

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Lidija Begović

**ANATOMSKI, FIZIOLOŠKI I MOLEKULARNI BILJEZI
LIGNIFIKACIJE U RAZVOJU STABLJIKE JAROG JEČMA
(*Hordeum vulgare* L.)**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Lidija Begović

**ANATOMSKI, FIZIOLOŠKI I MOLEKULARNI BILJEZI
LIGNIFIKACIJE U RAZVOJU STABLJIKE JAROG JEČMA
(*Hordeum vulgare* L.)**

Doktorski rad predložen je
Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske
interdisciplinarne doktorske studije
radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti
na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom
studiju Molekularne bioznanosti - modul biologija biljaka

Osijek, 2013.

Doktorski rad je izrađen u sklopu znanstvenih projekata Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske:

"Stanična i tkivna diferencijacija tijekom razvoja biljnih organa" (073-0731674-0841) kojeg je voditelj izv. prof. dr. sc. Vera Cesar, *"Faktori i biljezi embriogenog potencijala i fenolnog metabolizma u biljkama"* (119-1191196-1225) kojeg je voditelj akademkinja prof. dr. sc. Sibila Jelaska, *"Fiziologija stresa i gospodarska svojstva različitih kultivara pšenice i ječma"* (073-0731674-0552) kojeg je voditelj dr. sc. Josip Kovačević, znanstveni savjetnik, *"Utjecaj oksidativnog stresa na organizaciju i funkciju biljnih stanica i tkiva"* (073-0731674-1673) kojeg je voditelj izv. prof. dr. sc. Hrvoje Lepeduš.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

**ANATOMSKI, FIZIOLOŠKI I MOLEKULARNI BILJEZI LIGNIFIKACIJE
U RAZVOJU STABLIKE JAROG JEČMA (*Hordeum vulgare* L.)**

Lidija Begović

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Laboratoriju za kulturu biljnih stanica i tkiva Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor/i: dr.sc. Vera Cesar, izvanredni profesor
dr.sc. Dunja Leljak-Levanić, docent

Kratki sažetak doktorskog rada:

U ovom radu istraživana je proces lignifikacije u stabljici tri sorte jarog ječma (*Hordeum vulgare* L.) tijekom razvojnih faza: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba. Istraživanje je obuhvatilo histokemijske analize i lokalizaciju lignina, kao i anatomske promjene povezane s ulaganjem lignina u staničnu stijenku u internodijima stabljike. Određen je sadržaj lignina, celuloze i ukupnih topljivih fenola, te aktivnost peroksidaza i ekspresija gena koji sudjeluju u biosintezi lignina. Ulaganje lignina u staničnu stijenku povećava se kroz razvojne faze. Histokemijske analize lignina i anatomska istraživanja pokazuju da najviše lignina sadrže stanične stijenke u području kore sklerenhimskog prstena u sva tri internodija tijekom razvoja. Sadržaj ukupnog lignina i ukupnih topljivih fenola raste tijekom razvoja i najviši je u fazi zriobe. Enzimska aktivnost peroksidaza najveća je u prvim internodijima istraživanih sorti, a mjesta aktivnosti peroksidaza *in situ* kolokaliziraju s ligninom. Ekspresija gena za reduktazu cinamoil koenzima A (*HvCCR*) i dehidrogenazu cinamilnog alkohola (*HvCAD*) u internodijima stabljike ječma raste tijekom razvoja te postiže maksimum u fazi cvatnje. Promjene povezane s procesom lignifikacije u stabljici tijekom četiri razvojne faze pokazuju povezanost između anatomske, fiziološke i molekularne promjene čije međudjelovanje utječe na sadržaj lignina kao i njegovo ulaganje u staničnu stijenku. Također važno je naglasiti i utjecaj genotipa i okolišnih čimbenika na određivanje dinamike sinteze i ulaganja lignina u staničnu stijenku. Rezultati ovog istraživanja doprinose cjelovitom sagledavanju biokemijskih i molekularnih promjena koje prate ulaganje lignina u stijenke stanica stabljike ječma.

