NAKUPLJANJE FRUKTURA U INTERNODIJIMA TIJEKOM RAZVOJA JEČMA (HOREDEUM VULGARE L.)

Lončarić, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:204662

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Paula Lončarić

Nakupljanje fruktana u internodijima tijekom razvoja ječma (*Hordeum vulgare* L.)

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. I. Štolfa

Osijek, 2015. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Završni rad
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Nakupljanje fruktana u internodijima tijekom razvoja ječma (*Hordeum vulgare* L.)

Paula Lončarić

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka i Laboratoriju za molekularnu ekologiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa

Neposredni voditelj: dr. sc. Lidija Begović

Kratak sažetak završnog rada:

Fruktani predstavljaju lako mobilizirajuće zalihe ugljikohidrata u biljci. Stabljika ječma zbog svoje morfološke građe pohranjuje znatnu količinu fruktana koji se mobiliziraju iz stabljike u zrno poslije cvatnje što značajno utječe na ukupni prinos zrna. U ovome radu istraživani su sadržaj fruktana i aktivnost gena uključenih u sintezu i remobilizaciju fruktana u stabljici jarog ječma (*Hordeum vulgare* L.) sorte Astor tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja i nalijevanje zrna. Izmjeren je sadržaj fruktana i semikvatitatvno je izmjerena ekspresija gena saharoza: saharoza 1-fruktoziltransferaza (*1-SST*), saharoza: fruktan-6 fruktozil-transferaza (*6-SFT*) i fruktan-1-egzohidrolaza (*1-FEH*). Najveći sadržaj fruktana izmjeren je u fazi nalijevanja zrna, a najmanji u fazi zriobe. Ekspresija gena *1-SST* konstanta na je tijekom razvoja, za razliku od gena 6-SFT koji ima najveću ekspresiju tijekom cvatnje. Ekspresija gena *1-FEH* povećava se u fazi klasanja što ukazuje na početak mobilizacije fruktana iz stabljike u zrno.

Broj stranica: 18
Broj slika: 2
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 23
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fruktan, ječam, saharoza: saharoza-1-fruktoziltransferaza (1-SST), saharoza: fruktan-6 fruktozil-transferaza (6-SFT), fruktan-1-egzohidrolaza (1-FEH)

Rad je pohranjen u:
knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Biology
Bachelor's thesis
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

Fructan accumulation in the internodes during barley

(*Hordeum vulgare* L.) development

Paula Lončarić

Thesis performed at: Plant Molecular and Cellular Biology Laboratory and Laboratory of Molecular Ecology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: PhD Ivna Štolfa, assistant professor
Assistant in charge: PhD Lidija Begović

Short abstract:

Fructans are easily mobile carbohydrate storage in the plant. Because of its morphology barley stem stores a considerable amount of fructans that can be mobilized in the grain after flowering, which significantly affects the overall yield. In this paper, the content of fructans and the activity of genes involved in the synthesis and remobilization of fructans in the stem of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Astor during for four growth stages: heading, flowering, grain filling and ripening was studied. Fructan content was measured and expression of genes sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (*1-SST*), sucrose:fructan-6 fructosyltransferase (*6-SFT*) and fructan 1-exohydrolase (*1-FEH*) was determined by semiquantitative analyses. The highest fructan content was measured in the grain filling stage, and the lowest in the ripening. Expression of gene *1-SST* is constant during the development, in contrast to the *6-SFT* gene having the highest expression during flowering. Expression of gene *1-FEH* increased from heading what indicated beginning of the mobilization of fructans from the stem into the grain.

Number of pages: 18
Number of figures: 2
Number of tables: 1
Number of references: 23
Original in: Croatian

Key words: fructans, barley, sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), sucrose: fructan-6 fructosyltransferase and fructan 1-exohydrolase (1-FEH)

Thesis deposited in:
Library of Department of Biology, University of J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Fruktan u biljkama 1

1.2. Geni odgovorni za biosintezu i mobilizaciju 1

1.3. Ječam 2

1.4. Cilj rada 2

2. Materijal i metode 3

2.1. Biljni materijal i uzorkovanje 3

2.2. Ekstrakcija i određivanje sadržaja fruktana u internodijima 3

2.3. Izolacija ukupne RNA 4

2.4. Određivanje koncentracije RNA u uzorcima 4

2.5. Sinteza cDNA 4

2.6. Izrada početnica 5

2.7. Semi-kvantitativno mjerenje ekspresije gena 5

2.8. Elektroforeza DNA odsječaka u agaroznom gelu 6

2.9. Statistička obrada podataka 6

3. Rezultati 7

3.1. Sadržaj fruktana u stabljici 7

3.2. Ekspresija gena uključenih u sintezu i remobilizaciju fruktana 7

4. Rasprava 9

5. Glavni rezultati i zaključci 11

7. Literatura 12

1. Uvod

Fruktani su polimeri koji se sastoje od fruktoze i terminalnih glukoznih ostataka, nalazimo ih u različitim organizmima, u bakterijama, nekim gljivama i u oko 15% biljaka (Arkel i sur., 2013). S obzirom na položaj veze između fruktoznih ostataka, fruktane dijelimo u tri skupine: (1) 6-vezani u levanu, fruktozne jedinice su vezane β(2,6) vezama; ovaj tip fruktana nalazimo u bakterijama i u jednosupnicama, (2) 1-vezani u inulinu, fruktozne jedinice su vezane β(2,1) vezama; inulin nalazimo u dvosupnicama, (3) miješani tip fruktana pronađen u porodici Liliaceae u kojem se β(2,1) elongacija odvija na C1 i na C6 atomu glukoznog ostatka (Kawakami i Yoshida, 2005).

