

Ekspresija gena za lignin u ječmu

Jarić, Bernard

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:218305>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Bernard Jarić

Ekspresija gena za lignin u ječmu

Završni rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Ekspresija gena za lignin u ječmu

Bernard Jarić

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju i Zavodu za primijenjenu zootehniku Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku

Mentor: Dr.sc. Lidija Begović, doc.

Kratak sažetak završnog rada: Kao komponenta stanične stijenke lignin igra važnu ulogu u pružanju mehaničke potpore i transporta vode u biljkama. Sinteza lignina uključuje nekoliko putova. U ovom radu analizirali smo ekspresiju gena uključenih u sintezu lignina: fenilalanin amonijak-liazu (*PAL*), 4-kumarat: koenzim A ligazu (*4CL*) i reduktazu cinamoil-koenzima A (*CCR*) kao i celuloza sintetazu (*CesA*). Analize su provedene na tri kultivara ječma (*Hordeum vulgare* L.) u fazi nalijevanja zrna koristeći lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (qPCR). Rezultati su pokazali da se ekspresija *PAL*, *4CL*, *CCR* i *CesA* razlikuje u odnosu na referentni gen (ADP-ribozilacijski faktor 1-sličan protein, *ADP*). Najveća ekspresija zabilježena je u kultivaru Osvit, zatim slijedi kultivar Titan pa Predator koji je ujedno imao i najnižu ekspresiju svih gena.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ječam, lignin, *PAL*, *CCR*, *4CL*, celuloza sintaza

Rad je pohranjen na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD**Bachelor Thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Scientific Area:** Natural Sciences**Scientific Field:** Biology**Expression of genes involved in lignin synthesis in the barley stem****Bernard Jarić****Thesis performed at:** Department of Biology and Department for special zootechnique, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, J.J. Strossmayer University of Osijek**Supervisor:** Lidija Begović, PhD, assistant professor

Short abstract: As a part of the plant cell wall lignin plays an important roles providing mechanical support and water transport. Lignin synthesis includes several pathways. We analysed expression of genes involved in lignin synthesis: phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), 4-coumarate: CoA ligase (*4CL*) and cinnamoyl-CoA reductase (*CCR*) as well as cellulose synthase (*CesA*). Analyses were performed on three spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars at grain filling stage by using real-time polymerase chain reaction (qPCR). Results showed that expression of *PAL*, *4CL*, *CCR* and *CesA* differed in comparison to the reference gene (ADP-ribosylation factor 1-like protein, ADP). The highest expression was observed in cultivar Osvit, followed by Titan and Predator which had the lowest expression of all genes.

Original in: Croatian**Key words:** barley, lignin, PAL, CCR, 4CL, cellulose synthase**Thesis deposited:** On the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Lignin	1
1.2. Sinteza lignina	1
1.2.1. Fenilalanin amonij-liaza (PAL)	1
1.2.2. 4-kumarin-CoA ligaza (4CL)	1
1.2.3. Reduktaza cinamoil koenzima A (CCR)	2
1.3. Celuloza sintetaza (CesA)	2
1.4. Ječam	2
1.5. Cilj rada	3
2. MATERIJALI I METODE	4
2.1. Biljni materijal i uzorkovanje	4
2.2. Izolacija RNA	4
2.4. Sinteza cDNA	4
2.5. Izrada početnica	5
2.6. Analiza ekspresije gena	6
3. Rezultati	7
4. Rasprava	9
5. Zaključak	11
6. Literatura	12

1.UVOD

1.1. Lignin

Lignin je važan sastojak, zajedno sa hemicelulozom i celulozom, sekundarne stanične stijenke koja stanicama osigurava čvrstoću, sudjeluje u transportu vode i štiti od patogeni i mnogih parazita (Beckham i sur., 2016). Veliku važnost lignina u biljkama pokazuje i to što lignin zauzima oko 30% od svog ugljika koji se nalazi u biljkama te je ujedno važan i u ciklusu kruženja ugljika u prirodi (Cesarino i sur., 2012). Zbog svoje važnosti i uloge, funkcije gena koji su uključeni u biosintezu lignina dobro su poznate (Bonawitz i Chapple, 2010).

1.2. Sinteza lignina

Lignin je fenolni polimer koji se u najvećoj mjeri sastoji od gvajacila (G podjedinice), siringila (S podjedinice) i *p*-hidroksifenola (H podjedinice) koji nastaju oksidativnom polimerizacijom monolignola odnosno hidroksicimetnih alkohola: koniferilnog, sinapilnog i *p*-kumarilnog. Monolignoli nastaju kao produkt tri biosintetska puta koji se nazivaju šikiminski, fenilpropanoidni i specifični monoligninski put (Faraj i sur., 2018).