Broj stranica: 173

Broj slika: 61

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 191

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: lignin, ječam, stabljika, stanična stijenka, aktivnost peroksidaza, ekspresija gena

Datum obrane: 16.04.2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. Branka Salopek Sondi, znanstveni savjetnik
2. dr.sc. Vera Cesar, izvanredni profesor
3. dr.sc. Dunja Leljak-Levanić, docent
4. dr.sc. Zdenko Lončarić, redovni profesor
5. dr.sc. Sandra Radić Brkanac, docent
6. dr.sc. Alojzije Lalić, znanstveni savjetnik (zamjena)

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

**ANATOMICAL, PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS OF LIGNIFICATION IN STEM DEVELOPMENT OF
SPRING BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)**

Lidija Begović

Thesis performed at: Laboratory of plant cell and molecular biology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and Laboratory for plant cell and tissue culture, Department of Molecular Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Supervisor/s: PhD Vera Cesar, Associate Professor
PhD Dunja Leljak-Levanić, Assistant Professor

Short abstract:

Process of lignification in the stem of three spring barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) was studied during four developmental stages: heading, anthesis, grain filling and ripening. Histochemical analyses, lignin localization and anatomical changes related to lignin deposition in the cell wall of the stem internodes were investigated. Total lignin, cellulose and total soluble phenolics content were determined as well as peroxidase activity and expression of genes involved in the biosynthesis of lignin. Lignin deposition in the cell wall was increasing during development. Histochemical analyses of lignin and anatomical changes indicate that most of the lignin was deposited in the sclerenchyma ring in all three internodes during the development. Total lignin content and total soluble phenolics content increased during development reaching maximal value in the ripening. Enzymatic activity of peroxidases was higher in the first internodes of cultivars and their activity *in situ* colocalises with lignin. The gene expression level of cinnamoyl CoA reductase (*HvCCR*) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (*HvCAD*) increased during development and to the maximum enriched in the anthesis. Changes of the stem, related to lignification during the four developmental stages showed association between anatomical, physiological and molecular factors whose interactions affect lignin content and deposition in the cell wall. Furthermore, it is important to emphasize the effects of the genotype and environmental factors in determining the dynamics of lignin synthesis and deposition in the cell wall. Results obtained in this study contribute to comprehensive depiction of biochemical and molecular changes that accompany lignin deposition in the cell wall of barley.

Number of pages: 173

Number of figures: 61

Number of tables: 4

Number of references: 191

Original in: croatian

Key words: lignin, barley, stem, cell wall, peroxidase activity, gene expression

Date of the thesis defense: 16.04.2013.

Reviewers:

1. PhD Branka Salopek Sonđi, Scientific Advisor
2. PhD Vera Cesar, Associate Professor
3. PhD Dunja Leljak-Levanić, Assistant Professor
4. PhD Zdenko Lončarić, Full Professor
5. PhD Sandra Radić Brkanac, Assistant Professor
6. PhD Alojzije Lalić, Scientific Advisor (substitute)

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Veri Cesar i doc. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić na stručnoj pomoći i brojnim savjetima tijekom izrade i pisanja rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Alojziju Laliću s Poljoprivrednog instituta Osijek na ustupljenim uzorcima sorti ječma te korisnim sugestijama i savjetima. Također, zahvaljujem kolegi Ivanu Abičiću na pomoći.

Srdačno se zahvaljujem kolegici Kristini Majsec na susretljivosti i pomoći u radu kao i tehničarki Laboratorija za kulturi biljnih stanica i tkiva Ani Boljkovac te kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Svojim kolegicama iz Laboratorija zahvaljujem na podršci, a našoj tehničarki Kseniji Doboš na pomoći u radu.