1.1. Fruktan u biljkama

Fruktan u biljkama ima ulogu rezervnog ugljikohidrata i najviše se skladišti u stabljici, lukovici i glavnom korijenu, također igra i važnu ulogu u zaštiti biljke od suše i hladnoće (Wagner i Wiemken, 1987). Stabljika ječma zbog svoje morfološke građe pohranjuje znatnu količinu fruktana koji se mobiliziraju iz stabljike u zrno poslije cvatnje što značajno utječe na ukupni prinos zrna (Sprenger i sur., 1995). Fruktan je glavni izvor hranjivih tvari neophodan za preživljavanje biljke ispod snježnog pokrivača. U procesu klijanja fruktan se iskorištava sve dok se fotosintezom ne stvori dovoljno ugljikohidrata za razvoj biljke. Duljina fruktanskih lanaca varira od 10 pa sve do 200 fruktoznih jedinica i ovisi o biljnoj vrsti u kojoj se nalazi. Biosintezu fruktana u biljkama kataliziraju enzimi saharoza: saharoza 1-fruktoziltransferaza (1-SST), fruktan: fruktan-1-fruktoziltransferaza (1-FFT) i fruktan-1-egzohidrolaza (1-FEH) (Arkel i sur., 2013).

1.2. Geni odgovorni za biosintezu i mobilizaciju

Sinteza fruktana započinje u vakuoli stanice pri čemu sudjeluju enzimi saharoza: saharoza 1-fruktozil transferaza (1-SST) i saharoza: fruktan-6-fruktozil-transferaza (6-SFT). Enzim fruktan-1-egzohidrolaza (1-FEH) hidrolizira nakupljene fruktane i time omogućava njihovu remobilizaciju u fazi nalijevanja zrna (Vijn i Smeekens, 1999). Aktivnost gena uključenih u procese sinteze i remobilizacije ovisna je o genotipu te uvjetima rasta i razvoja biljke (Nemeth i sur., 2014). 1-SST katalizira sintezu trisaharida-1-kestoze iz dvije molekule saharoze, a 1-SFT katalizira transfruktozilaciju između fruktana. Enzim 1-FEH katalizira razgradnju inulina hidrolizom terminalnih fruktoznih jedinica, pri čemu nastaju fruktoza i inulin kraćeg lanca. Saharoza: fruktan-6-fruktoziltransferaza (6-SFT) također ima važnu ulogu u biosintezi fruktana, 1-FFT sintetizira β(2,1) ogranke na oligomere fleina i graminana

(skladišne ugljikohidrate porodice trava), koje sintetizira 6-SFT. Tako 6-SFT pridonosi akumulaciji fruktana koji sadrže i β(2,1) i β(2,6) veze (Kawakami i Yoshida, 2005). 1-SST i 1-SFT su neobični po tome što ne prate Michaelis- Menten-ovu kinetiku, njihova aktivnost ovisi o koncentraciji i supstrata i enzima (Koops i Jonker, 1996).

1.3. Ječam

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jednogodišnja biljka koja pripada porodici trava (Poaceae), rod Hordeum, kao jednoj od najbrojnijih porodica koja zauzima oko 20 % ukupnog biljnog pokrova na Zemlji (Jacobs i sur., 1999). Uz ostale široko rasprostranjene srodnike, u porodicu trava, ubrajamo i druge važne žitarice: pšenicu, kukuruz, rižu i druge, koje imaju vrlo značajnu ulogu u ishrani ljudi i životinja. Vrsta *Hordeum vulgare* dijeli se u dvije podvrste: *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*, kultivirani ječam i *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum.* Stabljika ječma sastavljena je od nekoliko članaka (internodija) na kraju kojih se nalaze koljenca (nodiji), dok najviši internodij nosi klas. Listovi su linearni, 5-15 mm široki u alternirajućem rasporedu, građeni su od rukavca i plojke, uški i jezičca. Rukavac u potpunosti obavija stabljiku. Stabljika i rukavac mogu sadržavati antocijane. Cvjetovi ječma skupljeni su u klas koji se sastoji od člankovitog klasnog vretena. Klasići su, u tripletima, naizmjenično raspoređeni s obje strane glavne osi (lat. *rachis*) koja je zapravo produžetak stabljike. Kod višerednog ječma sva tri klasa su razvijena i plodna za razliku od dvorednog gdje je samo srednji razvijen i plodan, a bočni su sterilni. Građeni su od dvije slaborazvijene pljeve (lat. *glumae*) i cvijeta koji uz tučak i prašnike sadrži pljevice koje na vrhovima prelaze u osje.

1.4. Cilj rada

Fruktani predstavljaju značajne rezerve ugljikohidrata u stabljici, te vrlo značajno utječu na konačnu ukupnu masu zrna, a time i na prinos. Rezerve fruktana pohranjene u stabljici transportiraju se u zrno tijekom faze nalijevanja zrna te tako doprinose 25-30% ukupnoj masi zrna u normalnim razvojnim uvjetima. Učinkovitost mobilizacije fruktana određena je genotipom i okolišnim čimbenicima.