1.2.1. Fenilalanin amonij-liaza (PAL)

L-fenilalanin jedna je od esencijalnih aminokiselina koju sisavci ne mogu sintetizirati, dok se u biljkama i gljivama ona sintetizira putem šikiminske kiseline. Tako nastali L-fenilalanin biljke koriste za izgradnju proteina ili dalje metaboliziraju fenilalaninskim putem (Hyun, 2011).

Fenilalanin amonij-liaza je enzim koji katalizira ne oksidativnu deaminaciju L-fenilalanina u trans-cimetnu kiselinu uz oslobađanje amonijeveg iona (de Jong i sur. 2015). Konverzija fenilalanina u trans-cimetnu kiselinu označava mjesto prelaska iz primarnog u sekundarni metabolizam biljaka. Sam enzim je pronađen u velikom broju biljaka, uključujući i određene alge te u gljivama i u nekoliko prokariotskih organizama. Sama veličina enzima i sastav podjedinica ovoga enzima varira ovisno o organizmu iz kojega je izoliran (Hyun, 2011).

1.2.2. 4-kumarin-CoA ligaza (4CL)

Jedan od glavnih enzima u fenilpropanoidnom putu i posebno važnih za sintezu monolignola je 4-kumarin-CoA ligaza. Ona katalizira nastanak *p*-kumarin-CoA, prekursora u sintezi *p*-kumarinskog i koniferilnog alkohola. Osim što je važan za sintezu

lignina p-kumarin-CoA važan je i za nastanak drugih metabolita u biljkama poput flavonoida (Boudet, 2007; Lan i sur. 2015). Aktivnost 4CL enzima povećana je u procesu nastajanja drveta te povećana aktivnost ovoga enzima dovodi do povećanja količine p-hidroksifenolnih jedinica u ligninu (Rao i sur. 2019).

1.2.3. Reduktaza cinamoil koenzima A (CCR)

Posljednju etapu modifikacije specifičnog puta predstavlja redukcija hidroksicimetnih estera koenzima A do monolignola. Prvi enzim tog puta je reduktaza cinamoil koenzima A (CCR). Ovaj enzim je specifični enzim ovoga puta i ključan je za regulaciju ulaska fenilpropanoidnih metabolita (Bewg i sur., 2017). On katalizira reakciju prelaska hidroksicimetnih estera koenzima A u hidroksi cimetne aldehide koji se u posljednjoj etapi prevode u alkohole, to jest monolignole: koniferilni, sinapilni i *p*-kumarilni.

1.3. Celuloza sintetaza (CesA)

Biljke, za razliku od životinja, imaju specifično građenu staničnu stijenku. Stanična stijenka je u velikoj mjeri sačinjena od celuloze, koja sačinjava skoro 50% ukupne mase stanične stijenke. Važnost celuloze kod biljaka pokazuje i to da je celuloza najčešći prirodni polimer kojeg godišnje nastane oko 1 milijarde tona godišnje. Stanična stijenka kod biljaka histološki je podijeljena na primarnu staničnu stijenku, koja se najviše sastoji od celuloze, hemiceluloze i pektina te sekundarnu staničnu stijenku koja se uglavnom sastoji od celuloze i lignina. Za razliku od ostalih ugljikohidratnih dijelova stanične stijenke, čije se podjedinice sintetiziraju u Golgijevom aparatu te potom prenose u staničnu stijenku (Geisler i sur., 2008), celuloza se sintetizira na samoj plazmatskoj membrani uz pomoć celuloza sintetaza kompleksa (CesA) (McKinley, 2016). Zbog toga što se celuloza nalazi i u primarnoj i u sekundarnoj staničnoj stijenci, ali je i važna za povezivanje drugih sastojaka stanične stijenke te je zbog toga pokazano da se ekspresijom *CesA* gena može pratiti i ko-ekspresija gena koji su zaduženi za ekspresiju drugih gena u staničnoj stijenci (Bagniewska-Zadworna i sur. 2015).

1.4. Ječam

Ječam (*Hordum vulgare* L.), rod *Hordeum*, pripada porodici trava (*Poaceae*) koja je jedna od najbrojnijih porodica na zemlji te zauzima oko 20% ukupnog biljnog pokrova na Zemlji (Jacobs i sur., 1999). U ovu porodicu ubrajamo i druge predstavnike žitarica poput kukuruza,

pšenice i riže koji su vrlo važni za ishranu ljudi i životinja. Vrsta *Hordeum vulgare* dijeli se u dvije podvrste: *Hordeum vulgare* spp. *spontaneum* (C. Koch) Thell. divlji predak ječma te *Hordeum vulgare* L. spp. *vulgare*, kultivirani ječam. Kod obje podvrste broj kromosoma je jednak i iznosi $2n=2x=14$. Ječam je jednogodišnja biljka koja je građena od nodija i internodija i prosječna visina mu je od 60 – 120 cm (Denffer i Zegler, 1982). Rast stabljike ječma, kao i ostalih jednosupnica, je karakterističan i odvija se u bazalnom dijelu nodija i rukavcu lista. Odrasla stabljika se sastoji od glavnog izdanka i 2 – 5 bočnih izdanaka stabljike. Najviši nodij na stabljici nosi klas. Stabljika ječma na poprečnom prerezu je okrugla i šuplja s provodnim snopićima koji su raspoređeni u dva reda.