Zahvaljujem se dr. sc. Režici Sudar voditeljici Agrokemijskog laboratorija Poljoprivrednog instituta Osijek i Stanislavu Kuharskom, dipl. ing. na pomoći prilikom priprema tkiva za analizu.

Zahvaljujem članovima povjerenstva na čitanju rada i korisnim savjetima. Također zahvaljujem svima ostalima koji su mi pomogli tijekom izrade ovog rada.

Najveća hvala mojoj obitelji na nesebičnoj podršci i razumijevanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Lignin i njegova biosinteza	5
1.2. Peroksidaze i lignifikacija	11
1.3. Utjecaj modifikacije ekspresije gena na sintezu i sastav lignina	14
1.4. Ulaganje lignina u staničnu stijenku	18
1.5. Ječam	23
1.5.1. Morfološka građa ječma	23
1.5.2. Anatomska građa ječma	24
1.5.3. Razvoj ječma	26
1.6. Cilj rada	28
2. MATERIJAL I METODE	29
2.1. Biljni materijal	30
2.2. Uzorkovanje	31
2.3. Fiksiranje i uklapanje tkiva za svjetlosnu mikroskopiju	33
2.4. Mjerenje dimenzija stanice	33
2.5. Histokemijske metode bojanja lignina	35
2.5.1. Wiesnerova reakcija – test za lignin	35
2.5.2. Maüleova reakcija	35
2.6. Bojanje safraninom i alcian plavim	36
2.7. Određivanje aktivnosti peroksidaza <i>in situ</i>	36
2.8. Priprema uzoraka za biokemijske i molekularne analize	36
2.9. Mjerenje aktivnosti gvajakol peroksidaza	37
2.10. Određivanje izoenzimskih formi gvajakol peroksidaza	38
2.11. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola Folin-Ciocalteuovim reagensom	38
2.12. Određivanje sadržaja lignina	39
2.12.1. Određivanje sadržaja Klasonovog lignina	39
2.12.2. Određivanje sadržaja lignina topljivog u kiselini	40
2.13. Određivanje sadržaja celuloze	41
2.14. Izolacija genomske DNA iz tkiva	42
2.15. Izolacija ukupne RNA iz tkiva	42
2.16. Sinteza cDNA	43
2.17. Izrada početnica	44
2.17.1. Provjera početnica lančanom reakcijom polimeraze	45

2.18.	Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	46
2.18.1.	Mjerenje efikasnosti kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu	46
2.18.2.	Mjerenje ekspresije gena <i>HvCCR</i> i <i>HvCAD</i> u ječmu	47
2.18.3.	Kvantifikacija rezultata ekspresije gena	47
2.18.4.	Elektroforeza DNA odsječaka u agaroznom gelu	48
2.19.	Statistička obrada podataka	48
3.	REZULTATI	49
3.1.	Razvojne faze ječma	50
3.2.	Lignifikacija stanične stijenske	52
3.2.1.	Histokemijski dokazi lignina	52
3.2.2.	Ulaganje lignina u staničnu stijensku	62
3.3.	Lokalizacija celuloze u stabljici ječma	68
3.4.	Gvajakol peroksidaze <i>in situ</i>	73
3.5.	Aktivnost gvajakol peroksidaza	78
3.6.	Izoenzimske forme gvajakol peroksidaza	82
3.7.	Sadržaj ukupnih topljivih fenola	84
3.8.	Sadržaj lignina	88
3.9.	Sadržaj celuloze	92
3.10.	Ekspresija gena <i>HvCCR</i> i <i>HvCAD</i> u stabljici ječma	95
4.	RASPRAVA	103
4.1.	Anatomske promjene povezane s lignifikacijom	105
4.2.	Fiziološki pokazatelji lignifikacije	111
4.3.	Uloga gena <i>HvCCR</i> i <i>HvCAD</i> u sintezi lignina stabljike ječma	120
5.	ZAKLJUČCI	125
6.	LITERATURA	128
7.	SAŽETAK	148
8.	SUMMARY	151
9.	PRILOZI	154
10.	ŽIVOTOPIS	164