Neposredni ciljevi:

1. Odrediti sadržaj fruktana u stabljici jarog ječma sorte Astor tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba.

2. Utvrditi ekspresiju gena za saharoza: saharoza-1-fruktozil-transferazu (*1-SST*) i saharoza: fruktan-6-fruktozil transferazu (*6-SFT*) uključenih u sintezu fruktana i gena za

fruktan-1-egzohidrolazu (*1-FEH*) uključenu u mobilizaciju fruktana u stabljici sorte Astor tijekom razvoja.

2. Materijal i metode

2.1. Biljni materijal i uzorkovanje

Uzorci stabljike dvorednog jarog ječma sorte Astor prikupljani su u razdoblju od svibnja do lipnja 2014. godine. Sorta je uzgajana na pokusnim poljima Poljoprivrednog instituta Osijek na parcelama veličine 7,56 m² s normom sjetve od 450 zrna/m², raspoređenim prema slučajnom blok rasporedu Tlo je aluvijalno pH u 1M KCl: 5,90, humus 3,0%, P_2O_5=27,0 mg/100g, K_2O=25,9 mg/100g, vrlo dobre plodnosti (Lalić i sur., 2009). Uzorkovanje je započelo s fazom klasanja nakon čega su uzorci stabljike prikupljani svakih desetak dana, ovisno o vremenskim uvjetima, čime su obuhvaćeni razvojni stadiji: cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba. Faze su određene na temelju fenotipskih karakteristika koristeći Zadoksovu razvojnu skalu (Zadoks, 1974). Za analize su korištena tri donja internodija počevši s donjim, ujedno i najstarijim, kao prvim internodijem (I) i nastavljajući prema vrhu stabljike slijedio je drugi (II) pa treći (III) internodij. Biljni materijal je smrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80°C. Analiza sadržaja fruktana obuhvatila je sve četiri razvojne faze, a ekspresija gena mjerena je u tri razvojne faze: klasanja, cvatnja i nalijevanje zrna.

2.2. Ekstrakcija i određivanje sadržaja fruktana u internodijima

Uzorci biljnog tkiva samljeveni su na mlinu (Retsch, Njemačka) koristeći sito s veličinom otvora promjera 0,5 mm i osušeni u sušioniku pri 65°C tijekom 48 sati. Nakon čega su uzorci ekstrahirani s 80% etanolom u vodenoj kupelji na 80°C tijekom 30 minuta, centrifugirani na 1000 *g*, a supernatant je dekantiran. Postupak je ponovljen četiri puta. U završnom koraku talog je opran s 96% acetonom i uzorci su osušeni preko noći u sušioniku pri 70°C. Za ekstrakciju fruktana odnosno ugljikohidrata topljivih u vodi, 25 mg suhog taloga inkubirano je s destiliranom vodom na 90°C u vodenoj kupelji. Baždarna krivulja izrađena je koristeći fruktozu (1 mg/mL) kao standard. Sadržaj fruktana u supernatantu određen je spektrofotometrijski koristeći rezocinol reagens (Ashwell, 1957). Rezultati su izraženi kao ekvivalent fruktoze (µg po g suhe tvari).

2.3. Izolacija ukupne RNA

U sterilne tube od 12 mL odvagano je oko 0,3 - 0,4 g tkiva nakon čega je dodano 2 mL TRI Reagent® (Sigma, T9424). Uzorci su kratko promiješani na miješalici i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je dodano 0,4 mL mješavine kloroforma:izoamilnog alkohola u omjeru 1:1 (v/v). Otopina je snažno promiješana i centrifugirana 25 minuta na 3310 *g* i 4°C. Nakon centrifugiranja vodena faza je prenesena u nove tubice i precipitirana dodatkom jednakog volumena izopropanola te ponovo centrifugirana 20 minuta na 16 000 *g* i 4°C. Dobiveni talog opran je s 1 mL 75% etanola u vodi tretiranoj dietil-pirokarbonatom (DEPC) i ponovno centrifugiran. Nakon sušenja na zraku talog je otopljen u 100 µL DEPC vode. Za precipitaciju RNA dodano je 100 µL 5M litijevog klorida (LiCl), a otopina je ostavljena preko noći u hladnjaku na 4°C. Uzorci su centrifugirani 30 minuta na 16 000 *g*, talog je opran s 1 mL 75% etanola i centrifugiran 5 minuta na 4°C i 8000 *g*. RNA je resuspendirana u 25 µL DEPC vode i pohranjena na -80°C.

2.4. Određivanje koncentracije RNA u uzorcima

Koncentracija RNA u uzorcima izmjerena je spektrofotometrijski (NanoVue) na valnim duljinama od 230, 260 i 280 nm koristeći 2 µL uzorka i destiliranu vodu kao slijepu probu. Omjer A_{260}/A_{280} ukazuje na kontaminaciju RNA s genomskom DNA, a omjer A_{260}/A_{230} pokazuje kontaminaciju sa solima, fenolom ili proteinima. Oba omjera kretala su se oko 2,0 što je ukazivalo na čistu RNA u uzorku.