1.5. Cilj rada

Sadržaj lignina i celuloze koji se nalazi u staničnoj stijenci odgovoran je za čvrstoću i elastičnost stabljike ječma što ujedno predstavlja važno agronomsko svojstvo.

Cilj ovoga rada bio je :

1. Analizirati ekspresiju gena koji sudjeluju u biosintezi lignina: fenilalanin amonij-liaza (*PAL*), 4-kumarin-koenzim A ligaza (*4CL*) i reduktaza cinamoil koenzima A (*CCR*).
2. Analizirati ekspresiju gena za celuloza sintetazu (*CesA*) koja sudjeluje sintezi celuloze.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal i uzorkovanje

Biljni materijal uključivao je tri kultivara ječma jarog ječma (*Hordeum vulgare* L.) Titan i Predator i Osvit. Uzorke stabljika skupljene su u vegetacijskoj sezoni 2019. na pokusnim poljima Poljoprivrednog instituta Osijek u Osijeku u fazi nalijevanja zrna. Sorte su posijane na parcelama veličine 7,56 m² s normom sjetve od 450 zrna/m², raspoređene prema slučajnom blok rasporedu. Sa svake parcelice, ukupno tri, uzeto je po 20 biljaka od svakog kultivara. Stabljike su očišćene listova i pohranjene na -80°C za daljnje analize.

2.2. Izolacija RNA

U sterilne tubice dodano je oko 50 mg tkiva homogenog uzorka stabljike koje je potom smrznuo u tekućem dušiku i macerirano sa štapićima za maceraciju. U macerirano tkivo potom je dodano 500 µL NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL) i 200 µL DEPC vode. Potom su uzorci snažno mućkani rukom oko 15 sekundi te inkubirani na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12 000 g i 4°C. Nakon centrifugiranja 500 µL vodene faze preneseno je u nove tubice i precipitirano dodatkom 200 µL 75% etanola, potom su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon inkubacije uzorci su ponovno centrifugirani 10 minuta na 12 000 g i 4 °C. Dobiveni talog ispran je sa 200 µL 75% etanola (v/v) u DEPC vodi, ponovo centrifugirani te je iz njih uklonjen supernatant, a talog je osušen na zraku. Dobiveni talog je otopljen u 10 µL DEPC vode te je izmjerena koncentracija RNA na nanospektrofotometru (IMPLEN) koristeći 1 µL uzorka i DEPC vodu kao slijepu probu.

2.4. Sinteza cDNA

Prije sinteze cDNA uzorci RNA tretirani su s DNazom (RQ1 DNaza, Promega) prema protokolu proizvođača. Na uzorak koji je sadržavao 1 µg RNA dodano je 1 µL 10x reakcijskog pufera, 1 µL DNaze (1 U/ µL) i DEPC vode do 10 µL. Uzorci su inkubirani na 37°C 30 minuta, a nakon toga je u uzorke dodano 1 µL RQ1 DNaza stop otopine (20mM EGTA, pH 8.0) te su inkubirani na 65°C kako bi se inaktiviralo DNazu.

Obrnuto prepisivanje (engl. *reverse transcription*) provedeno je prema protokolu proizvođača koristeći PrimeScript RT reagent Kit (Takara) i 500 ng RNA prethodno tretiranoj DNazom. Reakcija sinteze cDNA odvijala se 15 minuta na 37°C, potom 5 sekundi na 85°C. cDNA je pohranjeni na -20°C do daljnjeg korištenja.

2.5. Izrada početnica

Analiza ekspresije gena provedena je na genima *PAL*, *4CL*, *CCR*. Za analizu ekspresije gena koji sudjeluju u biosintezi celuloze korišten je gen za katalitičku podjedinicu celuloza sintetaze (*CESA*). Za kontrolu ekspresije korišten je gen za ADP-ribozilacijski faktor 1 (*ADP*) koji pripada skupini konstitutivnih gena (engl. *housekeeping genes*) čija je ekspresija konstantna odnosno ne mijenja se u ovisnosti o eksperimentalnim uvjetima (Ferdous, 2015).

Početnice su izrađene na temelju sljedova istraženih gena pohranjenih u bazi EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) pod pristupnim brojevima: Z49147.1 za *HvPAL*, KF442977.1 za *Hv4CL*, AY149607 za *HvCCR*, AY483150.1 za *HvCESA* te AJ508228 za *HvADP*.

