, Wang H** (2019a) Identification of Maize CC-Type Glutaredoxins That Are Associated with Response to Drought Stress. *Genes* **10**: 610
- Ding Y, Lv J, Shi Y, Gao J, Hua J, Song C, Gong Z, Yang S** (2019b) EGR2 phosphatase regulates OST1 kinase activity and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *EMBO J* **38**: e99819
- Ding Y, Yang H, Wu S, Fu D, Li M, Gong Z, Yang S** (2022) CPK28-NLP7 module integrates cold-induced Ca<sup>2+</sup> signal and transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. *Sci Adv* **8**: eabn7901
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR** (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21
- Dong C-H, Pei H** (2014) Over-expression of miR397 improves plant tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Biol* **57**: 209–217
- Dong H, Yan S, Jing Y, Yang R, Zhang Y, Zhou Y, Zhu Y, Sun J** (2021) MIR156-Targeted SPL9 Is Phosphorylated by SnRK2s and Interacts With ABI5 to Enhance ABA Responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **12**: 708573
- Dong R, Zhang X-O, Zhang Y, Ma X-K, Chen L-L, Yang L** (2016) CircRNA-derived pseudogenes. *Cell Res* **26**: 747–750
- Dong Y, Tang M, Huang Z, Song J, Xu J, Ahammed GJ, Yu J, Zhou Y** (2022) The miR164a-NAM3 module confers cold tolerance by inducing ethylene production in tomato. *Plant J* **111**: 440–456
- Dreyer A, Dietz K-J** (2018) Reactive Oxygen Species and the Redox-Regulatory Network in Cold Stress Acclimation. *Antioxidants* **7**: 169
- Driever SM, Simkin AJ, Alotaibi S, Fisk SJ, Madgwick PJ, Sparks CA, Jones HD, Lawson T, Parry MAJ, Raines CA** (2017) Increased SBPase activity improves photosynthesis and grain yield in wheat grown in greenhouse conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**: 20160384
- Drost H-G, Paszkowski J** (2017) Biomart: genomic data retrieval with R. *Bioinformatics* **33**: 1216–1217
- Durufié H, Déjean S** (2023) Multi-omics Data Integration in the Context of Plant Abiotic Stress Signaling. *In* I Couée, ed, *Plant Abiotic Stress Signaling*. Springer US, New York, NY, pp 295–318
- Dutta S, Mohanty S, Tripathy BC** (2009) Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in pea. *Plant Physiol* **150**: 1050–1061
- Dwivedi AK, Singh V, Anwar K, Pareek A, Jain M** (2023) Integrated transcriptome, proteome and metabolome analyses revealed secondary metabolites and auxiliary carbohydrate metabolism augmenting drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* **201**: 107849

- Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, Peluso P, Rank D, Baybayan P, Bettman B, et al** (2009) Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* **323**: 133–138
- Elmi Anaraki Z, Shariati M, Hosseini Tafreshi SA** (2017) Transient silencing of phytoene desaturase reveals critical roles on plant response to salinity stress. *Acta Physiol Plant* **39**: 161
- Ensminger I, Busch F, Huner NPA** (2006) Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **126**: 28–44
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M** (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**: 3047–3048
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, et al** (2007) High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One* **2**: e219
- Fang Y, Xie K, Xiong L** (2014) Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2119–2135
- Farhangi-Abriz S, Torabian S** (2017) Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. *Ecotoxicol Environ Saf* **137**: 64–70
- Farooq A, Farooq N, Akbar H, Hassan ZU, Gheewala SH** (2023) A Critical Review of Climate Change Impact at a Global Scale on Cereal Crop Production. *Agronomy* **13**: 162
- Farooq M, Aziz T, Wahid A, Lee D-J, Siddique KHM** (2009) Chilling tolerance in maize: agronomic and physiological approaches. *Crop Pasture Sci* **60**: 501–516
- Farooqi MQU, Lee JK** (2016) Cold Stress Evaluation among Maize (*Zea mays* L.) Inbred Lines in Different Temperature Conditions. *Plant Breeding and Biotechnology* **4**: 352–361
- Fatica A, Bozzoni I** (2014) Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* **15**: 7–21
- Fawzy S, Osman AI, Doran J, Rooney DW** (2020) Strategies for mitigation of climate change: a review. *Environ Chem Lett* **18**: 2069–2094
- Feng K, Yu J, Cheng Y, Ruan M, Wang R, Ye Q, Zhou G, Li Z, Yao Z, Yang Y, et al** (2016) The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. *Front Plant Sci* **7**: 1279
- Feng Y, Wu H, Liu H, He Y, Yin Z** (2023) Effects of OsRCA Overexpression on Rubisco Activation State and Photosynthesis in Maize. *Plants* **12**: 1614
- Fernandez O, Béthencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clément C** (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends in Plant Science* **15**: 409–417
- Feussner I, Polle A** (2015) What the transcriptome does not tell - proteomics and metabolomics are closer to the plants' patho-phenotype. *Curr Opin Plant Biol* **26**: 26–31
- Foyer CH** (2018) Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environ Exp Bot* **154**: 134–142
- Fracasso A, Vallino M, Staropoli A, Vinale F, Amaducci S, Carra A** (2021) Increased water use efficiency in miR396-downregulated tomato plants. *Plant Science* **303**: 110729
- Frey FP, Pitz M, Schön C-C, Hochholdinger F** (2020) Transcriptomic diversity in seedling roots of European flint maize in response to cold. *BMC Genomics* **21**: 300

- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N** (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* **40**: 37–52
- Fu J, Zhang Y, Wang Y, Zhang H, Liu J, Tang J, Yang Q, Sun H, Qiu W, Ma Y, et al** (2022) Optimization of metabolomic data processing using NOREVA. *Nat Protoc* **17**: 129–151
- Fu R, Zhang M, Zhao Y, He X, Ding C, Wang S, Feng Y, Song X, Li P, Wang B** (2017) Identification of Salt Tolerance-related microRNAs and Their Targets in Maize (*Zea mays* L.) Using High-throughput Sequencing and Degradome Analysis. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2017.00864
- Fu S, Wang L, Li C, Zhao Y, Zhang N, Yan L, Li CM, Niu Y** (2024) Integrated Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Analyses Revealed Molecular Mechanism for Salt Resistance in Soybean (*Glycine max* L.) Seedlings. *International Journal of Molecular Sciences* **25**: 13559
- Gan P, Liu F, Li R, Wang S, Luo J** (2019) Chloroplasts— Beyond Energy Capture and Carbon Fixation: Tuning of Photosynthesis in Response to Chilling Stress. *Int J Mol Sci* **20**: 5046
- Gandham P, Rajasekaran K, Sickler C, Mohan H, Gilbert M, Baisakh N** (2024) MicroRNA (miRNA) profiling of maize genotypes with differential response to *Aspergillus flavus* implies zma-miR156–squamosa promoter binding protein (SBP) and zma-miR398/zma-miR394–F -box combinations involved in resistance mechanisms. *Stress Biology* **4**: 26
- Gangl R, Tenhaken R** (2016) Raffinose Family Oligosaccharides Act As Galactose Stores in Seeds and Are Required for Rapid Germination of Arabidopsis in the Dark. *Front Plant Sci* **7**: 1115
- Gao L, Jiang H, Li M, Wang D, Xiang H, Zeng R, Chen L, Zhang X, Zuo J, Yang S, et al** (2024a) Genetic and lipidomic analyses reveal the key role of lipid metabolism for cold tolerance in maize. *Journal of Genetics and Genomics* **51**: 326–337
- Gao L, Pan L, Shi Y, Zeng R, Li M, Li Z, Zhang X, Zhao X, Gong X, Huang W, et al** (2024b) Genetic variation in a heat shock transcription factor modulates cold tolerance in maize. *Molecular Plant* **17**: 1423–1438
- Gao R, Wang Y, Gruber MY, Hannoufa A** (2019a) Corrigendum: miR156/SPL10 Modulates Lateral Root Development, Branching and Leaf Morphology in Arabidopsis by Silencing AGAMOUS-LIKE 79. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2019.00515
- Gao Z, Li J, Luo M, Li H, Chen Q, Wang L, Song S, Zhao L, Xu W, Zhang C, et al** (2019b) Characterization and Cloning of Grape Circular RNAs Identified the Cold Resistance-Related Vv-circATS1. *Plant Physiology* **180**: 966–985
- Gautam T, Dutta M, Jaiswal V, Zinta G, Gahlaut V, Kumar S** (2022) Emerging Roles of SWEET Sugar Transporters in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Cells* **11**: 1303
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **990**: 87–92
- Genzel F, Dicke MD, Junker-Frohn LV, Neuwohner A, Thiele B, Putz A, Usadel B, Wormit A, Wiese-Klinkenberg A** (2021) Impact of Moderate Cold and Salt Stress on the Accumulation of Antioxidant Flavonoids in the Leaves of Two Capsicum Cultivars. *J Agric Food Chem* **69**: 6431–6443

- Gerloff ED, Richardson T, Stahmann MA** (1966) Changes in Fatty Acids of Alfalfa Roots During Cold Hardening 12. *Plant Physiology* **41**: 1280–1284
- Gibson SI** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 93–102
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909–930
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C** (2010) Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* **327**: 812–818
- Goering R, Larsen S, Tan J, Whelan J, Makarevitch I** (2021) QTL mapping of seedling tolerance to exposure to low temperature in the maize IBM RIL population. *PLoS One* **16**: e0254437
- Gonzales LR, Blom S, Henriques R, Bachem CWB, Immink RGH** (2024) LncRNAs: the art of being influential without protein. *Trends Plant Sci* **29**: 770–785
- Gou C, Zafar S, Fatima, Hasnain Z, Aslam N, Iqbal N, Abbas S, Li H, Li J, Chen B, et al** (2024) Machine and Deep Learning: Artificial Intelligence Application in Biotic and Abiotic Stress Management in Plants. *FBL* **29**: 20
- Gramzow L, Theißen G** (2019) Plant miRNA Conservation and Evolution. *In* S de Folter, ed, *Plant MicroRNAs: Methods and Protocols*. Springer, New York, NY, pp 41–50
- Grimaud F, Renaut J, Dumont E, Sergeant K, Lucau-Danila A, Blervacq A-S, Sellier H, Bahrman N, Lejeune-Hénaut I, Delbreil B, et al** (2013) Exploring chloroplastic changes related to chilling and freezing tolerance during cold acclimation of pea (*Pisum sativum* L.). *J Proteomics* **80**: 145–159
- Gu H, Lu M, Zhang Z, Xu J, Cao W, Miao M** (2018) Metabolic process of raffinose family oligosaccharides during cold stress and recovery in cucumber leaves. *Journal of Plant Physiology* **224–225**: 112–120
- Guan Y, Hu J, Wang X, Shao C** (2009) Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J Zhejiang Univ Sci B* **10**: 427–433
- Guan Y, Hwarari D, Korboe HM, Ahmad B, Cao Y, Movahedi A, Yang L** (2023) Low temperature stress-induced perception and molecular signaling pathways in plants. *Environmental and Experimental Botany* **207**: 105190
- Guo Q, Li X, Niu L, Jameson PE, Zhou W** (2021a) Transcription-associated metabolomic adjustments in maize occur during combined drought and cold stress. *Plant Physiology* **186**: 677–695
- Guo R, Liu T, Guo C, Chen G, Fan J, Zhang Q** (2022) Carotenoid biosynthesis is associated with low-temperature adaptation in *Rhodospiridium kratochvilovae*. *BMC Microbiol* **22**: 319
- Guo Y, Yan J, Su Z, Chang J, Yang J, Wei C, Zhang Y, Ma J, Zhang X, Li H** (2021b) Abscisic Acid Mediates Grafting-Induced Cold Tolerance of Watermelon via Interaction With Melatonin and Methyl Jasmonate. *Front Plant Sci* **12**: 785317
- Gupta AK, Kaur N** (2005) Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci* **30**: 761–776

- Gurrieri L, Fermani S, Zaffagnini M, Sparla F, Trost P** (2021) Calvin–Benson cycle regulation is getting complex. *Trends in Plant Science* **26**: 898–912
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP** (2015) Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Molecular Plant* **8**: 1304–1320
- Gurusinghe S, Bradford KJ** (2001) Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. *Seed Science Research* **11**: 121–134
- Gusain S, Joshi S, Joshi R** (2023) Sensing, signalling, and regulatory mechanism of cold-stress tolerance in plants. *Plant Physiol Biochem* **197**: 107646
- Guy C** (1990) Cold Acclimation And Freezing Stress Tolerance: Role Of Protein Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **41**: 187–223
- Guy CL, Haskell D** (1987) Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol* **84**: 872–878
- Habiba U, Ali S, Rizwan M, Ibrahim M, Hussain A, Shahid MR, Alamri SA, Alyemeni MN, Ahmad P** (2019) Alleviative role of exogenously applied mannitol in maize cultivars differing in chromium stress tolerance. *Environ Sci Pollut Res* **26**: 5111–5121
- Hafez EM, Gao Y, Alharbi K, Chen W, Elhawat N, Alshaal T, Osman HS** (2024) Antioxidative and Metabolic Responses in Canola: Strategies with Wood Distillate and Sugarcane Bagasse Ash for Improved Growth under Abiotic Stress. *Plants* **13**: 2152
- Hajihashemi S, Noedoost F, Geuns JMC, Djalovic I, Siddique KHM** (2018) Effect of Cold Stress on Photosynthetic Traits, Carbohydrates, Morphology, and Anatomy in Nine Cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2018.01430
- Han JW, Kim GH** (2013) An ELIP-like gene in the freshwater green alga, *Spirogyra varians* (Zygnematales), is regulated by cold stress and CO<sub>2</sub> influx. *J Appl Phycol* **25**: 1297–1307
- Han Q, Qi J, Hao G, Zhang C, Wang C, Dirk LMA, Downie AB, Zhao T** (2020a) ZmDREB1A Regulates RAFFINOSE SYNTHASE Controlling Raffinose Accumulation and Plant Chilling Stress Tolerance in Maize. *Plant Cell Physiol* **61**: 331–341
- Han Y, Li X, Yan Y, Duan M-H, Xu J-H** (2020b) Identification, characterization, and functional prediction of circular RNAs in maize. *Mol Genet Genomics* **295**: 491–503
- Han Y, Zhao Y, Wang H, Zhang Y, Ding Q, Ma L** (2021) Identification of ceRNA and candidate genes related to fertility conversion of TCMS line YS3038 in wheat. *Plant Physiol Biochem* **158**: 190–207
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J** (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**: 384–388
- ul Haq S, Khan A, Ali M, Khattak AM, Gai W-X, Zhang H-X, Wei A-M, Gong Z-H** (2019) Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 5321
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V** (2020) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* **9**: 681

- Hassan MU, Nawaz M, Shah AN, Raza A, Barbanti L, Skalicky M, Hashem M, Brestic M, Pandey S, Alamri S, et al** (2023) Trehalose: A Key Player in Plant Growth Regulation and Tolerance to Abiotic Stresses. *J Plant Growth Regul* **42**: 4935–4957
- Hayami N, Sakai Y, Kimura M, Saito T, Tokizawa M, Iuchi S, Kurihara Y, Matsui M, Nomoto M, Tada Y, et al** (2015) The Responses of Arabidopsis Early Light-Induced Protein2 to Ultraviolet B, High Light, and Cold Stress Are Regulated by a Transcriptional Regulatory Unit Composed of Two Elements. *Plant Physiol* **169**: 840–855
- He J, Yao L, Pecoraro L, Liu C, Wang J, Huang L, Gao W** (2023) Cold stress regulates accumulation of flavonoids and terpenoids in plants by phytohormone, transcription process, functional enzyme, and epigenetics. *Critical Reviews in Biotechnology* **43**: 680–697
- He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X** (2017) Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry* **44**: 532–553
- He W, Wang Y, Luo H, Li D, Liu C, Song J, Zhang Z, Liu C, Niu L** (2020a) Effect of NaCl stress and supplemental CaCl<sub>2</sub> on carotenoid accumulation in germinated yellow maize kernels. *Food Chemistry* **309**: 125779
- He X, Guo S, Wang Y, Wang L, Shu S, Sun J** (2020b) Systematic identification and analysis of heat-stress-responsive lncRNAs, circRNAs and miRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Physiol Plant* **168**: 736–754
- Heath RL, Packer L** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189–198
- Heidarvand L, Maali Amiri R** (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol Plant* **32**: 419–431
- Heilmann M, Heilmann I** (2015) Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation. *Biochim Biophys Acta* **1851**: 759–769
- Henry VJ, Bandrowski AE, Pepin A-S, Gonzalez BJ, Desfeux A** (2014) OMICtools: an informative directory for multi-omic data analysis. *Database (Oxford)* **2014**: bau069
- Hilal M, Parrado MF, Rosa M, Gallardo M, Orce L, Massa EM, González JA, Prado FE** (2004) Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiations. *Photochem Photobiol* **79**: 205–210
- Hirayama T, Shinozaki K** (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal* **61**: 1041–1052
- Ho L-H, Rode R, Siegel M, Reinhardt F, Neuhaus HE, Yvin J-C, Pluchon S, Hosseini SA, Pommerrenig B** (2020) Potassium Application Boosts Photosynthesis and Sorbitol Biosynthesis and Accelerates Cold Acclimation of Common Plantain (*Plantago major* L.). *Plants (Basel)* **9**: 1259
- Höftberger M, Althammer M, Foissner I, Tenhaken R** (2022) Galactose induces formation of cell wall stubs and cell death in Arabidopsis roots. *Planta* **256**: 26
- Hopkins WG** (1999) Introduction to plant physiology. New York : J. Wiley
- Hou Q, Ufer G, Bartels D** (2016) Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ* **39**: 1029–1048
- Hörmann F, Küchler M, Sveshnikov D, Oppermann U, Li Y, Soll J** (2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem* **279**: 34756–34762

- Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, Mei H, Liu J, Wang W, Liu Q** (2022a) Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm* (2020) **3**: e161
- Hu X, Wei Q, Wu H, Huang Y, Peng X, Han G, Ma Q, Zhao Y** (2022b) Identification and characterization of heat-responsive lncRNAs in maize inbred line CM1. *BMC Genomics* **23**: 208
- Hu X, Wu X, Li C, Lu M, Liu T, Wang Y, Wang W** (2012) Abscisic Acid Refines the Synthesis of Chloroplast Proteins in Maize (*Zea mays*) in Response to Drought and Light. *PLOS ONE* **7**: e49500
- Hu Y, Jiang L, Wang F, Yu D** (2013) Jasmonate regulates the inducer of cbf expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2907–2924
- Hu Y, Jiang Y, Han X, Wang H, Pan J, Yu D** (2017) Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones. *J Exp Bot* **68**: 1361–1369
- Hu Y, Wu Q, Sprague SA, Park J, Oh M, Rajashekar CB, Koiwa H, Nakata PA, Cheng N, Hirschi KD, et al** (2015) Tomato expressing Arabidopsis glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Hortic Res* **2**: 1–11
- Huang C, Ding S, Zhang H, Du H, An L** (2011) CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in Arabidopsis thaliana. *Plant Sci* **181**: 57–64
- Huang J, Wang Y, Yu J, Li F, Yi L, Li Y, Xie N, Wu Q, Samarina L, Tong W, et al** (2023) Evolutionary Landscape of Tea Circular RNAs and Its Contribution to Chilling Tolerance of Tea Plant. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 1478
- Huang X, Chen M-H, Yang L-T, Li Y-R, Wu J-M** (2015) Effects of Exogenous Abscisic Acid on Cell Membrane and Endogenous Hormone Contents in Leaves of Sugarcane Seedlings under Cold Stress. *Sugar Tech* **17**: 59–64
- Hund A, Fracheboud Y, Soldati A, Frascaroli E, Salvi S, Stamp P** (2004) QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theor Appl Genet* **109**: 618–629
- Hund A, Fracheboud Y, Soldati A, Stamp P** (2008) Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *European Journal of Agronomy* **28**: 178–185
- Huner NPA, Williams JP** (1988) Low-temperature-induced alterations in photosynthetic membranes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. doi: 10.1080/07352688809382266
- Hunter MC, Smith RG, Schipanski ME, Atwood LW, Mortensen DA** (2017) Agriculture in 2050: Recalibrating Targets for Sustainable Intensification. *BioScience* **67**: 386–391
- Huo C, Zhang ,Baowen, and Wang R** (2022) Research progress on plant noncoding RNAs in response to low-temperature stress. *Plant Signaling & Behavior* **17**: 2004035
- Hussain HA, Hussain S, Khaliq A, Ashraf U, Anjum SA, Men S, Wang L** (2018) Chilling and Drought Stresses in Crop Plants: Implications, Cross Talk, and Potential Management Opportunities. *Front Plant Sci* **9**: 393
- Hussain HA, Men S, Hussain S, Chen Y, Ali S, Zhang S, Zhang K, Li Y, Xu Q, Liao C, et al** (2019) Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Sci Rep* **9**: 3890

- Hwarari D, Guan Y, Ahmad B, Movahedi A, Min T, Hao Z, Lu Y, Chen J, Yang L** (2022) ICE-CBF-COR Signaling Cascade and Its Regulation in Plants Responding to Cold Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 1549
- Imadi SR, Kazi AG, Ahanger MA, Gucel S, Ahmad P** (2015) Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. *J Genet* **94**: 525–537
- Imin N, Nizamidin M, Wu T, Rolfe BG** (2007) Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **58**: 439–451
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)** (2019) *Climate Change and Land: an IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems* (SRCCL)
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)** (2023) *Climate Change 2022 – Impacts, Adaptation and Vulnerability: Working Group II Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. doi: 10.1017/9781009325844
- Iqbal Z, Memon AG, Ahmad A, Iqbal MS** (2022) Calcium Mediated Cold Acclimation in Plants: Underlying Signaling and Molecular Mechanisms. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.855559
- Islam T, Manna M, Kaul T, Pandey S, Reddy CS, Reddy MK** (2015) Genome-Wide Dissection of Arabidopsis and Rice for the Identification and Expression Analysis of Glutathione Peroxidases Reveals Their Stress-Specific and Overlapping Response Patterns. *Plant Mol Biol Rep* **33**: 1413–1427
- Jacob P, Hirt H, Bendahmane A** (2017) The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 405–414
- Jägermeyr J, Müller C, Ruane AC, Elliott J, Balkovic J, Castillo O, Faye B, Foster I, Folberth C, Franke JA, et al** (2021) Climate impacts on global agriculture emerge earlier in new generation of climate and crop models. *Nature Food* **2**: 873–885
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF** (1998) Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104–106
- Jahed KR, Saini AK, Sherif SM** (2023) Coping with the cold: unveiling cryoprotectants, molecular signaling pathways, and strategies for cold stress resilience. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2023.1246093
- Jamalian S, Gholami M, Esna-Ashari M** (2013) Abscisic acid-mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield is strawberry under different salt stress regimes. *Theor Exp Plant Physiol* **25**: 291–299
- Janmohammadi M, Zolla L, Rinalducci S** (2015) Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry* **117**: 76–89
- Janowiak F, Maas B, Dörffling K** (2002) Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* **159**: 635–643
- Jerome Jeyakumar JM, Ali A, Wang W-M, Thiruvengadam M** (2020) Characterizing the Role of the miR156-SPL Network in Plant Development and Stress Response. *Plants (Basel)* **9**: 1206

- Jha Y, Kulkarni A, Subramanian RB** (2021) Psychrotrophic Soil Microbes and Their Role in Alleviation of Cold Stress in Plants. *In* AN Yadav, ed, *Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture: Functional Annotation*. Springer International Publishing, Cham, pp 267–286
- Jia Q, Kong D, Li Q, Sun S, Song J, Zhu Y, Liang K, Ke Q, Lin W, Huang J** (2019) The Function of Inositol Phosphatases in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 3999
- Jiang B, Shi Y, Peng Y, Jia Y, Yan Y, Dong X, Li H, Dong J, Li J, Gong Z, et al** (2020) Cold-Induced CBF-PIF3 Interaction Enhances Freezing Tolerance by Stabilizing the phyB Thermosensor in Arabidopsis. *Mol Plant* **13**: 894–906
- Jiang F, Lv S, Zhang Z, Chen Q, Mai J, Wan X, Liu P** (2023) Integrated metabolomics and transcriptomics analysis during seed germination of waxy corn under low temperature stress. *BMC Plant Biol* **23**: 190
- Jiang J, Hou R, Yang N, Li L, Deng J, Qin G, Ding D** (2021) Physiological and TMT-labeled proteomic analyses reveal important roles of sugar and secondary metabolism in Citrus junos under cold stress. *J Proteomics* **237**: 104145
- Jiang J, Ma S, Ye N, Jiang M, Cao J, Zhang J** (2017) WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *J Integr Plant Biol* **59**: 86–101
- Jiang Y, Li M, Qian Y, Rong H, Xie T, Wang S, Zhao H, Yang L, Wang Q, Cao Y** (2025) Analysis of the Transcriptome Provides Insights into the Photosynthate of Maize Response to Salt Stress by 5-Aminolevulinic Acid. *Int J Mol Sci* **26**: 786
- Jiao P, Ma R, Wang C, Chen N, Liu S, Qu J, Guan S, Ma Y** (2022) Integration of mRNA and microRNA analysis reveals the molecular mechanisms underlying drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.932667
- Jiménez S, Dridi J, Gutiérrez D, Moret D, Irigoyen JJ, Moreno MA, Gogorcena Y** (2013) Physiological, biochemical and molecular responses in four Prunus rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiology* **33**: 1061–1075
- Jin J, Lu P, Xu Y, Li Z, Yu S, Liu J, Wang H, Chua N-H, Cao P** (2021a) PLncDB V2.0: a comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res* **49**: D1489–D1495
- Jin Y, Zhang Z, Xi Y, Yang Z, Xiao Z, Guan S, Qu J, Wang P, Zhao R** (2021b) Identification and Functional Verification of Cold Tolerance Genes in Spring Maize Seedlings Based on a Genome-Wide Association Study and Quantitative Trait Locus Mapping. *Front Plant Sci* **12**: 776972
- Jin Y, Zhang C, Yang H, Yang Y, Huang C, Tian Y, Lu X** (2011) Proteomic analysis of cold stress responses in tobacco seedlings. *African Journal of Biotechnology* **10**: 18991–19004
- Jing Y, Lang S, Wang D, Xue H, Wang X-F** (2018) Functional characterization of galactinol synthase and raffinose synthase in desiccation tolerance acquisition in developing Arabidopsis seeds. *J Plant Physiol* **230**: 109–121
- Jing Z, Liu N, Zhang Z, Hou X** (2024) Research Progress on Plant Responses to Stress Combinations in the Context of Climate Change. *Plants* **13**: 469
- Jompuk C, Fracheboud Y, Stamp P, Leipner J** (2005) Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1153–1163

- Jończyk M, Sobkowiak A, Trzcinska-Danielewicz J, Skoneczny M, Solecka D, Fronk J, Sowiński P** (2017) Global analysis of gene expression in maize leaves treated with low temperature. II. Combined effect of severe cold (8 °C) and circadian rhythm. *Plant Mol Biol* **95**: 279–302
- Kalvari I, Nawrocki EP, Ontiveros-Palacios N, Argasinska J, Lamkiewicz K, Marz M, Griffiths-Jones S, Toffano-Nioche C, Gautheret D, Weinberg Z, et al** (2021) Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Res* **49**: D192–D200
- Kanayama Y, Moriguchi R, Deguchi M, Kanahama K, Yamaki S** (2007) Effects of environmental stresses and abscisic acid on sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in *Rosaceae* fruit trees. *Acta Hort* 375–381
- Kanayama Y, Watanabe M, Moriguchi R, Deguchi M, Kanahama K, Yamaki S** (2006) Effects of Low Temperature and Abscisic Acid on the Expression of the Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase Gene in Apple Leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **75**: 20–25
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, et al** (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* **36**: D480–484
- Kang Y-J, Yang D-C, Kong L, Hou M, Meng Y-Q, Wei L, Gao G** (2017) CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research* **45**: W12–W16
- Kansal S, Panwar V, Mutum RD, Raghuvanshi S** (2021) Investigations on Regulation of MicroRNAs in Rice Reveal [Ca<sup>2+</sup>]cyt Signal Transduction Regulated MicroRNAs. *Front Plant Sci* **12**: 720009
- Kassambara A, Mundt F** (2020). *factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses*. Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html> Accessed April 30, 2024
- Kato S, Tanno Y, Takaichi S, Shinomura T** (2019) Low Temperature Stress Alters the Expression of Phytoene Desaturase Genes (crtP1 and crtP2) and the ζ-Carotene Desaturase Gene (crtQ) Together with the Cellular Carotenoid Content of *Euglena gracilis*. *Plant Cell Physiol* **60**: 274–284
- Kaur N, Pandey A, Shivani, Kumar P, Pandey P, Kesarwani AK, Mantri SS, Awasthi P, Tiwari S** (2017) Regulation of Banana Phytoene Synthase (MaPSY) Expression, Characterization and Their Modulation under Various Abiotic Stress Conditions. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2017.00462
- Kawarazaki T, Kimura S, Iizuka A, Hanamata S, Nibori H, Michikawa M, Imai A, Abe M, Kaya H, Kuchitsu K** (2013) A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 2775–2780
- Kerr R, Hasegawa T, Lasco R, Bhatt I, Deryng D, Farrell A, Gurney-Smith H, Ju H, Lluch-Cota S, Nelson G, et al** (2022) IPCC AR6 WGII Chapter05 Food fibre other ecosystem products. doi: 10.1017/9781009325844.007
- Khan MKR, Ditta A, Wang B, Fang L, Anwar Z, Ijaz A, Ahmed SR, Khan SM** (2023) The Intervention of Multi-Omics Approaches for Developing Abiotic Stress Resistance in Cotton Crop Under Climate Change. *In* CS Prakash, S Fiaz, MA Nadeem, FS Baloch, A Qayyum, eds, Sustainable

Agriculture in the Era of the OMICs Revolution. Springer International Publishing, Cham, pp 37–82

**Kidokoro S, Konoura I, Soma F, Suzuki T, Miyakawa T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2023) Clock-regulated coactivators selectively control gene expression in response to different temperature stress conditions in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **120**: e2216183120

**Kidokoro S, Yoneda K, Takasaki H, Takahashi F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2017) Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature. *The Plant Cell* **29**: 760–774

**Kidwai M, Ahmad IZ, Chakrabarty D** (2020) Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. *Plant Cell Rep* **39**: 1381–1393

**Kilian B, Ozkan H, Deusch O, Effgen S, Brandolini A, Kohl J, Martin W, Salamini F** (2007) Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Mol Biol Evol* **24**: 217–227

**Kim BH, Kim SY, Nam KH** (2012) Genes encoding plant-specific class III peroxidases are responsible for increased cold tolerance of the brassinosteroid-insensitive 1 mutant. *Mol Cells* **34**: 539–548

**Kim Y-J, Jang M-G, Noh H-Y, Lee H-J, Sukweenadhi J, Kim J-H, Kim S-Y, Kwon W-S, Yang D-C** (2014) Molecular characterization of two *glutathione peroxidase* genes of *Panax ginseng* and their expression analysis against environmental stresses. *Gene* **535**: 33–41

**Kim YJ, Kim W-Y, Somers DE** (2024) HOS15-mediated turnover of PRR7 enhances freezing tolerance. *New Phytol* **244**: 798–810

**Kim YS, Lee M, Lee J-H, Lee H-J, Park C-M** (2015) The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **89**: 187–201

**Kimura S, Kawarazaki T, Nibori H, Michikawa M, Imai A, Kaya H, Kuchitsu K** (2013) The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of *Arabidopsis* NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *J Biochem* **153**: 191–195

**Kindgren P, Ard R, Ivanov M, Marquardt S** (2018) Transcriptional read-through of the long non-coding RNA SVALKA governs plant cold acclimation. *Nat Commun* **9**: 4561

**Kitajima M, Butler WL** (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **376**: 105–115

**Kisa D, Elmastaş M, Öztürk L, Kayır Ö** (2016) Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Appl Biol Chem* **59**: 813–820

**Klein A, Keyster M, Ludidi N** (2015) Response of soybean nodules to exogenously applied caffeic acid during NaCl-induced salinity. *South African Journal of Botany* **96**: 13–18

**Kolesiński P, Piechota J, Szczepaniak A** (2011) Initial characteristics of RbcX proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **77**: 447–459

- Kollipara KP, Saab IN, Wych RD, Lauer MJ, Singletary GW** (2002) Expression Profiling of Reciprocal Maize Hybrids Divergent for Cold Germination and Desiccation Tolerance. *Plant Physiology* **129**: 974–992
- Kolo Z, Majola A, Phillips K, Ali AEE, Sharp RE, Ludidi N** (2023) Water Deficit-Induced Changes in Phenolic Acid Content in Maize Leaves Is Associated with Altered Expression of Cinnamate 4-Hydroxylase and p-Coumaric Acid 3-Hydroxylase. *Plants* **12**: 101
- Kong X, Pan J, Zhang D, Jiang S, Cai G, Wang L, Li D** (2013) Identification of mitogen-activated protein kinase kinase gene family and MKK-MAPK interaction network in maize. *Biochem Biophys Res Commun* **441**: 964–969
- Kong X, Pan J, Zhang M, Xing X, Zhou Y, Liu Y, Li D, Li D** (2011) ZmMKK4, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **34**: 1291–1303
- Kosová K, Klíma M, Prášil IT, Vítámvás P** (2021) COR/LEA Proteins as Indicators of Frost Tolerance in Triticeae: A Comparison of Controlled versus Field Conditions. *Plants (Basel)* **10**: 789
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT** (2014) Proteomics of stress responses in wheat and barley—search for potential protein markers of stress tolerance. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00711
- Kostić AŽ, Milinčić DD, Nedić N, Gašić UM, Špirović Trifunović B, Vojt D, Tešić ŽL, Pešić MB** (2021) Phytochemical Profile and Antioxidant Properties of Bee-Collected Artichoke (*Cynara scolymus*) Pollen. *Antioxidants* **10**: 1091
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S** (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* **47**: D155–D162
- Kravić N, Babić V, Vukadinović J, Ristić D, Dragičević V, Mladenović Drinić S, Andjelković V** (2021) Alteration of Metabolites Accumulation in Maize Inbreds Leaf Tissue under Long-Term Water Deficit. *Biology* **10**: 694
- Kreft I, Vollmannová A, Lidiková J, Musilová J, Germ M, Golob A, Vombergar B, Kocjan Ačko D, Luthar Z** (2022) Molecular Shield for Protection of Buckwheat Plants from UV-B Radiation. *Molecules* **27**: 5577
- Krishna R, Wang J, Ahern W, Sturmfels P, Venkatesh P, Kalvet I, Lee GR, Morey-Burrows FS, Anishchenko I, Humphreys IR, et al** (2024) Generalized biomolecular modeling and design with RoseTTAFold All-Atom. *Science*. doi: 10.1126/science.adl2528
- Kruger NJ** (2009) The Bradford Method For Protein Quantitation. *In* JM Walker, ed, *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 17–24
- Kulakova AV, Shchennikova AV, Kochieva EZ** (2024) Potato *Solanum tuberosum* L. Phytoene Synthase Genes (*StPSY1*, *StPSY2*, and *StPSY3*) Are Involved in the Plant Response to Cold Stress. *Dokl Biol Sci* **516**: 21–26
- Kumar K, Debnath P, Singh S, Kumar N** (2023) An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. *Stresses* **3**: 570–585
- Kumar V, Sahu B, Suyal DC, Karthika P, Singh M, Singh D, Kumar S, Yadav AN, Soni R** (2021) Strategies for Abiotic Stress Management in Plants Through Soil Rhizobacteria. *In* AN Yadav, ed,

Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture: Functional Annotation. Springer International Publishing, Cham, pp 287–313

**Kwon JH, Nam EY, Yun SK, Kim SJ, Yu DJ, Lee HJ** (2022) Comparative carbohydrate metabolism in the shoots of a cold-hardy and a cold-sensitive peach (*Prunus persica*) cultivar during cold acclimation and deacclimation. *Hortic Environ Biotechnol* **63**: 39–53

**Lainé CMS, Abdelgawad H, Beemster GTS** (2023) A meta-analysis reveals differential sensitivity of cold stress responses in the maize leaf. *Plant, Cell & Environment* **46**: 2432–2449

**Langfelder P, Horvath S** (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**: 559

**Langmead B, Salzberg SL** (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357–359

**Lee JW, Lee SH, Han JW, Kim GH** (2020) Early Light-Inducible Protein (ELIP) Can Enhance Resistance to Cold-Induced Photooxidative Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front Physiol*. doi: 10.3389/fphys.2020.01083

**Leng Y, Sun J, Wang J, Liu H, Zheng H, Zhang M, Zhao H, Zou D** (2020) Genome-wide lncRNAs identification and association analysis for cold-responsive genes at the booting stage in rice (*Oryza sativa* L.). *The Plant Genome* **13**: e20020

**Leung D** (2018) Studies of Catalase in Plants Under Abiotic Stress. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. pp 27–39

**Levitt** (1956) The Hardiness of Plants. *BioScience* **6**: 37

**Leyser O** (2018) Auxin Signaling. *Plant Physiology* **176**: 465–479

**Li A, Zhang J, Zhou Z** (2014) PLEK: a tool for predicting long non-coding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme. *BMC Bioinformatics* **15**: 311

**Li B, Wang W** (2021) Salicylic acid induces tolerance of *Vitis riparia* × *V. labrusca* to chilling stress by altered photosynthetic, antioxidant mechanisms and expression of cold stress responsive genes. *Plant Signal Behav* **16**: 1973711

**Li C-L, Wang M, Wu X-M, Chen D-H, Lv H-J, Shen J-L, Qiao Z, Zhang W** (2016a) TH11, a Thiamine Thiazole Synthase, Interacts with Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase CPK33 and Modulates the S-Type Anion Channels and Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **170**: 1090–1104

**Li D-M, Nie Y-X, Zhang J, Yin J-S, Li Q, Wang X-J, Bai J-G** (2013) Ferulic acid pretreatment enhances dehydration-stress tolerance of cucumber seedlings. *Biol Plant* **57**: 711–717

**Li S** (2014) Redox Modulation Matters: Emerging Functions for Glutaredoxins in Plant Development and Stress Responses. *Plants* **3**: 559–582

**Li H, Durbin R** (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754–1760

**Li H, Ye K, Shi Y, Cheng J, Zhang X, Yang S** (2017) BZR1 Positively Regulates Freezing Tolerance via CBF-Dependent and CBF-Independent Pathways in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **10**: 545–559

- Li H, Yue H, Xie J, Bu J, Li L, Xin X, Zhao Y, Zhang H, Yang L, Wang J, et al** (2021a) Transcriptomic profiling of the high-vigour maize (*Zea mays* L.) hybrid variety response to cold and drought stresses during seed germination. *Sci Rep* **11**: 19345
- Li J, Song Q, Zuo Z-F, Liu L** (2022a) MicroRNA398: A Master Regulator of Plant Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 10803
- Li J, Yang Y, Sun K, Chen Y, Chen X, Li X** (2019a) Exogenous Melatonin Enhances Cold, Salt and Drought Stress Tolerance by Improving Antioxidant Defense in Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Molecules* **24**: 1826
- Li J, Yu Q, Liu C, Zhang N, Xu W** (2025) Flavonoids as key players in cold tolerance: molecular insights and applications in horticultural crops. *Horticulture Research* **uhae366**
- Li J, Zhao M, Liu L, Guo X, Pei Y, Wang C, Song X** (2023) Exogenous Sorbitol Application Confers Drought Tolerance to Maize Seedlings through Up-Regulating Antioxidant System and Endogenous Sorbitol Biosynthesis. *Plants* **12**: 2456
- Li K, Pan J, Xiong W, Xie W, Ali T** (2022b) The impact of 1.5 °C and 2.0 °C global warming on global maize production and trade. *Sci Rep* **12**: 17268
- Li K-L, Bai X, Li Y, Cai H, Ji W, Tang L-L, Wen Y-D, Zhu Y-M** (2011) GsGASA1 mediated root growth inhibition in response to chronic cold stress is marked by the accumulation of DELLAs. *J Plant Physiol* **168**: 2153–2160
- Li M, Lin L, Zhang Y, Sui N** (2019b) ZmMYB31, a R2R3-MYB transcription factor in maize, positively regulates the expression of CBF genes and enhances resistance to chilling and oxidative stress. *Mol Biol Rep* **46**: 3937–3944
- Li M, Sui N, Lin L, Yang Z, Zhang Y** (2019c) Transcriptomic profiling revealed genes involved in response to cold stress in maize. *Funct Plant Biol* **46**: 830–844
- Li M, Wang C, Shi J, Zhang Y, Liu T, Qi H** (2021b) Abscisic acid and putrescine synergistically regulate the cold tolerance of melon seedlings. *Plant Physiol Biochem* **166**: 1054–1064
- Li M, Yue T, Han J, Wang J, Xiao H, Shang F** (2024a) Exogenous glucose irrigation alleviates cold stress by regulating soluble sugars, ABA and photosynthesis in melon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **217**: 109214
- Li N, Miao J, Li Y, Ji F, Yang M, Dai K, Zhou Z, Hu D, Guo H, Fang H, et al** (2024b) Comparative transcriptome analysis and meta-QTLs mapping reveal the regulatory mechanism of cold tolerance in rice at the budding stage. *Heliyon*. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e37933
- Li P, Yang X, Wang H, Pan T, Yang J, Wang Y, Xu Y, Yang Z, Xu C** (2021c) Metabolic responses to combined water deficit and salt stress in maize primary roots. *Journal of Integrative Agriculture* **20**: 109–119
- Li Q, Jiang Y-L, Xia L-Y, Chen Y, Zhou C-Z** (2022c) Structural insights into cyanobacterial RuBisCO assembly coordinated by two chaperones Raf1 and RbcX. *Cell Discov* **8**: 93
- Li S** (2014) Redox Modulation Matters: Emerging Functions for Glutaredoxins in Plant Development and Stress Responses. *Plants* **3**: 559–582
- Li T, Zhang Y, Liu Y, Li X, Hao G, Han Q, Dirk LMA, Downie AB, Ruan Y-L, Wang J, et al** (2020a) Raffinose synthase enhances drought tolerance through raffinose synthesis or galactinol hydrolysis in maize and Arabidopsis plants. *Journal of Biological Chemistry* **295**: 8064–8077

- Li W, Mi X, Jin X, Zhang D, Zhu G, Shang X, Zhang D, Guo W** (2022d) Thiamine functions as a key activator for modulating plant health and broad-spectrum tolerance in cotton. *Plant J* **111**: 374–390
- Li Y, Guo L, Liang C, Meng Z, Tahira S, Guo S, Zhang R** (2022e) Overexpression of *Brassica napus* cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase genes significantly enhanced tobacco growth and biomass. *Journal of Integrative Agriculture* **21**: 49–59
- Li Y, Wang X, Li Y, Zhang Y, Gou Z, Qi X, Zhang J** (2020b) Transcriptomic Analysis Revealed the Common and Divergent Responses of Maize Seedling Leaves to Cold and Heat Stresses. *Genes* **11**: 881
- Li Z, Fu D, Wang X, Zeng R, Zhang X, Tian J, Zhang S, Yang X, Tian F, Lai J, et al** (2022f) The transcription factor bZIP68 negatively regulates cold tolerance in maize. *The Plant Cell* **34**: 2833–2851
- Li Z, Hu G, Liu X, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Yuan X, Zhang Q, Yang D, Wang T, et al** (2016b) Transcriptome Sequencing Identified Genes and Gene Ontologies Associated with Early Freezing Tolerance in Maize. *Front Plant Sci* **7**: 1477
- Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, et al** (2015a) Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* **22**: 256–264
- Li J, Ma W, Zeng P, Wang J, Geng B, Yang J, Cui Q** (2015b) LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Briefings in Bioinformatics* **16**: 806–812
- Liebsch D, Palatnik JF** (2020) MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology. *Curr Opin Plant Biol* **53**: 31–42
- Lim CW, Lee SC** (2020) ABA-Dependent and ABA-Independent Functions of RCAR5/PYL11 in Response to Cold Stress. *Front Plant Sci* **11**: 587620
- Lima RBS, Gonçalves JF de C, Pando SC, Fernandes AV, Santos ALW dos** (2008) Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) seeds. *Rev Árvore* **32**: 19–25
- Lin Y, Xu H, Yin G, Zhou Y, Lu X, Xin X** (2022) Dynamic Changes in Membrane Lipid Metabolism and Antioxidant Defense During Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Seed Aging. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.908949
- Lin Y, Zhang C, Lan H, Gao S, Liu H, Liu J, Cao M, Pan G, Rong T, Zhang S** (2014) Validation of Potential Reference Genes for qPCR in Maize across Abiotic Stresses, Hormone Treatments, and Tissue Types. *PLOS ONE* **9**: e95445
- Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D** (2009) Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* **136**: 223–236
- Liu DL, Zeleke KT, Wang B, Macadam I, Scott F, Martin RJ** (2017) Crop residue incorporation can mitigate negative climate change impacts on crop yield and improve water use efficiency in a semiarid environment. *European Journal of Agronomy* **85**: 51–68
- Liu G, Liu F, Wang Y, Liu X** (2022a) A novel long noncoding RNA *CIL1* enhances cold stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Science* **323**: 111370

- Liu H-H, Tian X, Li Y-J, Wu C-A, Zheng C-C** (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **14**: 836–843
- Liu J, Guo X, Zhai T, Shu A, Zhao L, Liu Z, Zhang S** (2020a) Genome-wide identification and characterization of microRNAs responding to ABA and GA in maize embryos during seed germination. *Plant Biology* **22**: 949–957
- Liu L, Basso B** (2020) Impacts of climate variability and adaptation strategies on crop yields and soil organic carbon in the US Midwest. *PLOS ONE* **15**: e0225433
- Liu L, Wu X, Sun W, Yu X, Demura T, Li D, Zhuge Q** (2021) Galactinol synthase confers salt-stress tolerance by regulating the synthesis of galactinol and raffinose family oligosaccharides in poplar. *Industrial Crops and Products* **165**: 113432
- Liu P, Zhang Y, Zou C, Yang C, Pan G, Ma L, Shen Y** (2022b) Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNAs reveals the regulatory network of maize seedling root responding to salt stress. *BMC Genomics* **23**: 50
- Liu R, Ma Y, Guo T, Li G** (2023) Identification, biogenesis, function, and mechanism of action of circular RNAs in plants. *Plant Comm.* doi: 10.1016/j.xplc.2022.100430
- Liu T, Ye X, Li M, Li J, Qi H, Hu X** (2020b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO are involved in trehalose-regulated oxidative stress tolerance in cold-stressed tomato plants. *Environmental and Experimental Botany* **171**: 103961
- Liu X, Tian L-X, Tong H-Y, Zuo S-Y, Li J** (2018) Physiological manifestations of maize seedling roots regulated by exogenous trehalose under low temperature stress. *Chinese Journal of Ecology* **37**: 2354–2361
- Liu X, Zhang Y, Yang C, Tian Z, Li J** (2016) AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development. *Sci Rep* **6**: 24563
- Liu X, Zhang Y, Yang H, Liang Y, Li X, Oliver MJ, Zhang D** (2020c) Functional Aspects of Early Light-Induced Protein (ELIP) Genes from the Desiccation-Tolerant Moss *Syntrichia caninervis*. *Int J Mol Sci* **21**: 1411
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**: 402–408
- Love MI, Huber W, Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**: 550
- Lu Q, Guo F, Xu Q, Cang J** (2020a) LncRNA improves cold resistance of winter wheat by interacting with miR398. *Functional Plant Biol* **47**: 544–557
- Lu Q, Xu Q, Guo F, Lv Y, Song C, Feng M, Yu J, Zhang D, Cang J** (2020b) Identification and characterization of long non-coding RNAs as competing endogenous RNAs in the cold stress response of *Triticum aestivum*. *Plant Biology* **22**: 635–645
- Lu X, Wang J, Wang Y, Wen W, Zhang Y, Du J, Zhao Y, Guo X** (2021) Genome-Wide Association Study of Maize Aboveground Dry Matter Accumulation at Seedling Stage. *Front Genet.* doi: 10.3389/fgene.2020.571236
- Lu X, Yang L, Yu M, Lai J, Wang C, McNeil D, Zhou M, Yang C** (2017) A novel *Zea mays* ssp. *mexicana* L. MYC-type ICE-like transcription factor gene *ZmmICE1*, enhances freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **113**: 78–88

- Lu Y** (2016) Identification and Roles of Photosystem II Assembly, Stability, and Repair Factors in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00168
- Luan M, Xu M, Lu Y, Zhang L, Fan Y, Wang L** (2015) Expression of zma-miR169 miRNAs and their target *ZmNF-YA* genes in response to abiotic stress in maize leaves. *Gene* **555**: 178–185
- Luo M, Liu J, Lee RD, Scully BT, Guo B** (2010) Monitoring the Expression of Maize Genes in Developing Kernels under Drought Stress using Oligo-microarray. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 1059–1074
- Luo Y, Wang Z, Ji H, Fang H, Wang S, Tian L, Li X** (2013) An Arabidopsis homolog of importin  $\beta$ 1 is required for ABA response and drought tolerance. *The Plant Journal* **75**: 377–389
- Luo Z, Han L, Qian J, Li L** (2019) Circular RNAs exhibit extensive intraspecific variation in maize. *Planta* **250**: 69–78
- Lv X, Li H, Chen X, Xiang X, Guo Z, Yu J, Zhou Y** (2018) The role of calcium-dependent protein kinase in hydrogen peroxide, nitric oxide and ABA-dependent cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* **69**: 4127–4139
- Ma C, Burd S, Lers A** (2015a) miR408 is involved in abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **84**: 169–187
- Ma P, Gao S, Zhang HY, Li BY, Zhong HX, Wang YK, Hu HM, Zhang HK, Luo BW, Zhang X, et al** (2021a) Identification and characterization of circRNAs in maize seedlings under deficient nitrogen. *Plant Biol (Stuttg)* **23**: 850–860
- Ma P, Zhang X, Luo B, Chen Z, He X, Zhang H, Li B, Liu D, Wu L, Gao S, et al** (2021b) Transcriptomic and genome-wide association study reveal long noncoding RNAs responding to nitrogen deficiency in maize. *BMC Plant Biol* **21**: 93
- Ma Y, Dai X, Xu Y, Luo W, Zheng X, Zeng D, Pan Y, Lin X, Liu H, Zhang D, et al** (2015b) COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell* **160**: 1209–1221
- Ma Y, Tan R, Zhao J** (2022) Chilling Tolerance in Maize: Insights into Advances—Toward Physio-Biochemical Responses’ and QTL/Genes’ Identification. *Plants (Basel)* **11**: 2082
- Ma Y, Xue H, Zhang F, Jiang Q, Yang S, Yue P, Wang F, Zhang Y, Li L, He P, et al** (2021c) The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression. *Plant Biotechnol J* **19**: 311–323
- Macas J, Lambert GM, Dolezel D, Galbraith DW** (1998) Nuclear expressed sequence Tag (NEST) analysis: a novel means to study transcription through amplification of nuclear RNA. *Cytometry* **33**: 460–468
- Madhu SA, Kaur A, Tyagi S, Upadhyay SK** (2023) Glutathione Peroxidases in Plants: Innumerable Role in Abiotic Stress Tolerance and Plant Development. *J Plant Growth Regul* **42**: 598–613
- Maechler M, Rousseeuw P, Strujf A, Hubert M, Hornik K, Studer M, Roudier P, Gonzalez J, Kozlowski K, Schubert E, et al** (2023) cluster: “Finding Groups in Data”: Cluster Analysis Extended Rousseeuw et al.
- Malhi GS, Kaur M, Kaushik P** (2021) Impact of Climate Change on Agriculture and Its Mitigation Strategies: A Review. *Sustainability* **13**: 1318