2.5. Sinteza cDNA

Uzorci RNA tretirani su s DNazom (DNase I, Amplification grade, Invitrogen) prema protokolu proizvođača. Na 1 µg RNA dodano je 1 µL 10x reakcijskog pufera, 1 µL DNaze (1 U/ µL) i DEPC vode do ukupnog volumena od 10 µL. Nakon čega je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi (ne duže od 15 minuta), zatim je dodano 1 µL 25 mM EDTA (pH=8,0) i uzorci su inkubirani 10 minuta na 65°C s ciljem inaktivacije DNaze. Na prethodno pripremljene uzorke RNA dodano je 10 µL reakcijske smjese za obrnuto prepisivanje (eng. *reverse transcription*, RT) prema protokolu proizvođača (Applied Biosystems): 1x PCR Gold Buffer, 1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM smjesa dNTP , 2,5 µM oligo $d(T)_{16}$ početnice, 1U/µL inhibitora RNaze (RNasin, Promega) i 2,5 U/µL MuLV reverzne transkriptaze u konačnom volumenu reakcije od 20 µL. Svi koraci izvođeni su na ledu. Reakcija sinteze cDNA odvijala se prema slijedećem protokolu: 10 minuta na 25°C, 25 minuta na 42°C, 5 minuta na 99°C i 5 minuta na 5°C. Uzorci su pohranjeni na -20°C.

2.6. Izrada početnica

Za analizu ekspresije gena koji sudjeluju u biosintezi fruktana odabrani su geni saharoza-saharoza fruktozil transferaza (*1-SST*), saharoza: fruktan-6 fruktozil transferaza (6-*SFT*) i 1-egzohidrolaza (*1-FEH*), a kontrola ekspresije je gen dehidrogenaza gliceraldehid 3-fosfata (*GAPDH*) koji pripada skupini konstitutivnih gena (engl. *housekeeping genes*) koji su odgovorni za održavanje osnovnih funkcija stanice i čija ekspresija je konstantna pri normalnim i patološkim uvjetima, odnosno ne mijenja se u ovisnosti o eksperimentalnim uvjetima. Početnice su izrađivane na temelju sljedova istraživanih gena pohranjenih u bazi EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/embl) pod pristupnim brojevima: AJ60533 za *1-FEH*, X83233 za *6-SFT*, AJ567377 za *1-SST*). Odabrane početnice dizajnirane si programom Primer3Plus (Untergasser i sur., 2007). Početnice korištene u PCR reakcijama nalaze se u tablici 1. Početnice su otopljene u sterilnoj ultra čistoj vodi u početnoj koncentraciji od 100 μM i razrijeđene do 10 μM. Sve otopine su čuvane na -20°C.

Tablica 1. Nukleotidni sljedovi početnica korišteni u reakcijama PCR i RT-PCR.

Naziv gena	Uzvodna početnica (F) 5'->3'	Nizvodna početnica (R) 3'->5'	Veličina produkta
1-FEH	GATCCCTCTGGACCGATGTA	GGTCCAGCAACCGTCTATGT	183 pb
1-SST	GTGCTGTACGTGCTCAAGGA	CACGGGGTCGTAGAATGACT	177 pb
6-SFT	AGATGGACTCGGCACACAA	GGTTGTGCAGAATGATTCGAT	153 pb
HvGAPDH	ATCATTCCAAGCAGCACTGG	GCCATTCCAGTCAACTTTCC	600 pb

2.7. Semi-kvantitativno mjerenje ekspresije gena

Kvaliteta početnica prethodno je provjerena lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction,* PCR) uspoređujući veličinu odsječka genomske DNA i cDNA. Također, za svaki gen je određen optimalan broj ciklusa u kojem je umnažanje PCR produkata linearno. Reakcijska smjesa sastojala se od 10 μL 2x Takara Emerald Mix (Clontech) koji sadrži polimerazu, PCR pufer, dNTP smjesu i $MgCl_2$, 150 nM uzvodne i nizvodne početnice za referentni gen (*HvGAPDH*), 1 μL cDNA kalupa i 50 ng prethodno izolirane genomske DNA kao pozitivne kontrole. Negativna kontrola sadržavala je odgovarajući volumen sterilne destilirane vode umjesto cDNA kalupa. Reakcija PCR za gen *HvGAPDH* odvijala se prema sljedećem protokolu: inicijalna denaturacija 2 minute i 30 s na 95°C, 38 ciklusa denaturacije na 95°C 45 s, prianjanje početnica na 64°C 45 s, produljivanje lanca na 72°C 1 minutu i 30 s, nakon čega je uslijedilo završno produljivanje na 72°C u

trajanju od 3 minute i hlađenje na 4°C. Nakon denzitometrije na osnovu dobivenih podataka određena potrebna količina cDNA za normalizaciju ekspresije gena *HvGAPDH* u svim uzorcima. Ekspresija gena *1-FEH, 1-SST* i *6-SFT* u internodijima ječma izmjerena je semi-kvantitativno uspoređujući razinu ekspresije u uzorcima mjerenjem količine PCR produkta i uspoređujući je s referentni genom *HvGAPDH*. Za gene *1-SST, 6-SFT* i *1-FEH* provedene su PCR reakcije koristeći 150 nM početnice i 0,9 do 1,7 µL cDNA, ovisno o uzorku, prema slijedećem protokolu: inicijalna denaturacija 2 minute i 30 s na 95°C, 38 ciklusa denaturacije na 95°C 45 s, prianjanje početnica na 60°C 45 s, produljivanje lanca na 72°C 1 minutu i 30 s, nakon čega je uslijedilo završno produljivanje na 72°C u trajanju od 3 minute i hlađenje na 4°C. Ekspresija gena mjerila se u tri internodija sorte jarog ječma Astor i obuhvaćala je tri različite razvojne faze: klasanje, cvatnja i nalijevanje zrna.