Početnice su dodatno provjerene programom Primer3Plus (Untergasser i sur., 2007) i njihove sekvence nalaze se u tablici 1. Početnice su otopljene u sterilnoj ultra čistoj vodi u početnoj koncentraciji od 100 μ M i razrijeđene do 10 μ M. Sve otopine su čuvane na -20°C.

Tablica 1. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih u reakcijama PCR i qPCR.

Naziv gena	Uzvodna početnica (F) 5'→3'	Nizvodna početnica (R) 5'→3'	Veličina PCR produkta (pb)
<i>HvPAL</i>	CTTCTGCGAGGTGATGAATG	AGCTGCCTTCAAGAATGTGC	119
<i>Hv4CL</i>	ATCGCTGAAGGACGATCTTG	TCGGTGATTTTCAGAGCCTTC	75
<i>HvCESA</i>	TGTGGCATCAACTGCTAGGAAA	CGTACAAAGTGCCTCATAGGAAA	267
<i>HvCCR</i>	GAAGCAGCCTTACAAGATGTCC	TCGTACAACGACGTCTACACC	83
<i>HvADP</i>	GCTCTCCAACAACATTGCCAAC	GAGACATCCAGCATCATTCATTCC	77

Za provjeru kvalitete početnica korištena je lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*). Za PCR reakcije korišten je EmeraldAmp GT PCR Mix (Takara) te uzvodne i nizvodne početnice za odabrane gene. Korišteno je 2 μ L cDNA kalupa uzorka u konačnom volumenu od 20 μ L. Negativna kontrola sadržavala je odgovarajući volumen sterilne destilirane vode umjesto kalupa. Reakcija PCR-a (Applied biosystems) se odvijala na ovaj način: inicijalna denaturacija na 95°C 5 minuta, 35 ciklusa denaturacije na 98°C 10 s, prijanjanje početnica na 60°C 30 s, produljivanje lanaca na 72°C u trajanju 3 minute i hlađenje na 4°C.

2.6. Analiza ekspresije gena

Ekspresija gena u ječmu mjerena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*, *quantitative RT-PCR*, qRT-PCR).

Prije analize ekspresije gena uključenih u biosintezu lignina određena je efikasnost vezanja početnica na kalup (Pfaffl, 2004) na temelju nagiba amplifikacijske krivulje u eksponencijalnoj fazi u tri različite reakcije. Vrijednosti efikasnosti kretala se od 95-110% (Bustin, 2004). Iz nagiba pravca izračunata je efikasnost (E) prema formuli (Higuchi i sur. 1993):