- Malone JH, Oliver B** (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology* **9**: 34
- Mao J, Yu Y, Yang J, Li G, Li C, Qi X, Wen T, Hu J** (2017) Comparative transcriptome analysis of sweet corn seedlings under low-temperature stress. *The Crop Journal* **5**: 396–406
- Marguerat S, Bähler J** (2010) RNA-seq: from technology to biology. *Cell Mol Life Sci* **67**: 569–579
- Marolt G, Kolar M** (2020) Analytical Methods for Determination of Phytic Acid and Other Inositol Phosphates: A Review. *Molecules* **26**: 174
- Martins L, Knuesting J, Bariat L, Dard A, Freibert SA, Marchand CH, Young D, Dung NHT, Voth W, Debures A, et al** (2020) Redox Modification of the Iron-Sulfur Glutaredoxin GRXS17 Activates Holdase Activity and Protects Plants from Heat Stress. *Plant Physiology* **184**: 676–692
- Mayland HF, Cary JW** (1970) Frost and Chilling Injury to Growing Plants. In NC Brady, ed, *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 203–234
- Mazhar MW, Ishtiaq M, Maqbool M, Muzammil K, Mohieldin A, Dawria A, Altijani AAG, Salih A, Ali OYM, Elzaki AAM, et al** (2024) Optimizing water relations, gas exchange parameters, biochemical attributes and yield of water-stressed maize plants through seed priming with iron oxide nanoparticles. *BMC Plant Biology* **24**: 624
- Mazi TA, Stanhope KL** (2023) Erythritol: An In-Depth Discussion of Its Potential to Be a Beneficial Dietary Component. *Nutrients* **15**: 204
- Megha S, Basu U, Kav NNV** (2018) Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs. *Plant, Cell & Environment* **41**: 1–15
- Mehmood SS, Lu G, Luo D, Hussain MA, Raza A, Zafar Z, Zhang X, Cheng Y, Zou X, Lv Y** (2021) Integrated analysis of transcriptomics and proteomics provides insights into the molecular regulation of cold response in *Brassica napus*. *Environmental and Experimental Botany* **187**: 104480
- Mendelsohn R** (2009) The Impact of Climate Change on Agriculture in Developing Countries. *Journal of Natural Resources Policy Research* **1**: 5–19
- Meng A, Wen D, Zhang C** (2022) Maize Seed Germination Under Low-Temperature Stress Impacts Seedling Growth Under Normal Temperature by Modulating Photosynthesis and Antioxidant Metabolism. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.843033
- Meng C, Sui N** (2019) Overexpression of maize MYB-IF35 increases chilling tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **135**: 167–173
- Meng F, Ma M, Li S, Liang P, Liang Y, Shi H, Huang S, Su H, Deng Y, Akram MA, et al** (2025) Genome-wide identification of light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHC) gene family in tomato and functional analysis of *SILhcb1.11* and *SIELIP1* under cold stress. *Genomics* 111022
- Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH** (2003) Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. *J Agric Food Chem* **51**: 6887–6892
- Miao H, Sun P, Liu Q, Miao Y, Liu J, Zhang K, Hu W, Zhang J, Wang J, Wang Z, et al** (2017) Genome-wide analyses of SWEET family proteins reveal involvement in fruit development and abiotic/biotic stress responses in banana. *Sci Rep* **7**: 3536
- Millar AA** (2020) The Function of miRNAs in Plants. *Plants* **9**: 198

- Millar AA, Lohe A, Wong G** (2019) Biology and Function of miR159 in Plants. *Plants* **8**: 255
- Minorsky PV** (1989) Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. *Plant, Cell & Environment* **12**: 119–135
- Mirosavljević M, Čanak P, Ćirić M, Nastasić A, Đukić D, Rajković M.** (2013) Maize germination parameters and early seedlings growth under different levels of salt stress. *Ratar. Povrt.* **50**: 49–53.
- Mishra BS, Singh M, Aggrawal P, Laxmi A** (2009) Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS One* **4**: e4502
- Mleziva AD, Ngumbi EN** (2024) Comparative analysis of defensive secondary metabolites in wild teosinte and cultivated maize under flooding and herbivory stress. *Physiologia Plantarum* **176**: e14216
- Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, Abd\_Allah EF** (2017) Systems biology approach in plant abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **121**: 58–73
- Mohapatra SS, Wolfraim L, Poole RJ, Dhindsa RS** (1989) Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiol* **89**: 375–380
- Morales-Navarro S, Pérez-Díaz R, Ortega A, de Marcos A, Mena M, Fenoll C, González-Villanueva E, Ruiz-Lara S** (2018) Overexpression of a SDD1-Like Gene From Wild Tomato Decreases Stomatal Density and Enhances Dehydration Avoidance in *Arabidopsis* and Cultivated Tomato. *Front Plant Sci* **9**: 940
- Morsy MR, Jouve L, Hausman J-F, Hoffmann L, Stewart JM** (2007) Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *J Plant Physiol* **164**: 157–167
- Moustafa K** (2014) MAPK transgenic circuit to improve plant stress-tolerance? *Plant Signal Behav* **9**: e970101
- Mughal A, Jabeen N, Ashraf K, Sultan K, Farhan M, Hussain MI, Deng G, Alsudays IM, Saleh MA, Tariq S, et al** (2024) Exploring the role of caffeic acid in mitigating abiotic stresses in plants: A review. *Plant Stress* **12**: 100487
- Muhammad I, Shalmani A, Ali M, Yang Q-H, Ahmad H, Li FB** (2021) Mechanisms Regulating the Dynamics of Photosynthesis Under Abiotic Stresses. *Front Plant Sci* **11**: 615942
- Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I** (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**: 710–713
- Murray-Tortarolo GN, Jaramillo VJ, Larsen J** (2018) Food security and climate change: the case of rainfed maize production in Mexico. *Agricultural and Forest Meteorology* **253–254**: 124–131
- Nacif de Abreu I, Mazzafera P** (2005) Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 241–248
- Nadarajah KK** (2020) ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Int J Mol Sci* **21**: 5208
- Nägele T, Heyer AG** (2013) Approximating subcellular organisation of carbohydrate metabolism during cold acclimation in different natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **198**: 777–787

- Naing AH, Kim CK** (2021) Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* **172**: 1711–1723
- Nawaz I, Mehboob A, Khan AHA, Naqvi TA, Bangash N, Aziz S, Khan W, Shahzadi I, Barros R, Ullah K, et al** (2024) Higher cadmium and zinc accumulation in parsley (*Petroselinum crispum*) roots activates its antioxidants defense system. *Biometals* **37**: 87–100
- Nejat N, Mantri N** (2018) Emerging roles of long non-coding RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses. *Crit Rev Biotechnol* **38**: 93–105
- Ni Z, Hu Z, Jiang Q, Zhang H** (2013) GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Plant Mol Biol* **82**: 113–129
- Nikolić A, Kravić N, Ristić D, Anđelković V, Marković K, Vančetović J, Ignjatović-Micić D** (2020) Morphological and physiological response of maize seedlings to chilling stress. *Genetika* **52**: 689–698
- Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC, Pogson BJ** (2015) Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant* **8**: 68–82
- Nishiyama Y, Murata N** (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8777–8796
- Niu L, Wang W, Li Y, Wu X, Wang W** (2024) Maize multi-omics reveal leaf water status controlling of differential transcriptomes, proteomes and hormones as mechanisms of age-dependent osmotic stress response in leaves. *Stress Biology* **4**: 19
- Nosarzewski M, Downie AB, Wu B, Archbold DD** (2012) The role of SORBITOL DEHYDROGENASE in *Arabidopsis thaliana*. *Funct Plant Biol* **39**: 462–470
- Oh TR, Yu SG, Yang HW, Kim JH, Kim WT** (2020) AtKPNB1, an *Arabidopsis* importin- $\beta$  protein, is downstream of the RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 in the ABA-mediated drought stress response. *Planta* **252**: 93
- Oliver MJ, Guo L, Alexander DC, Ryals JA, Wone BWM, Cushman JC** (2011) A Sister Group Contrast Using Untargeted Global Metabolomic Analysis Delineates the Biochemical Regulation Underlying Desiccation Tolerance in *Sporobolus stapfianus*. *The Plant Cell* **23**: 1231–1248
- Ozakca DU** (2013) Effect of Abiotic Stress on Photosystem I-Related Gene Transcription in Photosynthetic Organisms. *Photosynthesis*. doi: 10.5772/55350
- Pagliano C, Saracco G, Barber J** (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth Res* **116**: 167–188
- Pál M, Janda T, Majláth I, Szalai G** (2020) Involvement of Salicylic Acid and Other Phenolic Compounds in Light-Dependent Cold Acclimation in Maize. *Int J Mol Sci* **21**: 1942
- Pan J, Zhang M, Kong X, Xing X, Liu Y, Zhou Y, Liu Y, Sun L, Li D** (2012) ZmMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses. *Planta* **235**: 661–676
- Pan T, Sun X, Liu Y, Li H, Deng G, Lin H, Wang S** (2018) Heat stress alters genome-wide profiles of circular RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **96**: 217–229
- Pandey S, Fartyal D, Agarwal A, Shukla T, James D, Kaul T, Negi YK, Arora S, Reddy MK** (2017a) Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2017.00581

- Pandey V, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi U** (2017b) A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. doi: 10.4172/2161-1009.1000308
- Pang J, Zhang X, Ma X, Zhao J** (2019) Spatio-Temporal Transcriptional Dynamics of Maize Long Non-Coding RNAs Responsive to Drought Stress. *Genes* **10**: 138
- Pantelić MM, Dabić Zagorac DČ, Davidović SM, Todić SR, Bešlić ZS, Gašić UM, Tešić ŽLj, Natić MM** (2016) Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry* **211**: 243–252
- Paredes M, Quiles MJ** (2015) The Effects of Cold Stress on Photosynthesis in Hibiscus Plants. *PLOS ONE* **10**: e0137472
- Park S-Y, Grabau E** (2017) Bypassing miRNA-mediated gene regulation under drought stress: alternative splicing affects CSD1 gene expression. *Plant Mol Biol* **95**: 243–252
- Pasandideh Arjmand M, Farrokhi N, Samizadeh Lahiji H, Mohsenzadeh Golfazani M** (2024) Deciphering the Regulatory Network of Some Key Drought-responsive Genes and microRNAs in Canola. *Journal of Genetic Resources* **10**: 29–39
- Passaia G, Spagnolo Fonini L, Caverzan A, Jardim-Messeder D, Christoff AP, Gaeta ML, de Araujo Mariath JE, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2013) The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science* **208**: 93–101
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C** (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* **65**: 1879–1893
- Pathak TB, Maskey ML, Dahlberg JA, Kearns F, Bali KM, Zaccaria D** (2018) Climate Change Trends and Impacts on California Agriculture: A Detailed Review. *Agronomy* **8**: 25
- Peng Y, Ming Y, Jiang B, Zhang X, Fu D, Lin Q, Zhang X, Wang Y, Shi Y, Gong Z, et al** (2024) Differential phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>-permeable channel CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL20 modulates calcium-mediated freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **36**: 4356–4371
- Perdomo JA, Capó-Bauçà S, Carmo-Silva E, Galmés J** (2017) Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. *Front Plant Sci* **8**: 490
- Perez-Riverol Y, Bai M, da Veiga Leprevost F, Squizzato S, Park YM, Haug K, Carroll AJ, Spalding D, Paschall J, Wang M, et al** (2017) Discovering and linking public omics data sets using the Omics Discovery Index. *Nat Biotechnol* **35**: 406–409
- Petroni K, Pilu R, Tonelli C** (2014) Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. *Planta* **240**: 901–911
- Pfaffl, Michael** (2003) Quantification strategies in real-time PCR. A-Z of quantitative PCR, Bustin, S.A. International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, pp 87–112
- Pinhero RG, Rao MV, Paliyath G, Murr DP, Fletcher RA** (1997) Changes in Activities of Antioxidant Enzymes and Their Relationship to Genetic and Paclobutrazol-Induced Chilling Tolerance of Maize Seedlings. *Plant Physiol* **114**: 695–704

- Pisante M, Stagnari F, Acutis M, Bindi M, Brilli L, Di Stefano V, Carozzi M** (2015) Conservation Agriculture and Climate Change. *In* M Farooq, KHM Siddique, eds, Conservation Agriculture. Springer International Publishing, Cham, pp 579–620
- Pleyerová I, Hamet J, Konrádová H, Lipavská H** (2022) Versatile roles of sorbitol in higher plants: luxury resource, effective defender or something else? *Planta* **256**: 13
- Pratyusha S** (2022) Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense: An Overview. *Plant Stress Physiology - Perspectives in Agriculture*. doi: 10.5772/intechopen.102873
- Pugh T a. M, Müller C, Elliott J, Deryng D, Folberth C, Olin S, Schmid E, Arneth A** (2016) Climate analogues suggest limited potential for intensification of production on current croplands under climate change. *Nat Commun* **7**: 12608
- Putri GH, Anders S, Pyl PT, Pimanda JE, Zanini F** (2022) Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0. *Bioinformatics* **38**: 2943–2945
- Qi C, Dong D, Li Y, Wang X, Guo L, Liu L, Dong X, Li X, Yuan X, Ren S, et al** (2022) Heat shock-induced cold acclimation in cucumber through CsHSFA1d-activated JA biosynthesis and signaling. *Plant J* **111**: 85–102
- Qian Z, He L, Li F** (2024) Understanding cold stress response mechanisms in plants: an overview. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2024.1443317
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y-Q, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol* **45**: 1042–1052
- Quinlan AR, Hall IM** (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**: 841–842
- R Core Team** R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Radha B, Sunitha NC, Sah RP, T. P. MA, Krishna GK, Umesh DK, Thomas S, Anilkumar C, Upadhyay S, Kumar A, et al** (2023) Physiological and molecular implications of multiple abiotic stresses on yield and quality of rice. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.996514
- Radović M, Milatović D, Tešić Ž, Tosti T, Gašić U, Dojčinović B, Dabić Zagorac D** (2020) Influence of rootstocks on the chemical composition of the fruits of plum cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* **92**: 103480
- Rahman A, Yadav NS, Byeon B, Ilnytsky Y, Kovalchuk I** (2024) Genomic and Epigenomic Changes in the Progeny of Cold-Stressed *Arabidopsis thaliana* Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **25**: 2795
- Raison JK** (1974) A biochemical explanation of low-temperature stress in tropical and subtropical plants. *Mechanisms of Regulation of Plant Growth*
- Rajput VD, Harish, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, Meena M, Gour VS, Minkina T, Sushkova S, et al** (2021) Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology* **10**: 267
- Ramazan S, Jan N, John R** (2023) Comparative protein analysis of two maize genotypes with contrasting tolerance to low temperature. *BMC Plant Biology* **23**: 183

- Ramazan S, Qazi HA, Dar ZA, John R** (2021) Low temperature elicits differential biochemical and antioxidant responses in maize (*Zea mays*) genotypes with different susceptibility to low temperature stress. *Physiol Mol Biol Plants* **27**: 1395–1412
- Rao X, Cheng N, Mathew IE, Hirschi KD, Nakata PA** (2023) Crucial role of Arabidopsis glutaredoxin S17 in heat stress response revealed by transcriptome analysis. *Funct Plant Biol* **50**: 58–70
- Rapala-Kozik M, Wolak N, Kujda M, Banas AK** (2012) The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in Arabidopsis thaliana seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC Plant Biol* **12**: 2
- Rauf S, Al-Khayri JM, Zaharieva M, Monneveux P, Khalil F** (2016) Breeding Strategies to Enhance Drought Tolerance in Crops. In JM Al-Khayri, SM Jain, DV Johnson, eds, *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*. Springer International Publishing, Cham, pp 397–445
- Ravichandran S, Ragupathy R, Edwards T, Domaratzki M, Cloutier S** (2019) MicroRNA-guided regulation of heat stress response in wheat. *BMC Genomics* **20**: 488
- Rawat A, Kumar D, Khati BS** (2023) A review on climate change impacts, models, and its consequences on different sectors: a systematic approach. *Journal of Water and Climate Change* **15**: 104–126
- Raza A, Bhardwaj S, Atikur Rahman M, García-Caparrós P, Habib M, Saeed F, Charagh S, Foyer CH, Siddique KHM, Varshney RK** (2024a) Trehalose: A sugar molecule involved in temperature stress management in plants. *The Crop Journal* **12**: 1–16
- Raza A, Gangurde SS, Singh Sandhu K, Lv Y** (2024b) Omics-assisted crop improvement under abiotic stress conditions. *Plant Stress* **14**: 100626
- Raza A, Su W, Jia Z, Luo D, Zhang Y, Gao A, Hussain MA, Mehmood SS, Cheng Y, Lv Y, et al** (2022) Mechanistic Insights Into Trehalose-Mediated Cold Stress Tolerance in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Seedlings. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2022.857980
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R** (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* **10**: 1507–1517
- Rezaie R, Abdollahi Mandoulakani B, Fattahi M** (2020) Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. *Sci Rep* **10**: 5290
- Rinalducci S, Egidio MG, Karimzadeh G, Jazii FR, Zolla L** (2011) Proteomic analysis of a spring wheat cultivar in response to prolonged cold stress. *Electrophoresis* **32**: 1807–1818
- del Río LA, Corpas FJ, López-Huertas E, Palma JM** (2018) Plant Superoxide Dismutases: Function Under Abiotic Stress Conditions. In DK Gupta, JM Palma, FJ Corpas, eds, *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–26
- Rippey BR** (2015) The U.S. drought of 2012. *Weather and Climate Extremes* **10**: 57–64
- Ritonga FN, Chen S** (2020) Physiological and Molecular Mechanism Involved in Cold Stress Tolerance in Plants. *Plants (Basel)* **9**: 560
- Riva-Roveda L, Escalé B, Giauffret C, Périlleux C** (2016) Maize plants can enter a standby mode to cope with chilling stress. *BMC Plant Biol* **16**: 212