2.8. Elektroforeza DNA odsječaka u agaroznom gelu

Nakon PCR reakcije 9 µL svakog PCR produktna naneseno je na 2% agarozni gel u 1X TAE puferu (Tris-acetat EDTA, pH=8,0). Uzorci su razdvojeni na gelu pri 100V. Za određivanje veličine produkata korišten je 50 kb DNA biljeg (Sigma). Gelovi su skenirani i intenzitet PCR produkata izmjeren je koristeći program Kodak D 3.6 (Kodak).

2.9. Statistička obrada podataka

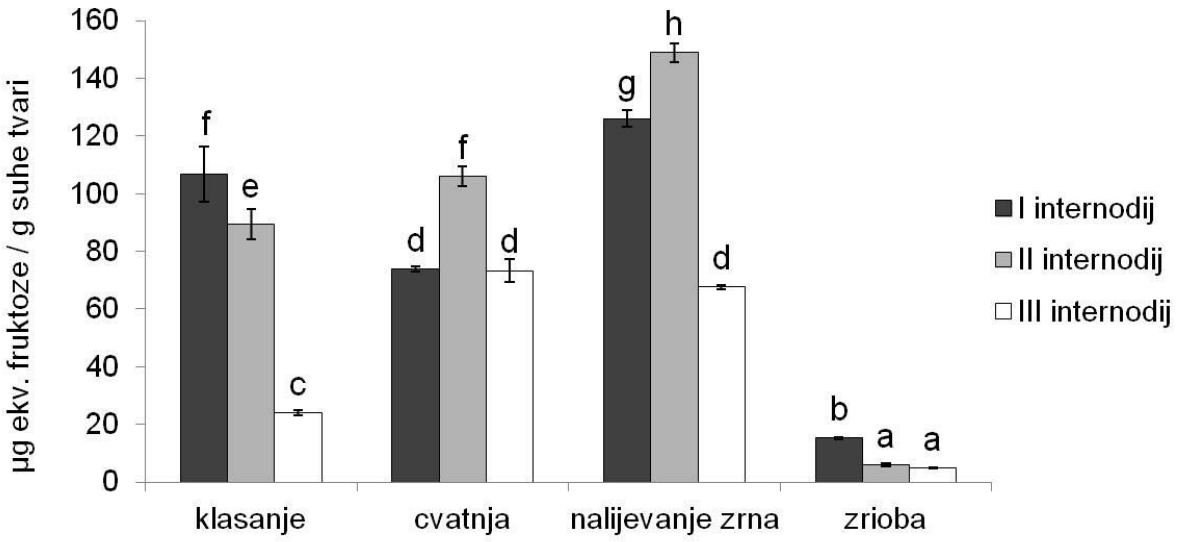
Podaci o sadržaju fruktana u internodijima obrađeni su analizom varijance (engl. *ANalysis Of VAriance,* ANOVA) pri čemu je korišten DMRT (engl. *Duncan multiple range test*) za analizu značajnosti. Sve analize provedene su uz pomoć računalnog programa Statistica 7.1. (StatSoft, Inc. 2005).

3. Rezultati

3.1. Sadržaj fruktana u stabljici

Najviše fruktana u stabljici ječma utvrđeno je u fazi nalijevanja zrna, a najmanje u fazi zriobe jer je počela mobilizacija prema zrnu zbog povećanja udjela suhe tvari i smanjenja fotosintetskih procesa u biljci (slika 1).

U fazi klasanja najviše fruktana sadrži prvi internodij, a najmanje treći intrenodij. Tijekom cvatnje sadržaj fruktana se povećava u svim internodijima, a najveći sadržaj izmjeren je u drugom internodiju. U normalnim razvojnim uvjetima rezerve fruktana nakupljaju se u nižem dijelu stabljike prije i to je vidljivo smanjenjem količine inulina u prvom, a povećanjem u drugom i trećem internodiju tijekom cvatnje. U fazi nalijevanja zrna sadržaj fruktana ne mijenja se u trećem internodiju za razliku od prvog i drugog internodija. U ovoj razvojnoj fazi, u drugom internodiju, izmjeren je i ukupno najveći sadržaj fruktana.