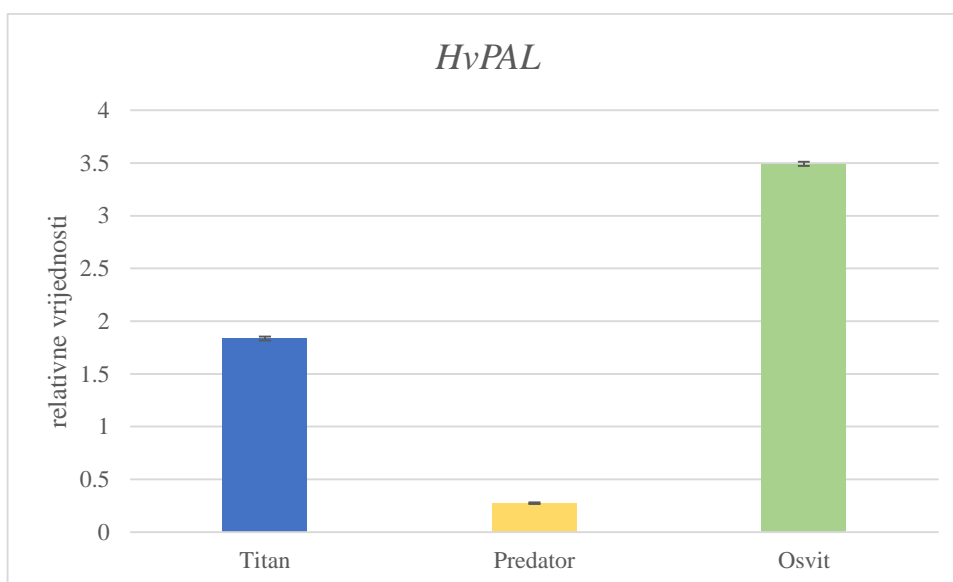
$$E = 10^{\text{nagib pravca} - 1}$$

Za mjerenje ekspresije gena korišten je isti sastav reakcijske smjese kao i za mjerenje efikasnosti. Na optičku mikrotitarsku pločicu sa 96 bunarića nanesen je svaki uzorak u triplikatu za svaki od gena i za negativnu kontrolu u koju je dodana sterilna ultra čista voda u istom volumenu kao i cDNA. Unutar svakog bunarčića se nalazilo 60 ng cDNA, odnosno 2 μL uzorka koncentracije 30 ng/ μL . Sve reakcije qRT-PCR, i one za mjerenje efikasnosti i one za određivanje ekspresije gena provedene su na StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) pri istim uvjetima: početna denaturacija na 95°C 10 min, 40 ciklusa denaturacije na 95°C 15 s, sparivanje početnica i produljivanje lanaca na 60°C 1 min. Nakon 40 ciklusa produljivanja lanaca slijedio je korak mjerenja krivulje taljenja kako bi se ustvrdilo dolazi li do nastanka nespecifičnih produkta. Za izračun ekspresije gena korištena je metoda relativne kvantifikacije (Pfaffl, 2004).

3. Rezultati

Na sintezu i ulaganje lignina i celuloze u staničnu stjenku, uz utjecaj čimbenika iz okoliša, utječe i sam genom biljke. Za ovo istraživanje korišteni su geni *PAL*, *4CL*, *CCR* koji sudjeluju u sintezi monolignolskih podjedinica te gen *CesA* koji je važan u sintezi celuloze. Enzim PAL prvi je enzim koji je važan za sintezu lignina i čini prijelaz iz primarnog u sekundarni metabolizam. Enzimi 4CL i CCR su enzimi koji kataliziraju nastanak kumarinskog alkohola. Ekspresija gena izmjerena je u stabljikama u četiri kultivara jarog ječma: Titan, Predator i Osvit u fazi nalijevanja zrna. Normalizacija je napravljena u odnosu na gen *ADP*.

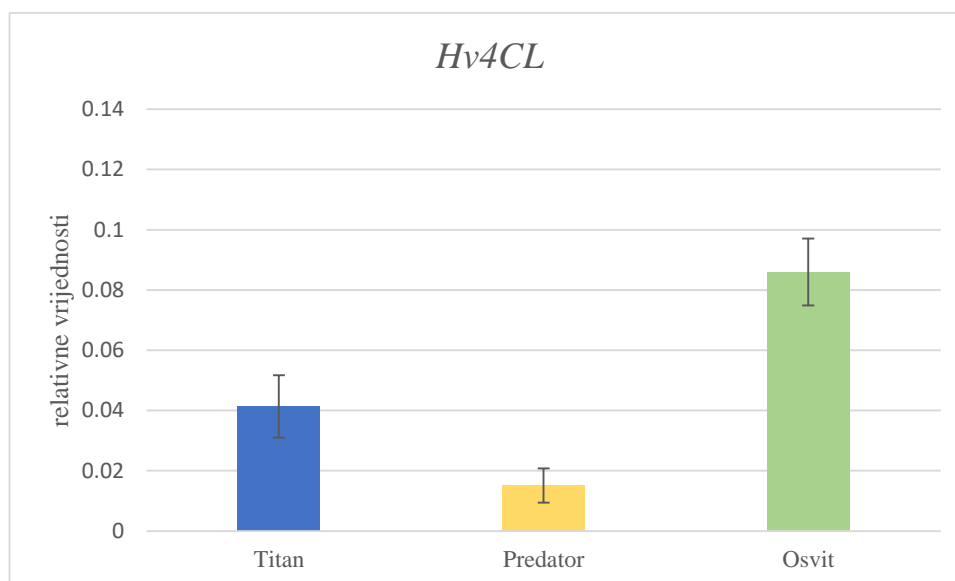
Ekspresija gena za fenilalanin amonij-liazu (*HvPAL*) veća je za otprilike 3,5 puta u odnosu na ekspresiju gena za ADP-ribozilacijski faktor kod kultivara Osvit. Kultivar Titan pokazuje nešto manju razinu ekspresije *HvPAL* te je ona kod njega 1,8 puta veća od ekspresije *ADP*. Ekspresija gena *HvPAL* u odnosu na ekspresiju *ADP* najmanja je kod kultivara Predator (Slika 1). Ekspresija ovoga gena je veća i u odnosu na sve ostale gene jer je PAL enzim koji katalizira nastanak cimetne kiseline koju biljke koriste i u sintezi drugih sekundarnih metabolita, a ne samo lignina.



Slika 1: Ekspresija gena fenilalanin amonij-lijaza (*HvPAL*) u kultivarima Titan, Predator i Osvit u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti.