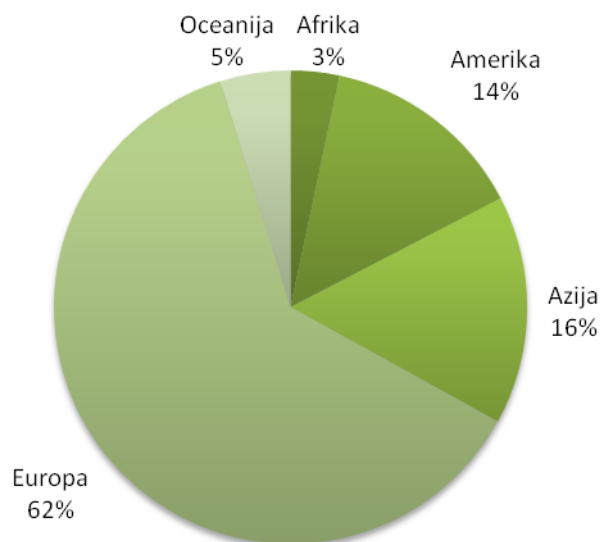
1. UVOD

Lignin je poslije celuloze jedan od najzastupljenijih prirodnih polimera na Zemlji. Uključen je u proces kruženja ugljika u prirodi i zauzima oko 30% od ukupno $1,4 \times 10^{12}$ kg ugljika koji se nalazi u biljkama (Battle i sur., 2000; Cesarino i sur., 2012). Ulaganje lignina u staničnu stijenku te njegova sinteza tijekom razvoja važni su procesi kako za biljku tako i za okoliš. Budući da lignin direktno utječe na karakteristike drveta, agronomska svojstva žitarica i kvalitetu krmnih biljaka njegova važnost za drvnu i prerađivačku industriju, te poljoprivredu dodatno naglašava značaj fenilpropanoidnog metabolizma u biljkama (Humphreys i Chapple, 2002).

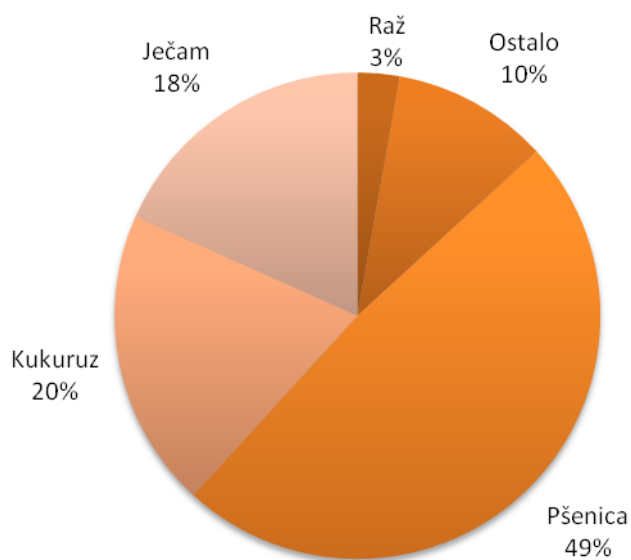
Proces lignifikacije uključuje polimerizacijske reakcije u kojima se ligninske podjedinice međusobno povezuju tvoreći složene lančaste strukture. Struktura i biosinteza lignina svakodnevno se nadopunjavaju novim saznanjima o mehanizmima regulacije i sinteze ligninskih podjedinica na molekularnoj i fiziološkoj razini pa je stoga proces lignifikacije i njegov značaj za biljku potrebno proučavati s više aspekata.