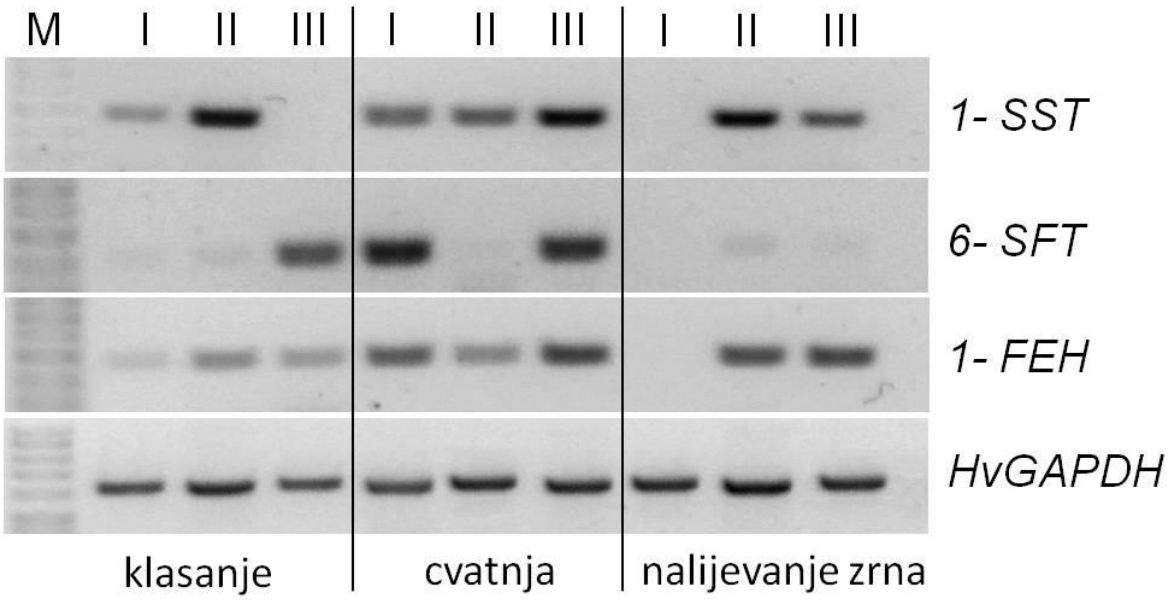


Slika1. Sadržaj fruktana u internodijima sorte Astor u različitim razvojnim fazama: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba izražen kao mikrogram ekvivalenta fruktoze po gramu suhe tvari (µg ekv. fruktoze/g suhe tvari). Različito slovo označava statističku značajnost $P \leq 0,05$. Stupci predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija (SD).

3.2. Ekspresija gena uključenih u sintezu i remobilizaciju fruktana

Enzimi 1-SST i 6-SFT sudjeluju u sintezi fruktana, a enzim 1-FEH sudjeluje u razgradnji i remobilizaciji fruktana iz stabljike u zrno. Rezultati analize pokazuju da je

ekspresija gena odgovornog za enzim 1-SST najveća u drugom internodiju u fazi klasanja i nalijevanja zrna te u trećem internodiju u fazi cvatnje, dok u prvom internodiju tijekom nalijevanja zrna uopće nema ekspresije gena *1-SST* (slika 2), ali i ni jednog drugog proučavanog gena (*1-FEH* i *6-SFT*). Ekspresija gena za enzim 6-SFT najslabija je od sva tri gena i u fazi nalijevanja zrna je gotovo i nema, a najjača ekspresija uočava se u trećem internodiju tijekom klasanja i u prvom i trećem internodiju tijekom cvatnje. Ova dva enzima odgovorna su za sintezu fruktana i međusobno su povezani što je vidljivo u fazi klasanja i u fazi nalijevanja zrna. Naime, tamo gdje je pojačana ekspresija *1–SST*, smanjena je ekspresija gena *6-SFT* i obrnuto. Ekspresija gena za enzim 1-FEH, koji sudjeluje u mobilizaciji fruktana postupno raste, s izuzetkom u prvom internodiju faze nalijevanja zrna, gdje nema nikakve ekspresije. Ekspresija gena *1-FEH* najveća je u trećem internodiju u fazi cvatnje te u drugom i trećem internodiju u fazi nalijevanja zrna.



Slika 2. Ekspresija gena za saharoza: saharoza 1-fruktozil transferazu (*1-SST*), saharoza: fruktan-6-fruktozil-transferazu (*6-SFT*) te gena za fruktan-1-egzohidrolazu (*1-FEH*) u prvom (I), drugom (II) i trećem (III) internodiju tijekom tri razvojne faze ječma: klasanje, cvatnja i nalijevanje zrna.