- Rizza A, Boccaccini A, Lopez-Vidriero I, Costantino P, Vittorioso P** (2011) Inactivation of the ELIP1 and ELIP2 genes affects Arabidopsis seed germination. *New Phytol* **190**: 896–905
- Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, Pachter L** (2011) Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics* **27**: 2325–2329
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140
- Rodriguez Milla MA, Maurer A, Rodriguez Huete A, Gustafson JP** (2003) Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J* **36**: 602–615
- Rodríguez VM, Butrón A, Rady MOA, Soengas P, Revilla P** (2014) Identification of quantitative trait loci involved in the response to cold stress in maize (*Zea mays* L.). *Mol Breeding* **33**: 363–371
- Rohman MM, Islam MR, Monsur MB, Amiruzzaman M, Fujita M, Hasanuzzaman M** (2019) Trehalose Protects Maize Plants from Salt Stress and Phosphorus Deficiency. *Plants* **8**: 568
- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE** (2009) Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 388–393
- Röst HL, Sachsenberg T, Aiche S, Bielow C, Weisser H, Aicheler F, Andreotti S, Ehrlich H-C, Gutenbrunner P, Kenar E, et al** (2016) OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nat Methods* **13**: 741–748
- Roychoudhury A, Banerjee A, Lahiri V** (2015) Metabolic and molecular-genetic regulation of proline signaling and its cross-talk with major effectors mediates abiotic stress tolerance in plants. *Turkish Journal of Botany* **39**: 887–910
- Roychowdhury R, Das SP, Gupta A, Parihar P, Chandrasekhar K, Sarker U, Kumar A, Ramrao DP, Sudhakar C** (2023) Multi-Omics Pipeline and Omics-Integration Approach to Decipher Plant's Abiotic Stress Tolerance Responses. *Genes* **14**: 1281
- Ruiz-Sola MÁ, Rodríguez-Concepción M** (2012) Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *arbo.j*. doi: 10.1199/tab.0158
- Rusk N** (2009) Cheap third-generation sequencing. *Nat Methods* **6**: 244–244
- Sahito JH, Zhang H, Gishkori ZGN, Ma C, Wang Z, Ding D, Zhang X, Tang J** (2024) Advancements and Prospects of Genome-Wide Association Studies (GWAS) in Maize. *International Journal of Molecular Sciences* **25**: 1918
- Sakina A, Wani W, Mushtaq M, Wani SH, Shikari AB** (2019) Omics Approaches for Cold Stress Tolerance in Plants. *In* SH Wani, ed, *Recent Approaches in Omics for Plant Resilience to Climate Change*. Springer International Publishing, Cham, pp 331–356
- Saksena HB, Sharma M, Singh D, Laxmi A** (2020) The versatile role of glucose signalling in regulating growth, development and stress responses in plants. *J Plant Biochem Biotechnol* **29**: 687–699
- Salam U, Ullah S, Tang Z-H, Elateeq AA, Khan Y, Khan J, Khan A, Ali S** (2023) Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. *Life* **13**: 706

- Salesse-Smith CE, Sharwood RE, Busch FA, Kromdijk J, Bardal V, Stern DB (2018)** Overexpression of Rubisco subunits with RAF1 increases Rubisco content in maize. *Nat Plants* **4**: 802–810
- Salesse-Smith CE, Sharwood RE, Busch FA, Stern DB (2020)** Increased Rubisco content in maize mitigates chilling stress and speeds recovery. *Plant Biotechnology Journal* **18**: 1409–1420
- Salmena L, Polisenio L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP (2011)** A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **146**: 353–358
- Sami F, Yusuf M, Faizan M, Faraz A, Hayat S (2016)** Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* **109**: 54–61
- Sanie Khatam A, Rastegar S, Hassanzadeh Khankahdani H (2024)** Modulating cold tolerance in Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle): A combined approach using melatonin, acetic acid and mannitol. *Scientia Horticulturae* **338**: 113634
- Santa Lucia J (1998)** A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 1460–1465
- Santos HP, Buckeridge MS (2004)** The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Ann Bot* **94**: 819–830
- Scheben A, Edwards D (2018)** Bottlenecks for genome-edited crops on the road from lab to farm. *Genome Biology* **19**: 178
- Seeve CM, Sunkar R, Zheng Y, Liu L, Liu Z, McMullen M, Nelson S, Sharp RE, Oliver MJ (2019)** Water-deficit responsive microRNAs in the primary root growth zone of maize. *BMC Plant Biol* **19**: 447
- Sengupta S, Patra B, Ray S, Majumder AL (2008)** Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant Cell Environ* **31**: 1442–1459
- Sepúlveda-García EB, Pulido-Barajas JF, Huerta-Heredia AA, Peña-Castro JM, Liu R, Barrera-Figueroa BE (2020)** Differential Expression of Maize and Teosinte microRNAs under Submergence, Drought, and Alternated Stress. *Plants* **9**: 1367
- Shafi A, Zahoor I (2019)** Bioinformatics and Plant Stress Management. *In* KR Hakeem, NA Shaik, B Banaganapalli, R Elango, eds, *Essentials of Bioinformatics, Volume III: In Silico Life Sciences: Agriculture*. Springer International Publishing, Cham, pp 47–78
- Shafi U, Mumtaz R, García-Nieto J, Hassan SA, Zaidi SAR, Iqbal N (2019)** Precision Agriculture Techniques and Practices: From Considerations to Applications. *Sensors* **19**: 3796
- Shakiba E, Edwards JD, Jodari F, Duke SE, Baldo AM, Korniliev P, McCouch SR, Eizenga GC (2017)** Genetic architecture of cold tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through high resolution genome-wide analysis. *PLOS ONE* **12**: e0172133
- Shen C, Li D, He R, Fang Z, Xia Y, Gao J, Shen H, Cao M (2014)** Comparative transcriptome analysis of RNA-seq data for cold-tolerant and cold-sensitive rice genotypes under cold stress. *J Plant Biol* **57**: 337–348
- Shen J, Liu J, Yuan Y, Chen L, Ma J, Li X, Li J (2022)** The mechanism of abscisic acid regulation of wild *Fragaria* species in response to cold stress. *BMC Genomics* **23**: 670

- Sheth BP, Thaker VS** (2014) Plant systems biology: insights, advances and challenges. *Planta* **240**: 33–54
- Shi Y, Tian S, Hou L, Huang X, Zhang X, Guo H, Yang S** (2012) Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 2578–2595
- Siddiqui H, Sami F, Hayat S** (2020) Glucose: Sweet or bitter effects in plants-a review on current and future perspective. *Carbohydrate Research* **487**: 107884
- Silva-Neta IC, Pinho EV, Veiga AD, Pinho RG, Guimarães RM, Caixeta F, Santos HO, Marques TL** (2015) Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. *Genet Mol Res* **14**: 2674–2690
- Simon SA, Zhai J, Nandety RS, McCormick KP, Zeng J, Mejia D, Meyers BC** (2009) Short-read sequencing technologies for transcriptional analyses. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 305–333
- Simsek O, Donmez D, Kacar YA** (2017) RNA-Seq Analysis in Fruit Science: A Review. *Am J Plant Biol* **2**: 1–7
- Singh N, Rajendran A** (2016) Response of maize hybrids from heterotrophic to autotrophic phase of development in cold conditions. *ADVANCE RESEARCH JOURNAL OF CROP IMPROVEMENT* **7**: 240–244
- Singh P, Arif Y, Bajguz A, Hayat S** (2021) The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **166**: 10–19
- Smit AFA, Hubley R, Green P** (2013) RepeatMasker.
- Sobkowiak A, Jończyk M, Adamczyk J, Szczepanik J, Solecka D, Kuciara I, Hetmańczyk K, Trzcinska-Danielewicz J, Grzybowski M, Skoneczny M, et al** (2016) Molecular foundations of chilling-tolerance of modern maize. *BMC Genomics* **17**: 125
- Song JB, Gao S, Wang Y, Li BW, Zhang YL, Yang ZM** (2016) miR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Gene* **5**: 56–64
- Song JB, Huang SQ, Dalmay T, Yang ZM** (2012) Regulation of leaf morphology by microRNA394 and its target LEAF CURLING RESPONSIVENESS. *Plant Cell Physiol* **53**: 1283–1294
- Song X, Wang H, Wang Y, Zeng Q, Zheng X** (2024) Metabolomics combined with physiology and transcriptomics reveal how *Nicotiana tabacum* leaves respond to cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **208**: 108464
- Song Y, Feng J, Liu D, Long C** (2022) Different Phenylalanine Pathway Responses to Cold Stress Based on Metabolomics and Transcriptomics in Tartary Buckwheat Landraces. *J Agric Food Chem* **70**: 687–698
- de Sousa SM, Rosselli-Murai L, Kiyota E, Da Silva J, Souza GHMF, Peroni L, Stach-Machado D, Eberlin M, de Souza A, Koch K, et al** (2008) Structural and kinetic characterization of a maize aldose reductase. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale* **47**: 98–104
- Sowiński P, Fronk J, Jończyk M, Grzybowski M, Kowalec P, Sobkowiak A** (2020) Maize Response to Low Temperatures at the Gene Expression Level: A Critical Survey of Transcriptomic Studies. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2020.576941

- Sparrow-Muñoz I, Chen TC, Burgess SJ** (2023) Recent developments in the engineering of Rubisco activase for enhanced crop yield. *Biochem Soc Trans* **51**: 627–637
- Sprague SA** (2018) Ectopic expression of an Arabidopsis glutaredoxin increases thermotolerance in maize during reproductive developmental stages.
- Stanojević M, Trifković J, Akšić MF, Rakonjac V, Nikolić D, Šegan S, Milojković-Opšenica D** (2015) Sugar Profile of Kernels as a Marker of Origin and Ripening Time of Peach (*Prunus persicae* L.). *Plant Foods Hum Nutr* **70**: 433–440
- Steponkus PL** (1984) Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Biology* **35**: 543–584
- Stikić R, Jovanović Z** (2012) Fiziologija stresa biljaka, 1. izd. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd
- Stoop JMH, Williamson JD, Mason Pharr D** (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**: 139–144
- Storey JD** (2003) The positive false discovery rate: a Bayesian interpretation and the q-value. *The Annals of Statistics* **31**: 2013–2035
- Strigens A, Freitag NM, Gilbert X, Grieder C, Riedelsheimer C, Schrag TA, Messmer R, Melchinger AE** (2013) Association mapping for chilling tolerance in elite flint and dent maize inbred lines evaluated in growth chamber and field experiments. *Plant Cell Environ* **36**: 1871–1887
- Su XB, Saiardi A** (2024) The role of inositol in the environmental organic phosphate cycle. *Current Opinion in Biotechnology* **90**: 103196
- Sugimoto M, Sakamoto W** (1997) Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from Arabidopsis thaliana induced by oxidative stress. *Genes & Genetic Systems* **72**: 311–316
- Sun G** (2012) MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol Biol* **80**: 17–36
- Sun L, Yang M, Su W, Xu H, Xue F, Lu C, Wu R** (2023) Transcriptomic analysis of maize uncovers putative genes involved in metabolic detoxification under four safeners treatment. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **194**: 105465
- Sun Q, Liu X, Yang J, Liu W, Du Q, Wang H, Fu C, Li W-X** (2018) MicroRNA528 Affects Lodging Resistance of Maize by Regulating Lignin Biosynthesis under Nitrogen-Luxury Conditions. *Mol Plant* **11**: 806–814
- Sun X, Fan G, Su L, Wang W, Liang Z, Li S, Xin H** (2015) Identification of cold-inducible microRNAs in grapevine. *Front Plant Sci* **6**: 595
- Sun Y, He Y, Irfan AR, Liu X, Yu Q, Zhang Q, Yang D** (2020) Exogenous Brassinolide Enhances the Growth and Cold Resistance of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings under Chilling Stress. *Agronomy* **10**: 488
- Sundaram S, Rathinasabapathi B** (2010) Transgenic expression of fern *Pteris vittata* glutaredoxin PvGrx5 in Arabidopsis thaliana increases plant tolerance to high temperature stress and reduces oxidative damage to proteins. *Planta* **231**: 361–369
- Sunkar R, Zhu J-K** (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2001–2019

- Suzuki T, Morishita T, Kim S-J, Park S-U, Woo S, Noda T, Takigawa S** (2015) Physiological Roles of Rutin in the Buckwheat Plant. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* **49**: 37–43
- Tan J, Zhou Z, Niu Y, Sun X, Deng Z** (2017) Identification and Functional Characterization of Tomato CircRNAs Derived from Genes Involved in Fruit Pigment Accumulation. *Sci Rep* **7**: 8594
- Tang B, Hao Z, Zhu Y, Zhang H, Li G** (2018) Genome-wide identification and functional analysis of circRNAs in *Zea mays*. *PLOS ONE* **13**: e0202375
- Tang K, Zhao L, Ren Y, Yang S, Zhu J-K, Zhao C** (2020) The transcription factor ICE1 functions in cold stress response by binding to the promoters of CBF and COR genes. *J Integr Plant Biol* **62**: 258–263
- Tartaglio V, Rennie EA, Cahoon R, Wang G, Baidoo E, Mortimer JC, Cahoon EB, Scheller HV** (2017) Glycosylation of inositol phosphorylceramide sphingolipids is required for normal growth and reproduction in *Arabidopsis*. *Plant J* **89**: 278–290
- Teng L, Zhang X, Wang R, Lin K, Zeng M, Chen H, Cao F** (2023) miRNA transcriptome reveals key miRNAs and their targets contributing to the difference in Cd tolerance of two contrasting maize genotypes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **256**: 114881
- Teramoto N, Sachinvala ND, Shibata M** (2008) Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials. *Molecules* **13**: 1773–1816
- Thabet SG, Alomari DZ, Börner A, Brinch-Pedersen H, Alqudah AM** (2022) Elucidating the genetic architecture controlling antioxidant status and ionic balance in barley under salt stress. *Plant Mol Biol* **110**: 287–300
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815
- Thomashow MF** (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol* **125**: 89–93
- Thomashow MF** (1990) Molecular Genetics of Cold Acclimation in Higher Plants. *In* JG Scandalios, ed, *Advances in Genetics*. Academic Press, pp 99–131
- Thomashow MF** (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **50**: 571–599
- Tikkanen M, Aro E-M** (2014) Integrative regulatory network of plant thylakoid energy transduction. *Trends in Plant Science* **19**: 10–17
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL** (2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 20260–20264
- Tiwari B, Habermann K, Arif MA, Weil HL, Garcia-Molina A, Kleine T, Mühlhaus T, Frank W** (2020) Identification of small RNAs during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **20**: 298
- To JPC, Reiter W-D, Gibson SI** (2003) Chloroplast biogenesis by *Arabidopsis* seedlings is impaired in the presence of exogenous glucose. *Physiologia Plantarum* **118**: 456–463
- Tohge T, Fernie AR** (2016) Specialized Metabolites of the Flavonol Class Mediate Root Phototropism and Growth. *Molecular Plant* **9**: 1554–1555

- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L** (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* **28**: 511–515
- Uarrota VG, Stefen DLV, Leolato LS, Gindri DM, Nerling D** (2018) Revisiting Carotenoids and Their Role in Plant Stress Responses: From Biosynthesis to Plant Signaling Mechanisms During Stress. In DK Gupta, JM Palma, FJ Corpas, eds, *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp 207–232
- Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A, Kawamura Y** (2006) Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum* **126**: 81–89
- UNCCS** (2019) Climate action and support trends, United Nations Climate Change Secretariat. [https://unfccc.int/sites/default/files/resource/Climate\\_Action\\_Support\\_Trends\\_2019.pdf](https://unfccc.int/sites/default/files/resource/Climate_Action_Support_Trends_2019.pdf) Accessed 22 Mar 2025
- UNFCCC** (2008) Kyoto protocol reference manual on accounting of emissions and assigned amount. [https://unfccc.int/resource/docs/publications/08\\_unfccc\\_kp\\_ref\\_manual.pdf](https://unfccc.int/resource/docs/publications/08_unfccc_kp_ref_manual.pdf). Accessed 22 Mar 2025
- Urrutia M, Blein-Nicolas M, Prigent S, Bernillon S, Deborde C, Balliau T, Maucourt M, Jacob D, Ballias P, Bénard C, et al** (2021) Maize metabolome and proteome responses to controlled cold stress partly mimic early-sowing effects in the field and differ from those of Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **44**: 1504–1521
- Valluru R, Van den Ende W** (2011) *Myo*-inositol and beyond – Emerging networks under stress. *Plant Science* **181**: 387–400
- Varadharajan V, Rajendran R, Muthuramalingam P, Runthala A, Madhesh V, Swaminathan G, Murugan P, Srinivasan H, Park Y, Shin H, et al** (2025) Multi-Omics Approaches Against Abiotic and Biotic Stress—A Review. *Plants* **14**: 865
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME** (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* **23**: 48–55
- Varshney RK, Nayak SN, May GD, Jackson SA** (2009) Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* **27**: 522–530
- Vazquez-Hernandez M, Romero I, Escribano MI, Merodio C, Sanchez-Ballesta MT** (2017) Deciphering the Role of CBF/DREB Transcription Factors and Dehydrins in Maintaining the Quality of Table Grapes cv. Autumn Royal Treated with High CO<sub>2</sub> Levels and Stored at 0°C. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2017.01591
- Velitchkova M, Popova AV, Faik A, Gerganova M, Ivanov AG** (2020) Low temperature and high light dependent dynamic photoprotective strategies in Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* **170**: 93–108
- Venkateswarlu B, Shanker AK** (2009) Climate change and agriculture: Adaptation and mitigation strategies. *Indian Journal of Agronomy* **54**: 226–230
- Verma RK, Kumar VVS, Yadav SK, Kumar TS, Rao MV, Chinnusamy V** (2020) Overexpression of Arabidopsis ICE1 enhances yield and multiple abiotic stress tolerance in indica rice. *Plant Signal Behav* **15**: 1814547
- Vincent MM, Kullarnat T, Kriskamol NJ** (2019) Metabolite profiles of commercial colored Thai corn hybrids (*Zea mays* L.). *Agriculture and Natural Resources* **53**: 612–620

- Vítámvás P, Prášil IT, Kosová K, Planchon S, Renaut J** (2012) Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *PROTEOMICS* **12**: 68–85
- Vitlin Gruber A, Feiz L** (2018) Rubisco Assembly in the Chloroplast. *Front Mol Biosci*. doi: 10.3389/fmolb.2018,00024
- Waisi H, Janković B, Nikolić B, Dragičević V, Panić I, Tosti T, Trifković J** (2018) Influence of various concentrations of 24-epibrassinolide on the kinetic parameters during isothermal dehydration of two maize hybrids. *South African Journal of Botany* **119**: 69–79
- Waititu JK, Cai Q, Sun Y, Sun Y, Li C, Zhang C, Liu J, Wang H** (2021) Transcriptome Profiling of Maize (*Zea mays* L.) Leaves Reveals Key Cold-Responsive Genes, Transcription Factors, and Metabolic Pathways Regulating Cold Stress Tolerance at the Seedling Stage. *Genes* **12**: 1638
- Walsh JJ, Mangina E, Negrão S** (2024) Advancements in Imaging Sensors and AI for Plant Stress Detection: A Systematic Literature Review. *Plant Phenomics*. doi: 10.34133/plantphenomics.0153
- Wan F, Pan Y, Li J, Chen X, Pan Y, Wang Y, Tian S, Zhang X** (2014a) Heterologous expression of Arabidopsis C-repeat binding factor 3 (*AtCBF3*) and cold-regulated 15A (*AtCOR15A*) enhanced chilling tolerance in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep* **33**: 1951–1961
- Wan Y-Y, Zhang Y, Zhang L, Zhou Z-Q, Li X, Shi Q, Wang X-J, Bai J-G** (2014b) Caffeic acid protects cucumber against chilling stress by regulating antioxidant enzyme activity and proline and soluble sugar contents. *Acta Physiol Plant* **37**: 1706
- Wang C-T, Yang Q, Yang Y-M** (2011) Characterization of the *ZmDBP4* gene encoding a CRT/DRE-binding protein responsive to drought and cold stress in maize. *Acta Physiol Plant* **33**: 575–583
- Wang H, Cao F, Li G, Yu W, Aitken SN** (2014a) The transcript profiles of a putative early light-induced protein (*ELIP*) encoding gene in *Ginkgo biloba* L. under various stress conditions. *Acta Physiol Plant* **37**: 1720
- Wang H, Jia Y, Bai X, Wang J, Liu G, Wang H, Wu Y, Xin J, Ma H, Liu Z, et al** (2024a) Whole-transcriptome profiling and identification of cold tolerance-related ceRNA networks in japonica rice varieties. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2024.1260591
- Wang J, Ren Y, Liu X, Luo S, Zhang X, Liu X, Lin Q, Zhu S, Wan H, Yang Y, et al** (2021a) Transcriptional activation and phosphorylation of *OscNCGC9* confer enhanced chilling tolerance in rice. *Mol Plant* **14**: 315–329
- Wang J, Vanga SK, Saxena R, Orsat V, Raghavan V** (2018a) Effect of Climate Change on the Yield of Cereal Crops: A Review. *Climate* **6**: 41
- Wang J, Yu Y-C, Li Y, Chen L-Q** (2022) Hexose transporter *SWEET5* confers galactose sensitivity to Arabidopsis pollen germination via a galactokinase. *Plant Physiology* **189**: 388–401
- Wang K, Liu H, Mei Q, Yang J, Ma F, Mao K** (2023a) Characteristics of bHLH transcription factors and their roles in the abiotic stress responses of horticultural crops. *Scientia Horticulturae* **310**: 111710
- Wang L, Feng Z, Wang X, Wang X, Zhang X** (2010a) *DEGseq*: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* **26**: 136–138

- Wang L, Park HJ, Dasari S, Wang S, Kocher J-P, Li W** (2013a) CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Res* **41**: e74
- Wang L, Zhang P, Wang R, Wang P, Huang S** (2018b) Effects of variety and chemical regulators on cold tolerance during maize germination. *Journal of Integrative Agriculture* **17**: 2662–2669
- Wang M, Wang G, Ji J** (2010b) Suppression of the phytoene desaturase gene influence on the organization and function of photosystem II (PSII) and antioxidant enzyme activities in tobacco. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 460–466
- Wang PL, Bao Y, Yee M-C, Barrett SP, Hogan GJ, Olsen MN, Dinneny JR, Brown PO, Salzman J** (2014b) Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One* **9**: e90859
- Wang S, Sun X, Hoshino Y, Yu Y, Jia B, Sun Z, Sun M, Duan X, Zhu Y** (2014c) MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One* **9**: e91357
- Wang S, Wang X, Chen J** (2023b) Identification of miRNAs Involved in Maize-Induced Systemic Resistance Primed by *Trichoderma harzianum* T28 against *Cochliobolus heterostrophus*. *J Fungi (Basel)* **9**: 278
- Wang W, Chen Q, Hussain S, Mei J, Dong H, Peng S, Huang J, Cui K, Nie L** (2016a) Pre-sowing Seed Treatments in Direct-seeded Early Rice: Consequences for Emergence, Seedling Growth and Associated Metabolic Events under Chilling Stress. *Sci Rep* **6**: 19637
- Wang W, Wang X, Zhang J, Huang M, Cai J, Zhou Q, Dai T, Jiang D** (2020) Salicylic acid and cold priming induce late-spring freezing tolerance by maintaining cellular redox homeostasis and protecting photosynthetic apparatus in wheat. *Plant Growth Regul* **90**: 109–121
- Wang X, Fan H, Wang B, Yuan F** (2023c) Research progress on the roles of lncRNAs in plant development and stress responses. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2023.1138901
- Wang X, Li Z, Shi Y, Liu Z, Zhang X, Gong Z, Yang S** (2023d) Strigolactones promote plant freezing tolerance by releasing the WRKY41-mediated inhibition of CBF/DREB1 expression. *EMBO J* **42**: e112999
- Wang X, Shan X, Wu Y, Su S, Li S, Liu H, Han J, Xue C, Yuan Y** (2016c) iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals new metabolic pathways responding to chilling stress in maize seedlings. *Journal of Proteomics* **146**: 14–24
- Wang X, Wu D, Yang Q, Zeng J, Jin G, Chen Z-H, Zhang G, Dai F** (2016b) Identification of Mild Freezing Shock Response Pathways in Barley Based on Transcriptome Profiling. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00106
- Wang Y, Wen T, Hu J, Han R, Zhu Y, Guan Y, Zhu S** (2013b) Relationship between endogenous salicylic acid and antioxidant enzyme activities in maize seedlings under chilling stress. *Experimental Agriculture* **49**: 295–308
- Wang Y, Wu F, Zou R, Xu M, Shan H, Cheng B, Li X** (2024b) The maize sugar transporters *ZmSWEET15a* and *ZmSWEET15b* positively regulate salt tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **213**: 108845
- Wang Y, Zhao Y, Wang S, Liu J, Wang X, Han Y, Liu F** (2021b) Up-regulated 2-alkenal reductase expression improves low-nitrogen tolerance in maize by alleviating oxidative stress. *Plant Cell Environ* **44**: 559–573

- Wang Z, Gerstein M, Snyder M** (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57–63
- Wang Z, Li N, Yu Q, Wang H** (2021c) Genome-Wide Characterization of Salt-Responsive miRNAs, circRNAs and Associated ceRNA Networks in Tomatoes. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 12238
- Wang Z, Zhang L, Dong C, Guo J, Jin L, Wei P, Li F, Zhang X, Wang R** (2021d) Characterization and functional analysis of phytoene synthase gene family in tobacco. *BMC Plant Biol* **21**: 32
- Waseem M, Liu Y, Xia R** (2021) Long Non-Coding RNAs, the Dark Matter: An Emerging Regulatory Component in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 86
- Waterhouse AL** (2002) Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **6**: I1.1.1-I1.1.8
- WEF** (2020) Global risks report 2020, World Economic Forum. [http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_Global\\_Risk\\_Report\\_2020.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_Global_Risk_Report_2020.pdf) Accessed 23 Mar 2025
- Weiser CJ** (1970) Cold Resistance and Injury in Woody Plants. *Science* **169**: 1269–1278
- Wen M, Shen Y, Shi S, Tang T** (2012) miRevo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments. *BMC Bioinformatics* **13**: 140
- Wijewardana C, Hock M, Henry B, Reddy KR** (2015) Screening Corn Hybrids for Cold Tolerance using Morphological Traits for Early-Season Seeding. *Crop Science* **55**: 851–867
- Williams MW, Raese JT** (1974). Sorbitol in Tracheal Sap of Apple as Related to Temperature. *Physiologia Plantarum*, **30**(1): 49–52
- Winfield MO, Lu C, Wilson ID, Coghill JA, Edwards KJ** (2010) Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 749–771
- Wojtyła Ł, Lechowska K, Kubala S, Garnczarska M** (2016) Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00066
- Wostrikoff K, Clark A, Sato S, Clemente T, Stern D** (2012) Ectopic Expression of Rubisco Subunits in Maize Mesophyll Cells Does Not Overcome Barriers to Cell Type-Specific Accumulation. *Plant Physiology* **160**: 419–432
- Wright K** (2023) hopkins: Calculate Hopkins Statistic for Clustering.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang J-W, Weigel D, Poethig RS** (2009) The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell* **138**: 750–759
- Wu H-J, Ma Y-K, Chen T, Wang M, Wang X-J** (2012) PsRobot: a web-based plant small RNA meta-analysis toolbox. *Nucleic Acids Res* **40**: W22-28
- Wu J, Jiang Y, Liang Y, Chen L, Chen W, Cheng B** (2019) Expression of the maize MYB transcription factor ZmMYB3R enhances drought and salt stress tolerance in transgenic plants. *Plant Physiol Biochem* **137**: 179–188
- Wu J, Nadeem M, Galagedara L, Thomas R, Cheema M** (2022) Effects of Chilling Stress on Morphological, Physiological, and Biochemical Attributes of Silage Corn Genotypes during Seedling Establishment. *Plants* **11**: 1217

- Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, et al** (2021) clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation*. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100141
- Wu Y, Wang S, Du W, Ding Y, Li W, Chen Y, Zheng Z, Wang Y** (2023) Sugar transporter ZmSWEET1b is responsible for assimilate allocation and salt stress response in maize. *Funct Integr Genomics* **23**: 137
- Xia C, Liang G, Chong K, Xu Y** (2023) The COG1-OsSERL2 complex senses cold to trigger signaling network for chilling tolerance in japonica rice. *Nat Commun* **14**: 3104
- Xiang N, Zhang B, Hu J, Li K, Guo X** (2023) Modulation of carotenoid biosynthesis in maize (*Zea mays* L.) seedlings by exogenous abscisic acid and salicylic acid under low temperature. *Plant Cell Rep* **43**: 1
- Xiang Y, Bian X, Wei T, Yan J, Sun X, Han T, Dong B, Zhang G, Li J, Zhang A** (2021) ZmMPK5 phosphorylates ZmNAC49 to enhance oxidative stress tolerance in maize. *New Phytol* **232**: 2400–2417
- Xing J, Pan J, Yang W** (2025) Chloroplast protein translocation complexes and their regulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **67**: 912
- Xu H, Hassan MA, Sun D, Wu Z, Jiang G, Liu B, Ni Q, Yang W, Fang H, Li J, et al** (2022a) Effects of Low Temperature Stress on Source-Sink Organs in Wheat and Phosphorus Mitigation Strategies. *Front Plant Sci* **13**: 807844
- Xu H, Huang C, Jiang X, Zhu J, Gao X, Yu C** (2022b) Impact of Cold Stress on Leaf Structure, Photosynthesis, and Metabolites in *Camellia weiningensis* and *C. oleifera* Seedlings. *Horticulturae* **8**: 494
- Xu H, Twine TE, Girvetz E** (2016) Climate Change and Maize Yield in Iowa. *PLoS One* **11**: e0156083
- Xu J, Wang Q, Tang X, Feng X, Zhang X, Liu T, Wu F, Wang Q, Feng X, Tang Q, et al** (2024) Drought-induced circular RNAs in maize roots: Separating signal from noise. *Plant Physiology* **196**: 352–367
- Xu Y, Zou J, Zheng H, Xu M, Zong X, Wang L** (2019) RNA-Seq Transcriptome Analysis of Rice Primary Roots Reveals the Role of Flavonoids in Regulating the Rice Primary Root Growth. *Genes (Basel)* **10**: 213
- Xuan LIU, Hao-yang T, Li-xin T, Shi-yu ZUO, Lei SUN, Dan-yang QU, Li-jie LI, Shi WEI, Jing LI** (2018) Effects of Exogenous Trehalose on Growth and Physiological Characteristics of Maize Seedling Roots under Chilling Stress. *Chinese Journal of Agrometeorology* **39**: 538
- Xuhui L, Weiwei C, Siqi L, Junteng F, Hang Z, Xiangbo Z, Yongwen Q** (2022) Full-length transcriptome analysis of maize root tips reveals the molecular mechanism of cold stress during the seedling stage. *BMC Plant Biol* **22**: 398
- Yamaoka C, Suzuki Y, Makino A** (2016) Differential Expression of Genes of the Calvin–Benson Cycle and its Related Genes During Leaf Development in Rice. *Plant and Cell Physiology* **57**: 115–124
- Yan J, Zhao C, Zhou J, Yang Y, Wang P, Zhu X, Tang G, Bressan RA, Zhu J-K** (2016) The miR165/166 Mediated Regulatory Module Plays Critical Roles in ABA Homeostasis and Response in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **12**: e1006416

- Yan L, Zeng L, Raza A, Lv Y, Ding X, Cheng Y, Zou X** (2022a) Inositol Improves Cold Tolerance Through Inhibiting CBL1 and Increasing Ca<sup>2+</sup> Influx in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2022.775692
- Yan S, Bhawal R, Yin Z, Thannhauser TW, Zhang S** (2022b) Recent advances in proteomics and metabolomics in plants. *Mol Horticulture* **2**: 17
- Yan S, Liu Q, Li W, Yan J, Fernie AR** (2022c) Raffinose Family Oligosaccharides: Crucial Regulators of Plant Development and Stress Responses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **41**: 286–303
- Yan Z, Hou J, Leng B, Yao G, Ma C, Sun Y, Zhang F, Mu C, Liu X** (2024) Genome-Wide Investigation of the CRF Gene Family in Maize and Functional Analysis of ZmCRF9 in Response to Multiple Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **25**: 7650
- Yang G, Zou H, Wu Y, Liu H, Yuan Y** (2011) Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **106**: 127–141
- Yang J, Ariel F, Wang D** (2023a) Plant long non-coding RNAs: biologically relevant and mechanistically intriguing. *J Exp Bot* **74**: 2364–2373
- Yang L, Sun Q, Geng B, Shi J, Zhu H, Sun Y, Yang Q, Yang B, Guo Z** (2023b) Jasmonate biosynthesis enzyme allene oxide cyclase 2 mediates cold tolerance and pathogen resistance. *Plant Physiol* **193**: 1621–1634
- Yang X, Liu Y, Zhang H, Wang J, Zinta G, Xie S, Zhu W, Nie W-F** (2020) Genome-Wide Identification of Circular RNAs in Response to Low-Temperature Stress in Tomato Leaves. *Front Genet.* doi: 10.3389/fgene.2020.591806
- Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, Jin Y, Yang Y, Chen L-L, Wang Y, et al** (2017a) Extensive translation of circular RNAs driven by N<sup>6</sup>-methyladenosine. *Cell Res* **27**: 626–641
- Yang Y, Zhang X, Su Y, Zou J, Wang Z, Xu L, Que Y** (2017b) miRNA alteration is an important mechanism in sugarcane response to low-temperature environment. *BMC Genomics* **18**: 833
- Ye C-Y, Chen L, Liu C, Zhu Q-H, Fan L** (2015) Widespread noncoding circular RNAs in plants. *New Phytol* **208**: 88–95
- Ye K, Li H, Ding Y, Shi Y, Song C, Gong Z, Yang S** (2019) BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 Negatively Regulates the Stability of Transcription Factor ICE1 in Response to Cold Stress in Arabidopsis. *Plant Cell* **31**: 2682–2696
- Ye Q, Zheng L, Liu P, Liu Q, Ji T, Liu J, Gao Y, Liu L, Dong J, Wang T** (2024) The S-acylation cycle of transcription factor MtNAC80 influences cold stress responses in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **36**: 2629–2651
- Yee WS, Aziz SDA, Yusof ZNB** (2016) Osmotic stress upregulates the transcription of thiamine (vitamin B1) biosynthesis genes (THIC and THI4) in oil palm (*Elaeis guineensis*). *AJB* **15**: 1566–1574
- Yin H, Wang Z, Li H, Zhang Y, Yang M, Cui G, Zhang P** (2022) MsTH11 overexpression improves drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2022.992024