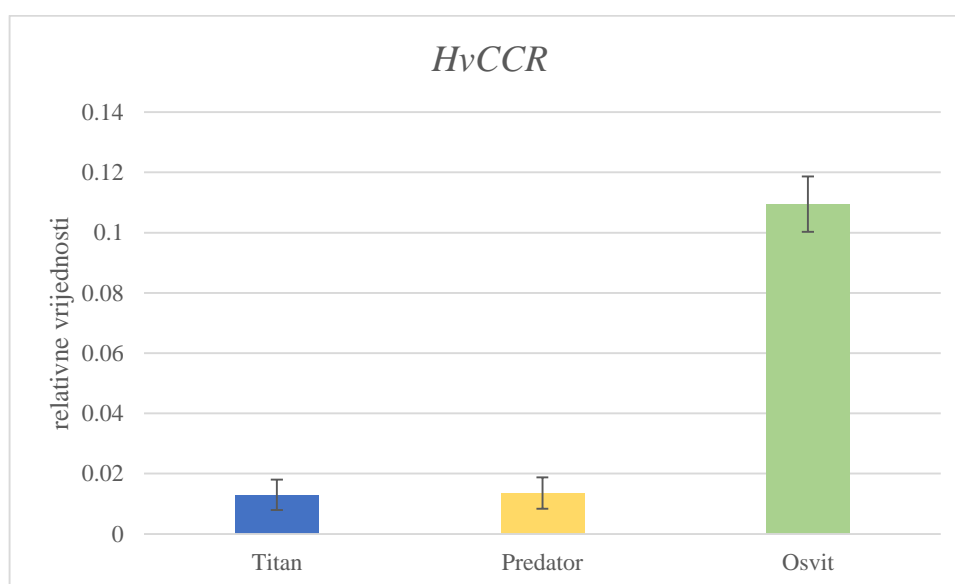
Za gene koji pokazuju ekspresiju koja je veća više od 2 puta od konstitutivnog gena, u ovome slučaju *ADP* smatramo da ona nije velika (Nguyen i sur., 2016).

Ekspresija gena *Hv4CL* u vrlo je niska u sva tri kultivara jarog ječma. Najniža je u kultivaru Predator (Slika 2).



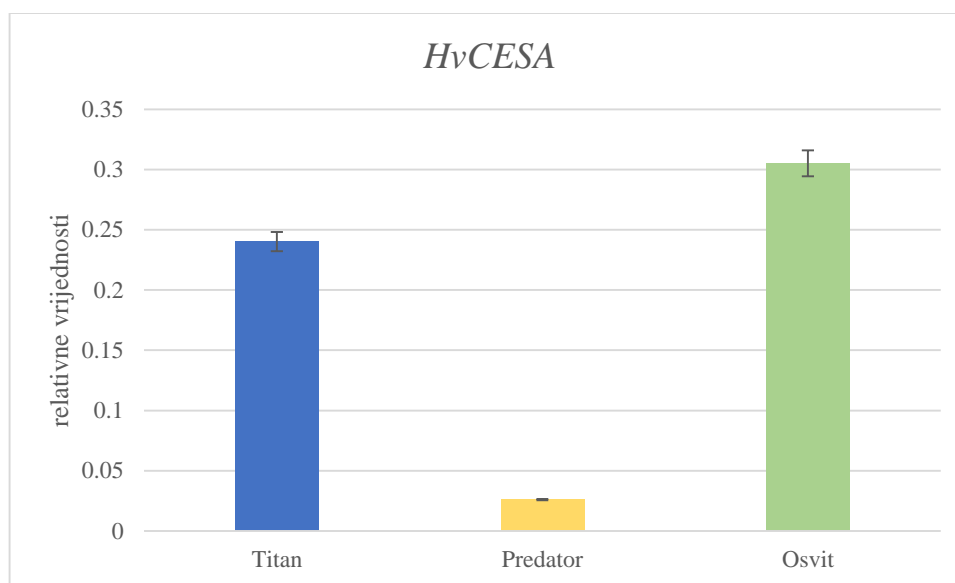
Slika 2: Ekspresija gena za 4-kumarin-koenzimA ligazu (*Hv4CL*) u kultivarima Titan, Predator i Osvit u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti.

Ekspresija gena za reduktazu cinamoil koenzima (*HvCCR*) je također niska u sva tri kultivara jarog ječma: Titan, Predator i Osvit (Slika 3). Najniža ekspresija uočava se kod kultivara Titan i Predator.



Slika 3: Ekspresija gena za reduktazu cinamoil koenzima A (*HvCCR*) u kultivarima Titan, Predator i Osvit u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti.

Ekspresija gena za celuloza sintetazu (*HvCesA*) u također je niska kod sva tri kultivara, ali s nešto većim relativnom vrijednostima u odnosu da gene *HvCCR* i *Hv4CL* (Slika 4).



Slika 4: Ekspresija gena za celuloza sintetazu (*HvCESA*) u kultivarima Titan, Predator i Osvit u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti.