4. Rasprava

Sinteza fruktana potaknuta je u uvjetima kada produkata fotosinteze ima u suvišku, odnosno kada se pojavi suvišak saharoze u biljkama. Smatra se da takav mehanizam sinteze i pohrane ugljikohidrata u spremišna tkiva omogućava biljci daljnje odvijanje procesa fotosinteze (Wagner i sur., 1983). U ovom radu rezultati pokazuju porast sadržaja fruktana u internodijima od klasanja do nalijevanja zrna. Najveći sadržaj fruktana izmjeren je u fazi nalijevanja zrna, a namanju u fazi zriobe (slika 1) što je u suglasnosti s prijašnjim istraživanjima (Pollock i Cairns, 1991). Rana akumulacija fruktana pruža zaštitu od hladnoće (Gaudet i sur., 2001), što dobiveni rezultati potvrđuju budući da u fazi klasanja najviše fruktana sadrži prvi internodij. Najmanje fruktana u fazi klasanja sadrži treći internodij jer mobilizacija tek počinje, zato u fazi cvatnje dolazi do porasta u drugom i trećem internodiju. Faza nalijevanja zrna je najbogatija fruktanima, u prvom i drugom internodiju dolazi do značajnog porasta sadržaja fruktana, dok treći internodij sadrži podjednako fruktana kao i u fazi cvatnje. U zriobi uočljiv je značajan pad sadržaja fruktana u svim internodijima (slika 1). Drugi internodij mogao bi imati ulogu premosnika tijekom mobilizacije fruktana zbog toga što dolazi do opadanja koncentracije fruktana idući prema višim dijelovima stabljike (Shiomi i sur., 2006). Ta pojava dolazi do izražaja u fazama cvatnje i nalijevanja zrna kada drugi internodij prednjači s najvećom koncentracijom fruktana. Sinteza fruktana započinje u vakuoli stanice pri čemu sudjeluju enzimi saharoza: saharoza- fruktozil-1-transferaza (1-SST) i saharoza: fruktan-6-fruktozil-transferaza (6-SFT). Enzim fruktan-1-egzohidrolaza (1-FEH) hidrolizira nakupljene fruktane i time omogućava njihovu remobilizaciju u fazi nalijevanja zrna. Aktivnost gena uključenih u procese sinteze i remobilizacije ovisni su o genotipu te uvjetima rasta i razvoja biljke (Khoshro i sur., 2014). Tijekom razvoja se mijenja aktivnost gena odgovornih za sintezu i mobilizaciju fruktana. Tako se ekspresija gena *1-SST* povećava tijekom klasanja i cvatnje te je najveća u trećem internodiju, a tijekom faze nalijevanja zrna u drugom internodiju (slika 2). U prvom internodiju tijekom faze nalijevanja zrna nije uočena ekspresija ovoga gena. Gen *6-SFT* je u početku nije eksprimiran ili je vrlo slabo aktivan, u cvatnji dolazi do porasta ekspresije nakon čega opet opada. Do značajnijeg povećanja ekspresije dolazi u trećem internodiju u fazi klasanja jer je prije toga ekspresija gena *6-SFT* bila vrlo mala (slika 2). U drugom internodiju tijekom cvatnje nije zabilježena ekspresija ovog gena, kao i u prvom internodiju u fazi nalijevanja zrna, a u drugom i trećem internodiju ekspresija je vrlo niska, kao i u fazi klasanja. Iako geni *1-SST* i *6-SFT* imaju istu zadaću, a to je sinteza fruktana, njihova ekspresija je različita. Do te pojave dolazi jer su ta dva gena

regulirana na drugačiji način, kako na razini transkripcije (mRNA), tako i na proteinskoj razini. Oba gena su aktivirana citoplazmatskom saharozom, ali *1-SST* ima niži prag za saharozu od *6-SFT*, zbog čega aktivnost 1-SST brže raste, ali i pada. Iz tog razloga je 1-SST ključan u kontroli sinteze fruktana. Slijedovi mRNA za gene *1-SST* i *6-SFT* vrlo su slični (70 %), no njihove 5'- i 3'- UTR regije imaju vrlo malo sličnosti (36 %) i moguće je da te razlike utječu na njihovu različitu aktivnost (Nagaraj i sur., 2004). Ekspresija gena *1-FEH* postupno se povećava tijekom razvoja što ukazuje na početak mobilizacije fruktana u stabljici. Najveća ekspresija utvrđena je u fazi cvatnje i nalijevanja zrna. Tijekom cvatnje ekspresija gena *1-FEH* nešto je veća u prvom i trećem, nego u drugom internodiju. U klasanju je najveća ekspresija u drugom internodiju, ali to je ujedno i faza u kojoj je utvrđena najniža ekspresija gena *1-FEH* budući da je to ujedno i faza u kojoj se pojačava sinteza fruktana u biljci. Ekspresija gena *1-FEH* povećava se tijekom razvoja te kada dostigne maksimalnu vrijednost (treći internodij tijekom cvatnje), njegova ekspresija se smanjuje ili ostaje konstantna.

Razlike u sadržaju fruktana objašnjavaju različite aktivnosti gena odgovornih za stvaranje β (2,6) veza u različitim fazama razvoja (Jondi i sur., 2012). Uvjeti koji vode do povećanja koncentracije saharoze i inicijacije sinteze fruktana praćeni su porastom aktivnosti 1-SST. Prekid inicijacije sinteze fruktana uzrokuje izlaganje tami ili inhibicija ekspresije gena, što je popraćeno padom aktivnosti 1-SST (Pollock i Cairns, 1991). Postupno povećanje sadržaja fruktana u drugom i trećem internodiju odgovara kombiniranom porastu ekspresije gena *1-SST* i *6-SFT*. Do značajnog porasta ekspresije gena *6-SFT* dolazi u trećem internodiju u fazi klasanja, što je popraćeno i porastom sadržaja fruktana u tom internodiju u fazi cvatnje. Porast sadržaja fruktana prati promjena u ekspresiji gena *1-SST* i *6-SFT*, a smanjenje sadržaja fruktana povezano je s povećanjem ekspresije gena *1-FEH*. Gen *1-FEH* aktivan je u skraćivanju lanaca fruktana u nastajanju tijekom sinteze (Van den Ende i sur., 2003). Njegova ekspresija raste tijekom razvoja te je popraćena smanjenjem koncentracije fruktana. Aktivnost gena *1-FEH* raste sve do faze nalijevanja zrna (slika 2) jer dolazi do povećane mobilizacije rezervi fruktana (slika 1) u stabljici što je u suglasnosti s prijašnjim istraživanjima (Wardlaw i Willenbrink, 2000).