- Yin X, Kropff MJ, McLaren G, Visperas RM** (1995) A nonlinear model for crop development as a function of temperature. *Agricultural and Forest Meteorology* **77**: 1–16
- Yoon Y-E, Kuppusamy S, Cho KM, Kim PJ, Kwack Y-B, Lee YB** (2017) Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chem* **215**: 185–192
- You J, Chan Z** (2015) ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Front Plant Sci* **6**: 1092
- Yu A, Xie Y, Pan X, Zhang H, Cao P, Su X, Chang W, Li M** (2020) Photosynthetic Phosphoribulokinase Structures: Enzymatic Mechanisms and the Redox Regulation of the Calvin-Benson-Bassham Cycle[OPEN]. *The Plant Cell* **32**: 1556–1573
- Yu T, Zhang J, Cao J, Cai Q, Li X, Sun Y, Li S, Li Y, Hu G, Cao S, et al** (2021) Leaf transcriptomic response mediated by cold stress in two maize inbred lines with contrasting tolerance levels. *Genomics* **113**: 782–794
- Yu T, Zhang J, Cao J, Li X, Li S, Liu C, Wang L** (2022) Metabolic Insight into Cold Stress Response in Two Contrasting Maize Lines. *Life* **12**: 282
- Yu T, Zhang J, Ma X, Cao S, Li W, Yang G** (2024) A Multi-Omics View of Maize's (*Zea mays* L.) Response to Low Temperatures During the Seedling Stage. *Int J Mol Sci* **25**: 12273
- Yu Y, Ni Z, Wang Y, Wan H, Hu Z, Jiang Q, Sun X, Zhang H** (2019a) Overexpression of soybean *miR169c* confers increased drought stress sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **285**: 68–78
- Yu Y, Zhang Y, Chen X, Chen Y** (2019b) Plant Noncoding RNAs: Hidden Players in Development and Stress Responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **35**: 407–431
- Yuan J, Li J, Yang Y, Tan C, Zhu Y, Hu L, Qi Y, Lu ZJ** (2018) Stress-responsive regulation of long non-coding RNA polyadenylation in *Oryza sativa*. *Plant J* **93**: 814–827
- Yusof ZNB** (2019) Thiamine and Its Role in Protection Against Stress in Plants (Enhancement in Thiamine Content for Nutritional Quality Improvement). In PK Jaiwal, AK Chhillar, D Chaudhary, R Jaiwal, eds, *Nutritional Quality Improvement in Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp 177–186
- Zamboni A, Zanin L, Tomasi N, Pezzotti M, Pinton R, Varanini Z, Cesco S** (2012) Genome-wide microarray analysis of tomato roots showed defined responses to iron deficiency. *BMC Genomics* **13**: 101
- Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A** (2018) Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol Plant* **162**: 2–12
- Zeifman L, Hertog S, Kantorova V, Wilmoth JA** (2022) World of 8 Billion; Policy Brief No. 140; UN DESA: New York City, NY, USA.
- Zeng R, Li Z, Shi Y, Fu D, Yin P, Cheng J, Jiang C, Yang S** (2021) Natural variation in a type-A response regulator confers maize chilling tolerance. *Nat Commun* **12**: 4713
- Zhan F, Li B, Jiang M, Qin L, Wang J, He Y, Li Y** (2017) Effects of a root-colonized dark septate endophyte on the glutathione metabolism in maize plants under cadmium stress. *Journal of Plant Interactions* **12**: 421–428

- Zhang F, Yang J, Zhang N, Wu J, Si H** (2022) Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Front Plant Sci* **13**: 919243
- Zhang H, Jiang C, Ren J, Dong J, Shi X, Zhao X, Wang X, Wang J, Zhong C, Zhao S, et al** (2020a) An Advanced Lipid Metabolism System Revealed by Transcriptomic and Lipidomic Analyses Plays a Central Role in Peanut Cold Tolerance. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2020.01110
- Zhang H, Zhang J, Xu Q, Wang D, Di H, Huang J, Yang X, Wang Z, Zhang L, Dong L, et al** (2020b) Identification of candidate tolerance genes to low-temperature during maize germination by GWAS and RNA-seq approaches. *BMC Plant Biology* **20**: 333
- Zhang J, Klueva NY, Wang Z, Wu R, Ho T-HD, Nguyen HT** (2000) Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro CellDevBiol-Plant* **36**: 108–114
- Zhang J, Luo W, Zhao Y, Xu Y, Song S, Chong K** (2016a) Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice. *New Phytologist* **211**: 1295–1310
- Zhang J, Peer WA** (2017) Auxin homeostasis: the DAO of catabolism. *Journal of Experimental Botany* **68**: 3145–3154
- Zhang L, Yu Y, Yu R** (2020c) Analysis of metabolites and metabolic pathways in three maize (*Zea mays* L.) varieties from the same origin using GC–MS. *Sci Rep* **10**: 17990
- Zhang P, Fan Y, Sun X, Chen L, Terzaghi W, Bucher E, Li L, Dai M** (2019a) A large-scale circular RNA profiling reveals universal molecular mechanisms responsive to drought stress in maize and *Arabidopsis*. *Plant J* **98**: 697–713
- Zhang Q, Song X, Bartels D** (2018) Sugar metabolism in the desiccation tolerant grass *Oropetium thomaeum* in response to environmental stresses. *Plant Science* **270**: 30–36
- Zhang Q, Zhai J, Shao L, Lin W, Peng C** (2019b) Accumulation of Anthocyanins: An Adaptation Strategy of *Mikania micrantha* to Low Temperature in Winter. *Front Plant Sci* **10**: 1049
- Zhang W, Chang J, Lei Z, Huhman D, Sumner LW, Zhao PX** (2014) MET-COFEA: a liquid chromatography/mass spectrometry data processing platform for metabolite compound feature extraction and annotation. *Anal Chem* **86**: 6245–6253
- Zhang W, Wang S, Yu F, Tang J, Shan X, Bao K, Yu L, Wang H, Fei Z, Li J** (2019c) Genome-wide characterization and expression profiling of SWEET genes in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) reveal their roles in chilling and clubroot disease responses. *BMC Genomics* **20**: 93
- Zhang X, Ibrahim Z, Khaskheli MB, Raza H, Zhou F, Shamsi IH** (2024a) Integrative Approaches to Abiotic Stress Management in Crops: Combining Bioinformatics Educational Tools and Artificial Intelligence Applications. *Sustainability* **16**: 7651
- Zhang X, Zhang L, Sun Y, Zheng S, Wang J, Zhang T** (2020d) Hydrogen peroxide is involved in strigolactone induced low temperature stress tolerance in rape seedlings (*Brassica rapa* L.). *Plant Physiol Biochem* **157**: 402–415
- Zhang X-O, Dong R, Zhang Y, Zhang J-L, Luo Z, Zhang J, Chen L-L, Yang L** (2016b) Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res* **26**: 1277–1287

- Zhang Y, Lu Y, Guan H, Yang J, Zhang C, Yu S, Li Y, Guo W, Yu L (2024b)** A Phenotypic Extraction and Deep Learning-Based Method for Grading the Seedling Quality of Maize in a Cold Region. *Agronomy* **14**: 674
- Zhang Y, Xu J, Li R, Ge Y, Li Y, Li R (2023)** Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 10915
- Zhang Y, Zhou Y, Sun Q, Deng D, Liu H, Chen S, Yin Z (2019e)** Genetic determinants controlling maize rubisco activase gene expression and a comparison with rice counterparts. *BMC Plant Biol* **19**: 351
- Zhao C, Liu B, Piao S, Wang X, Lobell DB, Huang Y, Huang M, Yao Y, Bassu S, Ciaï P, et al (2017)** Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 9326–9331
- Zhao J, He Q, Chen G, Wang L, Jin B (2016)** Regulation of Non-coding RNAs in Heat Stress Responses of Plants. *Front Plant Sci* **7**: 1213
- Zhao J, Shi M, Yu J, Guo C (2022a)** SPL9 mediates freezing tolerance by directly regulating the expression of CBF2 in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **22**: 59
- Zhao J, Zhang S, Yang T, Zeng Z, Huang Z, Liu Q, Wang X, Leach J, Leung H, Liu B (2015)** Global transcriptional profiling of a cold-tolerant rice variety under moderate cold stress reveals different cold stress response mechanisms. *Physiologia Plantarum* **154**: 381–394
- Zhao S, Gao H, Luo J, Wang H, Dong Q, Wang Y, Yang K, Mao K, Ma F (2020)** Genome-wide analysis of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding gene family in apple (*Malus domestica*) and functional characterization of *MdLhcb4.3*, which confers tolerance to drought and osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **154**: 517–529
- Zhao W, Jung S, Schubert S (2019)** Transcription profile analysis identifies marker genes to distinguish salt shock and salt stress after stepwise acclimation in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry* **143**: 232–245
- Zhao X, Zhao C, Niu Y, Chao W, He W, Wang Y, Mao T, Bai X (2022b)** Understanding and Comprehensive Evaluation of Cold Resistance in the Seedlings of Multiple Maize Genotypes. *Plants* **11**: 1881
- Zheng L, Wu W, Chen Q, Zhang G, Gao F, Zhou Y (2022)** Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics identified biological processes and metabolic pathways involved in heat stress response in jojoba. *Industrial Crops and Products* **183**: 114946
- Zhou H, Su M, Du J, Zhang X, Li X, Zhang M, Hu Y, Huan C, Ye Z (2023a)** Crucial roles of sorbitol metabolism and energy status in the chilling tolerance of yellow peach. *Plant Physiology and Biochemistry* **204**: 108092
- Zhou J, Li C-L, Gao F, Luo X-P, Li Q-Q, Zhao H-X, Yao H-P, Chen H, Wang A-H, Wu Q (2016)** Characterization of Three Glucosyltransferase Genes in Tartary Buckwheat and Their Expression after Cold Stress. *J Agric Food Chem* **64**: 6930–6938
- Zhou M, Tang W (2019)** MicroRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells. *Mol Genet Genomics* **294**: 379–393
- Zhou P, Enders TA, Myers ZA, Magnusson E, Crisp PA, Noshay JM, Gomez-Cano F, Liang Z, Grotewold E, Greenham K, et al (2022a)** Prediction of conserved and variable heat and cold stress response in maize using cis-regulatory information. *Plant Cell* **34**: 514–534

- Zhou R, Sanz-Jimenez P, Zhu X-T, Feng J-W, Shao L, Song J-M, Chen L-L** (2021) Analysis of Rice Transcriptome Reveals the LncRNA/CircRNA Regulation in Tissue Development. *Rice* **14**: 14
- Zhou X, Muhammad I, Lan H, Xia C** (2022b) Recent Advances in the Analysis of Cold Tolerance in Maize. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2022.866034
- Zhou Y, Zhang H, Zhang S, Zhang J, Di H, Zhang L, Dong L, Lu Q, Zeng X, Liu X, et al** (2023b) The G protein-coupled receptor COL1 promotes chilling tolerance in maize during germination. *Int J Biol Macromol* **253**: 126877
- Zhou Z, Cao Y, Li T, Wang X, Chen J, He H, Yao W, Wu J, Zhang H** (2020) MicroRNAs are Involved in Maize Immunity Against *Fusarium Verticillioides* Ear Rot. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **18**: 241–255
- Zhu G, Liu Z, Qiao S, Zhang Z, Huang Q, Su Z, Yang X** (2022) How could observed sowing dates contribute to maize potential yield under climate change in Northeast China based on APSIM model. *European Journal of Agronomy* **136**: 126511
- Zhu H, Zhang TJ, Zheng J, Huang XD, Yu ZC, Peng CL, Chow WS** (2018a) Anthocyanins function as a light attenuator to compensate for insufficient photoprotection mediated by nonphotochemical quenching in young leaves of *Acmena acuminatissima* in winter. *Photosynthetica* **56**: 445–454
- Zhu P, Jin Z, Zhuang Q, Ciais P, Bernacchi C, Wang X, Makowski D, Lobell D** (2018b) The important but weakening maize yield benefit of grain filling prolongation in the US Midwest. *Glob Chang Biol* **24**: 4718–4730
- Zhuo C, Cai J, Guo Z** (2013) Overexpression of Early Light-Induced Protein (ELIP) Gene from *Medicago sativa* ssp. *falcata* Increases Tolerance to Abiotic Stresses. *Agronomy Journal* **105**: 1433–1440



## Prilozi:

### 1. Parametri glavnih komponenti PC

Analiza glavnih komponenti (PCA) je urađena korišćenjem dobijenih FPKM vrednosti. U tabeli su prikazane Eigen-vrednosti, koordinate (*coord*),  $\cos^2$  vrednosti PC (*cos2*) i individualni doprinosi svake PC (*contrib*), za svaki uzorak (L<sub>S</sub>-C-6, L<sub>S</sub>-C-24, L<sub>S</sub>-T-6, L<sub>S</sub>-T-24, L<sub>T</sub>-C-6, L<sub>T</sub>-C-24, L<sub>T</sub>-T-6, i L<sub>T</sub>-T-24).

Glavna komponenta, PC	Eigen-vrednost				
PC1	8640,503				
PC2	6492,192				
PC3	3683,165				
PC4	2488,997				
PC5	1849,371				
PC6	1587,486				
PC7	1350,286				
Uzorak	PC koordinate, <i>coord</i>				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
L <sub>S</sub> -C-6	-116,852	101,9732	-43,6116	22,99577	-50,3575
L <sub>S</sub> -C-24	-69,8564	-58,3195	26,52113	-78,8412	-14,0319
L <sub>S</sub> -T-6	-80,1267	28,62944	108,7301	19,14608	-6,46344
L <sub>S</sub> -T-24	-98,0071	-107,413	-57,6082	38,15291	67,94343
L <sub>T</sub> -C-6	65,20827	113,5525	-78,7803	-15,9937	24,72788
L <sub>T</sub> -C-24	84,19998	-45,2578	-16,0434	-76,0516	-14,615
L <sub>T</sub> -T-6	104,8387	55,1402	71,67232	20,78123	53,63942
L <sub>T</sub> -T-24	110,5948	-88,3056	-10,8801	69,81055	-60,8428
Uzorak	PC $\cos^2$ vrednosti				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
L <sub>S</sub> -C-6	0,43285	0,32964	0,060294	0,016763	0,080389
L <sub>S</sub> -C-24	0,242932	0,169317	0,035015	0,309441	0,009802
L <sub>S</sub> -T-6	0,276897	0,03535	0,509874	0,01581	0,001802
L <sub>S</sub> -T-24	0,312535	0,375399	0,107982	0,047363	0,150203
L <sub>T</sub> -C-6	0,152794	0,463335	0,223017	0,009192	0,021972
L <sub>T</sub> -C-24	0,343982	0,09938	0,012488	0,280626	0,010364
L <sub>T</sub> -T-6	0,432733	0,119705	0,202246	0,017003	0,113278
L <sub>T</sub> -T-24	0,416822	0,26574	0,004034	0,166082	0,126154
Uzorak	Individualni doprinosi svake PC, <i>contrib</i>				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
L <sub>S</sub> -C-6	19,75334	20,02124	6,454935	2,655715	17,14016
L <sub>S</sub> -C-24	7,059651	6,548572	2,387112	31,21708	1,330819
L <sub>S</sub> -T-6	9,288079	1,578135	40,12257	1,840963	0,282367
L <sub>S</sub> -T-24	13,89587	22,21408	11,2631	7,310397	31,20189
L <sub>T</sub> -C-6	6,151434	24,8263	21,06321	1,284647	4,132947
L <sub>T</sub> -C-24	10,2564	3,943709	0,873533	29,04708	1,443728
L <sub>T</sub> -T-6	15,90063	5,854034	17,43379	2,168843	19,44707
L <sub>T</sub> -T-24	17,6946	15,01394	0,40175	24,47528	25,02101

## 2. Analiza genske ontologije

Analiza genske ontologije (GO) je urađena primenom analize prezastupljenosti (ORA) u clusterProfiler R-paketu. GO analiza je podrazumevala obogaćivanje u tri oblasti: biološki proces (eng. *biological process*, BP), molekularna funkcija (eng. *molecular function*, MF) i ćelijska komponenta (eng. *cellular component*, CC). Svaka kategorija je označena specifičnim identifikacionim terminom (GO ID) i nazivom (Opis). Odnos broja DE gena i ukupnog broja gena koji pripadaju toj kategoriji (OG), GO identifikaciona oznaka za svaki od tih gena (GO genski ID) i p-vrednosti su takođe prikazani na tabeli.