4. Rasprava

Jedan od važnijih segmenata razvoja biljke i diferencijacije biljnih stanica i tkiva je proces lignifikacije, odnosno proces ulaganja lignina u staničnu stijenku. Istraživanja na temu ulaganja i sinteze lignina uglavnom su rađena na golosjemenjačama, zbog njihove važnosti u drvenoj industriji, te na dvosupnicama poput duhana. Proces lignifikacije posebno je istražen kod uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) kao modelnog organizma u istraživanjima biokemijskih i molekularnih mehanizama kod biljaka (Ji i sur., 2015). Kod jednosupnica lignifikacija je posebno istražena kod porodice trava i to ponajviše kod riže, kukuruza i pšenice zbog njihove važnosti u poljoprivredi (Jannoey i sur. 2017; del Rio i sur. 2018).

Za proučavanje utjecaja jednog ili više gena koji su zaduženi za sintezu najčešće se koriste tehnike primjene „antisense“ RNA, kojom se u stanicu unose analogni oligonukleotidi koji sprječavaju prepisivanje RNA molekula, te uvođenje mutacija u gene koje potom uzrokuju utišavanje ili pojačavanje ekspresije određenog gena (Rao i sur. 2019; Ji i sur., 2015).

Primjena ovih tehnologija omogućile su uvid u uloge enzima te regulaciju njihove transkripcije i translacije te njihov utjecaj na nastanak ligninskog polimera (Liu i sur. 2018).

Zbog toga što fenilalanin amonij-lijaza (PAL) predstavlja početak sekundarnog metabolizma povišena ekspresija koja je uočena kod sva tri kultivara jarog ječma Titan, Predator i Osvit, može biti uzrokovana povećanom potrebom za sekundarnim metabolitima koji su važni za biljku u fazi nalijevanja zrna (Rao i sur. 20019; Cass i sur. 2015). *HvPAL* pokazuje puno veću ekspresiju u odnosu na ostale analizirane gene zbog toga što se produkti ovoga gena koriste u sintezi i ostalih sekundarnih metabolita, a ne samo lignina. Još jedan od razloga je i to što je PAL prvi enzim u sintezi lignina i stvara supstrate za ostale nizvodne enzime u kaskadi nastanka lignina.

4-kumarin-koenzimA ligazu (4CL) nalazi se u metaboličkom putu na mjestu grananja u kojemu se metaboliti usmjeravaju ili u sintezu lignina ili u ostale fenilpropanoid biosintetske puteve (Faraji i sur., 2018). Njegov položaj u biosintezi lignina omogućava direktno usmjeravanje metabolita u sintezu *p*-hidroksifenilnih (H) ili preusmjeravanje u sintezu gvajacilnih (G) ili siringilnih (S) podjedinica. Velika ekspresija *Hv4CL* može biti i uzrokovana velikom ekspresijom *HvPAL*, odnosno velikom produkcijom metabolita iz fenilpropanoidnog puta za koju je zaslužan PAL (Rao i sur., 2019).

Ekspresija gena za reduktazu cinamoil koenzima A (*HvCCR*) gena nešto je manja u odnosu na ostale gene koji kodiraju enzime koji su važni za sintezu lignina. CCR je enzim koji se nalazi u na samom kraju biosintetskog puta lignina i predstavlja odlučujući korak u kojemu se sekundarni metaboliti prevode u ligninske monomere (Bewg i sur., 2017). Zbog svog položaja u biosintezi CCR predstavlja kontrolnu točku koja određuje količinu metabolita koji će biti prevedeni u lignin (Guerriero i sur. 2016). Ekspresija *CCR* gena je vjerojatno manja zbog toga što je biljka u kasnijim razvojnim stadijima (faza nalijevanja zrna) te su se tkiva već diferencirala i ugradila lignin u svoje stijenke pa nema potrebe za velikom sintezom lignina te se većina sekundarnih metabolita, nastalih uz pomoć PAL i 4CL, odlazi u druge biosintetske puteve koji su važni za nalijevanje zrna (Bewg i sur. 2017).

Velika ekspresija gena za sintezu celuloze, *HvCESA* karakteristična je za rane stadije razvoja. Dok se stanice nisu u potpunosti diferencirale, to jest dok nisu razvili dovoljno čvrstu sekundarnu staničnu stijenku, ekspresija gena za celulozu je vrlo visoka. Kada se stanice diferenciraju i kada biljka postigne veličinu odrasle biljke ekspresija gena za sintezu celuloze se smanjuje (McKinley, 2016). Ekspresija gena *HvCesA* u tri kultivara jarog ječma povezana je sa genima za ekspresiju lignina te pokazuje sličnu razinu ekspresije (Slika 2,3 i 4). Dobiveni rezultati ukazuju da su tri kultivara jarog ječma: Titan,

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju ukazuju da su odabrani kultivari imali dovoljno razvijenu i lignificiranu sekundarnu staničnu stijenku te je ekspresija ispitivanih gena niska što je u skladu s istraživanjima u kojima je pokazano da nakon nekog vremena ekspresija ovih gena značajno se smanjuje te oni ostaju staju eksprimirani u znatno manjim količinama (Bagniewska-Zadworna i sur. 2015; McKinley, 2016).