Količina lignina, njegov sastav i struktura, parametri su koji utječu na adaptivnu vrijednost biljke s ciljem selekcije genotipova i oplemenjivanja. Adaptivna vrijednost biljke (engl. *plant fitness*) definira se kao relativni uspjeh reprodukcije genotipa, a mjeri se preživljenjem, plodnošću ili drugim vitalnim parametrima (Schlindwein, 2002). U agronomiji adaptivna vrijednost biljke procjenjuje se kroz klijavost, otpornost na pesticide, preživljenje, rast, polijeganje i prinos (Pedersen i sur., 2005) te podrazumijeva ekonomski isplativu proizvodnju i stabilan prinos određene kulture.

Ječam je jedna od prvih žitarica koju je čovjek kultivirao i prilagodio za uzgoj (Badr i sur., 2000). Zauzima četvrto mjesto u proizvodnji žitarica u svijetu (slika 1) i treće u Europi (slika 2), a uzgaja se za potrebe ishrane životinja, industrije piva i ljudske prehrane. Jedna od njegovih značajnih karakteristika je sposobnost prilagodbe različitim klimatskim uvjetima što ga čini pogodnim za uzgoj od subarktičkih do suptropskih područja. Najčešće se uzgaja u područjima s umjerenom klimom.



Slika 1. Proizvodnja ječma u svijetu u razdoblju od 1992.-2010. godine izvor (FAOSTAT, 2012).



Slika 2. Udio ječma u ukupnoj proizvodnji žitarica u Europskoj uniji za 2012. godinu od ukupno 283 milijuna tona (izvor Eurostat, 2012).

Postupcima oplemenjivanja, selekcije i uzgoja do danas je proizvedeno više od tisuću sorti koje svojim karakteristikama odgovaraju zahtjevima tržišta i industrije. Razlikuju se ozime i jare sorte koje su fenotipski i genotipski prilagođene različitim klimatskim podnebljima. Ozime se siju početkom listopada, a jare u ožujku.

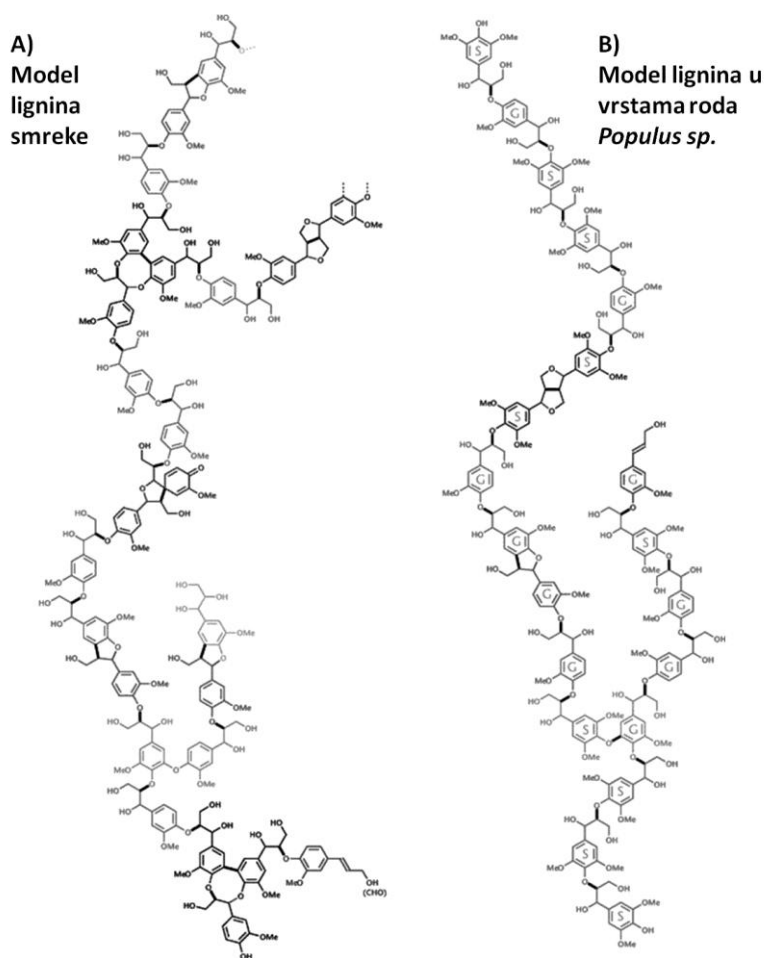
Ječam se najvećim dijelom uzgaja za ishranu stoke (85% ukupne proizvodnje), a ostatak odlazi na proizvodnju slada u pivarskoj industriji, ali i nekih drugih pića i dodataka hrani. Nekada je ječam bio više zastupljen u ljudskoj prehrani dok ga nije pretekla uporaba pšenice i riže. Danas se on još uvijek uzgaja u zemljama gdje vladaju nepovoljniji klimatski uvjeti za uzgoj pšenice (Afrika, Azija) iako postaje sve popularniji i u razvijenim dijelovima svijeta.