Razumijevanje procesa sinteze i remobilizacije fruktana tijekom razvoja ječma doprinosi procesima selekcije i oplemenjivanja sorti s bogatim sadržajem fruktana u cilju povećanja prinosa i kvalitete zrna što ujedno povećava i proizvodnju ječma osim za potrebe privrede i za industriju zdrave hrane.

5. Glavni rezultati i zaključci

1. Sadržaj fruktana raste tijekom razvoja i najveći je u fazi nalijevanja zrna, a najmanji u fazi zriobe.
2. Najveći sadržaj fruktana izmjeren je u drugom i trećem internodiju u fazi nalijevanja zrna.
3. Ekspresija gena saharoza: saharoza-1-fruktozil-transferaza (*1-SST*) povećava se od prvog do trećeg internodija u fazi klasanja, a u fazi cvatnje podjednaka je u sva tri internodija. Najmanja ekspresija ovog gena uočava se u prvom internodiju u fazi nalijevanja zrna.
4. Gen za saharoza:fruktan-6-fruktozil-transferazu (*6-SFT*) ima najveću ekspresiju tijekom cvatnje u drugom i trećem internodiju.
5. Enzim fruktan-1-egzohidrolaza (1-FEH) sudjeluje u razgradnji i mobilizaciji fruktana pa se i ekspresija gena odgovornog za ovaj enzim povećava tijekom razvoja od klasanja do nalijevanja zrna što ukazuje na početak mobilizacije fruktana iz stabljike u zrno.

7. Literatura

Arkel J, Sevenier R, Hakkert J, Bouwmeester H, Koops A, van der Meer I. 2012. Tailor-made fructan synthesis in plants: A review, *Carbohydr Polym* 93: 48-56.

Ashwell G. 1957. *Colorimetric analysis of sugars*. Vol 3 Methods in Enzymology. Academic Press, New York, USA, 75 pp.

Bancal P, Henson CA, Gaudillère JP, Carpita NC. 1991. Fructan biochemical structure and sensitivity to an exohydrolase. *Carbohydr Res* 217: 137-151.

Gaudet DA, Laroche A, Puchalski B. 2001. Seeding date alters carbohydrate accumulation in winter wheat. *Crop Sci* 41: 728-738.

Jacobs BF, Kingston JD, Jacobs L. 1999. The origin of grass-dominated ecosystems. *Ann Mo Bot Gard* 144: 590-643.

Joudi M, Ahmadi A, Mohamadi V, Abbasi A, Vergauwen R, Mohammadi H, Van den Ende W. 2012. Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiol Plant* 144: 1-12.

Kawakami A, Yoshida M. 2005. Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta* 223: 90-104.

Koops AJ, Jonker HH. 1996. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* 'Colombia' : II Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferaze and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyl transferase. *Plant Physiol* 110: 1167-1175.

Khoshro H, Taleei A, Bihamta M, Shahbazi M, Abbasi A, Ramezanpour S. 2014. Expression analysis of the genes involved in accumulation and remobilization of assimilates in wheat stem under terminal drought stress. *Plant Growth Regul* 74: 165-176.

Lalić A, Kovačević J, Šimić G, Abičić I, Lenart L. 2009. The quality parameters of barley malt and grain considering genotype and environment sinergy, u: L. Lenart, (ur.), Zbornik Radova 44. Hrvatski i 4 Medunarodni Simpozij Agronoma, Opatija, Hrvatska, 16-20 Veljače 2009. Poljoprivredni Fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pp. 335-339.

Nagaraj VJ, Altenbach D, Galati V, Lüscher M, Meyer AD, Boller T, Wiemken A. 2004. Distinct regulation of sucrose:sucrose 1- fructosyltransferase (1-SST) and sucrose:fructan 6-fructosyl transferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as teh pacemaker. *New Phytol* 161: 725-748.

Nemeth C, Andersson A, Andersson R, Mangelsen E, Sun C, Åman P. 2014. Relationship of grain fructan content to degree of polymerisation in different barleys. *Food Nutr Sci* 5:581-589

Pollock CJ, Cairns AJ. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 77-101.

Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, Yoshihira T, Kosaka S, Osaki M. 2006. Fructan accumulation in wheat stems during kernel filling under varying nitrogen fertilization. *Plant Sci* 86: 1027-1035.

Sprenger N, Brotlik K, Brandt A, Boller T, Wiemken A. 1995. Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6- fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11652-11656.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35: W71-W74.

Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Van Riet L, Van Laere A, Yoshida M, Kawakami A. 2003. Fructan 1- exohydrolases. β-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiol* 131: 620-631.

Vijn I, Smeekens S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* 120: 351-359.

Wagner W, Keller F, Wiemken A. 1983. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Z Pflanzenphysiol* 112: 359-372.

Wagner W, Wiemken A. 1987. Enzymology of fructan synthesis in grasses. Properties of sucrose-sucrose fructosyl transferase in barley leaves (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). *Plant Physiol* 85: 706-710.

Wardlaw IF, Willenbrink J. 2000. Mobilization of fructan reserves and changes in enzymes activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytol* 148: 413-422.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research* 14: 415-421.