5. Zaključak

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je ekspresija gena *PAL*, *4CL*, *CCR* i *CesA* između tri kultivara jarog ječma: Titan, Predator i Osvit, različita u odnosu na referentni gen (*ADP*). Ekspresija svih gena u odnosu na ekspresiju *ADP* je najviša kod kultivara Osvit. Nešto manju ekspresiju testiranih gena u odnosu na referentni gen pronalazimo kod kultivara Titan. Najmanju ekspresiju gena za sintezu lignina i celuloze, u odnosu na referentni gen pronalazimo kod kultivara Predator.

6. Literatura

- Bagniewska-Zadworna, A., Stelmasik, A. (2015) Root heterogeneity and developmental stage determine the pattern of cellulose synthase and cinnamyl alcohol dehydrogenase gene expression profiles during xylogenesis in *Populus trichocarpa* (Torr. Et gray). *International Journal of Plant Sciences*, 176: 458-467.
- Beckham, G. T., Johnson, C. W., Karp, E. M., Salvachúa, D., Vardon, D. R. (2016) Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 40-53.
- Bewg, W. P., Coleman, H. D. (2017) Cell wall composition and lignin biosynthetic gene expression along a developmental gradient in an Australian sugarcane cultivar. *PeerJ*, 5, e4141.
- Bonawitz, N. D., Chapple, C. (2012) Can genetic engineering of lignin deposition be accomplished without an unacceptable yield penalty? *Current Opinion in Biotechnology* 24: 336-343.
- Boudet, A. M. (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722–2735.
- Bustin, S. A. (2004) AZ of quantitative PCR. International University Line.
- Cass, C. L., Peraldi, A., Dowd, P. F., Mottiar, Y., Santoro, N., Karlen, S. D., Moskvin, O. V. (2015) Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. *Journal of Experimental Botany* 66: 4317-4335.
- Cesarino, I., Araujo, P., Sampaio Mayer, J. L., Paes Leme, A. F., Mazzafera, P. (2012) Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. *Plant Physiology and Biochemistry* 55: 66-76.
- de Jong, F., Hanley, S. J., Beale, M. H., Karp, A. (2015) Characterisation of the willow phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene family reveals expression differences compared with poplar. *Phytochemistry* 117: 90-97.
- del Río, J. C., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Kim, H., Ralph, J. (2018) Structural characterization of lignin from maize (*Zea mays* L.) fibers: evidence for diferuloylputrescine incorporated into the lignin polymer in maize kernels. *Journal of agricultural and food chemistry* 66: 4402-4413.
- Denffer, D., Ziegler, H. (1982) *Morfologija i fiziologija*. Školska knjiga, Zagreb.
- Faraji, M., Fonseca, L. L., Escamilla-Treviño, L., Barros-Rios, J., Engle, N., Yang, Z. K., Voit, E. O. (2018) Mathematical models of lignin biosynthesis. *Biotechnology for biofuels* 11: 34.
- Geisler, D. A., Sampathkumar, A., Mutwil, M., Persson, S. (2008) Laying down the bricks: logistic aspects of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11:647–652.

- Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., Siddiqui, K. S. (2016) Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences* 16: 1-16.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. Y., Kim, S. H. (2011) Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology*, 39: 257-265.
- Jacobs, B. F., Kingston, J. D., Jacobs, L. L. (1999) The origin of grass-dominated ecosystems. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86:590-643.
- Jannoey, P., Channei, D., Kotcharerk, J., Pongprasert, W., & Nomura, M. (2017) Expression analysis of genes related to rice resistance against brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Rice Science* 24: 163-172.
- Ji, H., Wang, Y., Cloix, C., Li, K., Jenkins, G. I., Wang, S., Li, X. (2015) The Arabidopsis RCC1 family protein TCF1 regulates freezing tolerance and cold acclimation through modulating lignin biosynthesis. *PloS genetics* 11:9, e1005471.
- Lan, W., Lu, F., Regner, M., Zhu, Y., Rencoret, J., Ralph, S. A., Ralph, J. (2015) Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification. *Plant Physiology* 167: 1284-1295.
- Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018) Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 335.
- McKinley, B., Rooney, W., Wilkerson, C., Mullet, J. (2016) Dynamics of biomass partitioning, stem gene expression, cell wall biosynthesis, and sucrose accumulation during development of *Sorghum bicolor*. *The Plant Journal* 88: 662-680.
- Pfaffl, M. W. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR* 1: 89-113.
- Rao, X., Chen, X., Shen, H., Ma, Q., Li, G., Tang, Y., Xiao, X. (2019). Gene regulatory networks for lignin biosynthesis in switchgrass (*Panicum virgatum*). *Plant Biotechnology Journal*, 17:580-593.