GO - Biološki proces, BP				
GO ID	Opis	OG	P-vrednost	GO genski ID
GO:0009628	Odgovor na abiotički stimulus	16/72	1,87E <sup>-08</sup>	LOC100280131/LOC100274071/LOC100192612/LOC103640631/LOC100501175/LOC542716/LOC542723/LOC100272803/LOC542320/LOC103630699/LOC100282512/LOC542714/LOC100274453/LOC103638672/LOC100283766/LOC100196928
GO:0015979	Fotosinteza	9/72	5,62E <sup>-07</sup>	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100277775/LOC100282845/LOC103633249/LOC100282512/LOC100285398/LOC100274453
GO:0009266	Odgovor na temperaturni stimulus	9/72	8,30E <sup>-07</sup>	LOC100280131/LOC100274071/LOC100192612/LOC100501175/LOC542723/LOC542714/LOC103638672/LOC100283766/LOC100196928
GO:0009765	Fotosinteza, prikupljanje svetlosti	5/72	8,60E <sup>-07</sup>	LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100285398/LOC100274453
GO:0048511	Ritmični proces	5/72	2,29E <sup>-06</sup>	LOC100274071/LOC100192612/LOC100501175/LOC100273598/LOC100381542
GO:0009768	Fotosinteza, prikupljanje svetlosti, fotosistem I	4/72	8,85E <sup>-06</sup>	LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0007623	Cirkadijalni ritam	4/72	4,51E <sup>-05</sup>	LOC100274071/LOC100192612/LOC100501175/LOC100381542
GO:0019684	Fotosinteza, svetlosne reakcije	5/72	4,52E <sup>-05</sup>	LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100285398/LOC100274453
GO:0042752	Regulacija cirkadijalnog ritma	3/72	0,0002	LOC100274071/LOC100192612/LOC100501175
GO:0006091	Sinteza prekursornih metabolita i generacija energije	8/72	0,0002	LOC542716/LOC542320/LOC100272845/LOC103633249/LOC100282512/LOC100285398/LOC100274453/LOC100278780
GO:0009408	Odgovor na visoku temperaturu	5/72	0,0002	LOC100280131/LOC542723/LOC103638672/LOC100283766/LOC100196928
GO:0009416	Odgovor na svetlosni stimulus	6/72	0,0009	LOC542716/LOC100272803/LOC542320/LOC103630699/LOC100282512/LOC100274453

GO:0009314	Odgovor na radijaciju	6/72	0,00105	LOC542716/LOC100272803/LOC542320/LOC103630699/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009409	Odgovor na niske temperature	4/72	0,00125	LOC100274071/LOC100192612/LOC100501175/LOC542714
GO:0006457	Proteinsko savijanje	6/72	0,00168	LOC103646716/LOC542723/LOC100279586/LOC100277775/LOC100283766/LOC100196928
GO:0006979	Odgovor na oksidativni stres	6/72	0,00276	LOC100192603/LOC542723/LOC100191769/LOC100283766/LOC100278780/LOC100191153

### GO - Molekularna funkcija, MF

GO ID	Opis	OG	P-vrednost	GO genski ID
GO:0046906	Vezivanje tetrapirola	12/79	6,85E <sup>-07</sup>	LOC100192603/LOC103635519/LOC100281181/LOC542716/LOC542320/LOC100191769/LOC100274473/LOC100284998/LOC100279973/LOC100282512/LOC100274453/LOC100191153
GO:0016168	Vezivanje hlorofila	4/79	9,89E <sup>-06</sup>	LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0016705	Oksidoreduktazna aktivnost, sa delovanjem na uparene donore, sa inkorporacijom ili redukcijom molekularnog kiseonika	9/79	3,68E <sup>-05</sup>	LOC103635519/LOC100281181/LOC100274473/LOC100284998/LOC103627438/LOC100279973/LOC100382364/LOC103633147/LOC100283644
GO:0020037	Vezivanje za hem	8/79	0,0005	LOC100192603/LOC103635519/LOC100281181/LOC100191769/LOC100274473/LOC100284998/LOC100279973/LOC100191153
GO:0004497	Monooksigenazna aktivnost	6/79	0,00223	LOC103635519/LOC100281181/LOC100274473/LOC100284998/LOC100279973/LOC103633147
GO:0016706	Dioksigenazna aktivnost, zavisna od 2-oksoglutarata	3/79	0,00234	LOC103627438/LOC100382364/LOC100283644

### GO - Ćelijska komponenta (CC)

GO ID	Opis	OG	P-vrednost	GO genski ID
GO:0009507	Hloroplast	9/59	0,006355	LOC100285458/LOC542716/LOC541712/LOC542320/LOC100277775/LOC100282512/LOC542714/LOC100274453/LOC542686

GO:0005576	Esktracelularni region	7/59	0,004313	LOC541908/LOC100194192/LOC100192603/LOC100191769/LOC100191153/LOC542059/LOC103641262
GO:0042170	Plastidna membrana	5/59	0,003271	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009579	Tilakoid	6/59	0,00202	LOC103646716/LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009532	Plastidna stroma	4/59	0,002003	LOC541712/LOC100277775/LOC542714/LOC542686
GO:0009570	Stroma hloroplasta	4/59	0,001708	LOC541712/LOC100277775/LOC542714/LOC542686
GO:0031968	Organelna spoljašnja membrana	5/59	0,001541	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0019867	Plastidna spoljašnja membrana	5/59	0,001541	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009526	Hloroplastni membranski sistem	6/59	0,001121	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC542714/LOC100274453
GO:0034357	Fotosintetska membrana	5/59	0,000517	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0042651	Tilakoidna membrana	5/59	0,000295	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0031976	Plastidni tilakoidi	5/59	0,000246	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009534	Hloroplastni tilakoidi	5/59	0,000246	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009523	Fotosistem II	4/59	0,000118	LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0055035	Plastidna tilakoidna membrana	5/59	0,000107	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009535	Tilakoidna membrana hloroplasta	5/59	0,000107	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453

GO:0009521	Fotosistem	5/59	1,65E <sup>-05</sup>	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453
GO:0009522	Fotosistem I	5/59	1,01E <sup>-06</sup>	LOC100285458/LOC542716/LOC542320/LOC100282512/LOC100274453

### 3. KEGG analiza

KEGG analiza (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG) je urađena primenom analize prezastupljenosti (ORA) u clusterProfiler R-paketu. KEGG biološki putevi su prikazani u tabeli, koja sadrži KEGG kategorije i podkategorije, kao i detaljan opis svake. Takođe su navedeni i odnos broja DE gena i ukupnog broja gena koji pripadaju toj kategoriji (OG), kao i KEGG identifikaciona oznaka za svaki od tih gena (KEGG genski ID), i p-vrednost.

Kategorija	Podkategorija	Opis	OG	p-vrednost	KEGG genski ID
Metabolizam	Energetski metabolizam	Fotosinteza - antena proteini	4/37	1,463 E <sup>-05</sup>	542716/542320/100282512/100274453
Organizamski sistemi	Adaptacija na životnu sredinu	Cirkadijalni ritam	4/37	0,00045	100383277/100272803/100281091/100273598
Metabolizam	Energetski metabolizam	Fiksacija CO <sub>2</sub> u fotosintetskim organizmima	3/37	0,012658	100282017/100272845/100282845
Metabolizam	Biosinteza sekundarnih metabolita	Biosinteza flavonoida	2/37	0,013686	100286107/100284998
Metabolizam	Biosinteza sekundarnih metabolita	Biosinteza fenilpropanoida	4/37	0,019019	100192603/100191769/100284998/100191153

### 4. Identifikovani *trans*-ciljni geni diferencijalno eksprimiranih dugih nekodirajućih, lncRNK

	lncRNK	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost	Gen	log <sub>2</sub> FC	q-vrednost
Ls, 6h	XLOC_002167	7,1917	0,00500	Zm00001eb301270	3,2412	0,00273
	XLOC_006091	7,5432	0,00149	Zm00001eb301270	3,2412	0,00273
Ls, 24h	XLOC_016213	-7,2320	0,00181	Zm00001eb207670	4,5433	0,00002
				Zm00001eb342740	3,2123	0,00099
				Zm00001eb402150	-3,2547	0,00204
	XLOC_012259	-2,2612	0,00181	Zm00001eb013070	3,2679	0,00128
				Zm00001eb035600	-4,4170	0,00017
				Zm00001eb051810	-2,7479	0,00484
				Zm00001eb156200	3,3882	0,00833
				Zm00001eb201180	-2,8728	0,00253
				Zm00001eb215270	3,7986	0,00038
	XLOC_007807	1,8664	0,00489	Zm00001eb051810	-2,7479	0,00484
				Zm00001eb429420	-3,7311	0,00338
	XLOC_011468	1,9250	0,00161	Zm00001eb013070	3,2679	0,00128
				Zm00001eb156200	3,3882	0,00833
	XLOC_012388	2,2976	0,00022	Zm00001eb056110	-8,4879	0,00022
Zm00001eb238440				-7,8754	0,00288	

				Zm00001eb384740	-5,0956	0,00000
				Zm00001eb147750	-4,5197	0,00001
				Zm00001eb035600	-4,4170	0,00017
				Zm00001eb313920	-3,9480	0,00080
				Zm00001eb167700	-3,8506	0,00080
				Zm00001eb406490	-3,6329	0,00010
				Zm00001eb121050	-3,3364	0,00526
				Zm00001eb106430	-3,2862	0,00038
				Zm00001eb402150	-3,2547	0,00204
				Zm00001eb277660	-3,2426	0,00122
				Zm00001eb069320	-3,1354	0,00122
				Zm00001eb113210	-3,1093	0,00984
				Zm00001eb182560	-3,0827	0,00517
				Zm00001eb039750	-3,0757	0,00594
				Zm00001eb010530	-2,8960	0,00612
				Zm00001eb201180	-2,8728	0,00253
				Zm00001eb388760	-2,7945	0,00770
				Zm00001eb051810	-2,7479	0,00484
				Zm00001eb135130	2,7864	0,00745
				Zm00001eb360290	2,8985	0,00243
				Zm00001eb342740	3,2123	0,00099
				Zm00001eb289910	3,2301	0,00975
				Zm00001eb013070	3,2679	0,00128
				Zm00001eb423940	3,2853	0,00212
				Zm00001eb068470	3,2863	0,00062
				Zm00001eb156200	3,3882	0,00833
				Zm00001eb043810	3,5827	0,00102
				Zm00001eb081100	3,6174	0,00484
				Zm00001eb215270	3,7986	0,00038
				Zm00001eb207670	4,5433	0,00002
				Zm00001eb188750	9,2755	0,00001
	XLOC_015129	3,0826	0,00044	Zm00001eb215270	3,7986	0,00038
	XLOC_006714	4,6801	0,00000	Zm00001eb201180	-2,8728	0,00253
<b>Lt, 6h</b>	XLOC_016783	2,6020	0,00006	Zm00001eb301270	3,7815	0,00017
<b>Lt, 24h</b>	XLOC_016633	-7,2410	0,00252	Zm00001eb293270	-5,9889	0,00003
	XLOC_009752	2,5566	0,00008	Zm00001eb069040	-2,7978	0,00673
	XLOC_015129	2,8761	0,00029	Zm00001eb069040	-2,7978	0,00673
	XLOC_005947	7,3671	0,00252	Zm00001eb068470	4,1618	0,00003
				Zm00001eb069040	-2,7978	0,00673
				Zm00001eb254440	-2,8712	0,00735
				Zm00001eb293270	-5,9889	0,00003
				Zm00001eb402150	-3,7580	0,00021
	XLOC_009553	8,3628	0,00001	Zm00001eb068470	4,1618	0,00003
Zm00001eb069040				-2,7978	0,00673	

**Prilog 5. Temperature hibridizacije,  $T_H$ , prajmera za svaki od gena i ncRNK odabranih za validaciju rezultata sekvenciranja.**

Tip	Gen, odnosno ncRNK, koji se umnožava	Temperatura hibridizacije, $T_H$
Diferencijalno eksprimirani geni	<i>ado3</i>	56 °C
	<i>thi1</i>	55 °C
	<i>aed1</i>	55 °C
	<i>nat4</i>	56 °C
	<i>pds</i>	55 °C
	<i>rca</i>	55 °C
Diferencijalno eksprimirane lncRNK	<i>XLOC_012565</i>	57 °C
	<i>XLOC_000175</i>	57 °C
	<i>XLOC_001043</i>	57 °C
	<i>XLOC_006714</i>	60 °C
	<i>XLOC_016783</i>	59 °C
Diferencijalno eksprimirane miRNK	<i>zma-miR11970-3p</i>	52°C
	<i>zma-miR159c-5p</i>	52°C
	<i>zma-miR166a-5p</i>	52°C
	<i>zma-miR396c</i>	52°C
	<i>novel_904</i>	51°C

**Prilog 6. Efikasnost amplifikacije odabranih gena i ncRNK.**

U tabeli su prikazane vrednosti nagiba krive (m) i vrednosti koeficijenta efikasnosti (E) izračunate na osnovu m, za svaki gen, odnosno ncRNK, koji se umnožava.

Tip	Gen, odnosno ncRNK, koji se umnožava	m	E
Diferencijalno eksprimirani geni	<i>ado3</i>	-3,2710	2,0217
	<i>thi1</i>	-3,3953	1,9702
	<i>aed1</i>	-3,3353	1,9944
	<i>nat4</i>	-3,5982	1,8963
	<i>pds</i>	-3,6114	1,8919
	<i>rca</i>	-3,4602	1,9453
Diferencijalno eksprimirane lncRNK	<i>XLOC_012565</i>	-3,0486	2,1282
	<i>XLOC_000175</i>	-3,6569	1,8769
	<i>XLOC_001043</i>	-3,4633	1,9442
	<i>XLOC_006714</i>	-3,5219	1,9228
	<i>XLOC_016783</i>	-3,7212	1,8566
Diferencijalno eksprimirane miRNK	<i>zma-miR11970-3p</i>	-2,7066	2,3414
	<i>zma-miR159c-5p</i>	-2,5424	2,4736
	<i>zma-miR166a-5p</i>	-2,7825	2,2876
	<i>zma-miR396c</i>	-2,8275	2,2577
	<i>novel_904</i>	-2,6209	2,4074

## Biografija autora

Manja (Zoran) Božić je rođena 22.02.1995. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu „Kralj Petar I“ i Prvu beogradsku gimnaziju, sa odličnim uspehom. Osnovne akademske studije je upisala 2013. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Biologija, i osnovne akademske studije je završila 31. avgusta 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,59. U oktobru iste godine je upisala master akademske studije, takođe na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Fiziologija i biotehnologija biljaka. Master akademske studije je završila 26.07.2018. sa prosečnom ocenom 10,0, nakon odbrane master rada pod nazivom „Procena genetičke raznovrsnosti vrste *Nepeta rtanjensis*, Diklić & Milojević upotrebom RAPD molekularnih markera“. Doktorske akademske studije je upisala u oktobru 2018. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Od 06.03.2019. godine je zaposlena na Institutu za kukuruz “Zemun Polje” za rad na projektu „Genetički resursi kukuruza kao izvor poboljšanog kvaliteta zrna i tolerantnosti prema suši“ (ev. br. TR31028) kao istraživač pripravnik. Zvanje istraživača saradnika stekla je u novembru 2021. godine. Manja Božić je u maju 2023. godine postala stipendista Državnog sekretarijata SAD (*US State Department*) u okviru programa „*Fulbright Non-degree Visiting Researcher Program for Doctoral Students*“ i u periodu od avgusta 2023. do februara 2024. godine bila gostujući istraživač na *University of Georgia - Institute of Plant Breeding, Genetics, and Genomics*. Autor je ili koautor šest naučnih radova u međunarodnim vodećim časopisima iz M20 kategorije (jedan M21a, četiri M21, jedan M22) i 22 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja, štampana u celini ili izvodu.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Božić Manja**

Broj indeksa: **B3001/2018**

Izjavljujem da je doktorska disertacija pod naslovom **Promene na nivou transkriptoma u ranim fazama razvića kukuruza (*Zea mays* L.) izazvane stresom niskim temperaturama**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Božić Manja**

Broj indeksa: **B3001/2018**

Studijski program: **Biologija**

Naslov rada: **Promene na nivou transkriptoma u ranim fazama razvića kukuruza (*Zea mays* L.) izazvane stresom niskim temperaturama**

Mentori: **dr Aneta Sabovljević, dr Ana Nikolić**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Promene na nivou transkriptoma u ranim fazama razvića kukuruza (*Zea mays* L.) izazvane stresom niskim temperaturama**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

**4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**1. Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

**2. Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

**3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

**4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

**5. Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

**6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.