U Hrvatskoj proizvodnja ječma prvenstveno prilagođena je potrebama stočarstva, a manje industriji piva. U razdoblju od 2008.–2012. godine u ukupnoj proizvodnji žitarica udio ječma bio je 7,2%, od toga 12,3%, bio je udio jarog ječma (Eurostat, 2012).

Ječam kao jedna od najvažnijih žitarica predmet je brojnih istraživanja vezanih uz građu i strukturu stabljike čija čvrstoća predstavlja jedan od važnih čimbenika u selekciji i uzgoju novih sorti kako u Hrvatskoj tako i u svijetu u cilju povećanja prinosa.

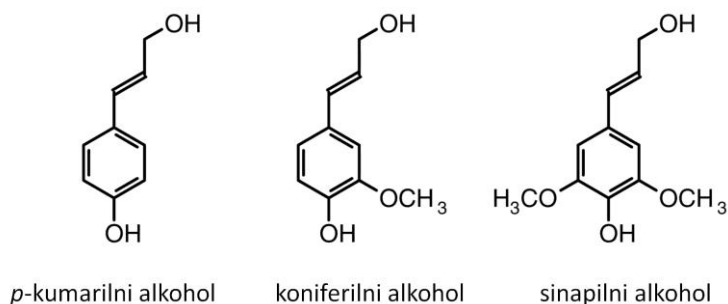
1.1. Lignin i njegova biosinteza

Za biljku, proces sinteze lignina predstavlja jedan od najvećih utrošaka energije (Amthor, 2003) iz čega se može zaključiti o važnosti ovoga procesa. U biljkama ulaganje lignina u staničnu stijenku omogućava mehaničku čvrstoću i potporu tkivu kao i transport vode duž biljke. Uloga lignina u obrani od patogena i brojnih nametnika također se pokazala vrlo važnom (Bhuiyan i sur., 2009; Jayamohan i Kumudini, 2011).



Slika 3. Hipotetski modeli ligninskog polimera iz A) smreke i B) vrsta roda *Populus sp.* Debljim linijama označene su veze među podjedinicama lignina nastale kao posljedica spajanja radikala. Lignin smreke je nešto razgranatiji u odnosu na lignin roda *Populus sp.* S – siringilne podjedinice, G – gvajacilne podjedinice. Prilagođeno prema Ralph i sur.(2007a).

Lignin (slika 3) nastaje procesom polimerizacije monolignola–hidroksicimetnih (engl. hidroxicinnamic) alkohola: *p*-kumarilnog, koniferilnog i sinapilnog koji se međusobno razlikuju u stupnju metoksilacije (slika 4).



Slika 4. Monolignoli (*p*-kumarilni, koniferilni i sinapilni alkohol) koji ulaze u sastav lignina razlikuju se u stupnju metoksilacije. Sinapilni alkohol ima dvije metoksi skupine (O-CH₃), koniferilni jednu, a *p*-kumarilni alkohol nema metoksi skupinu.

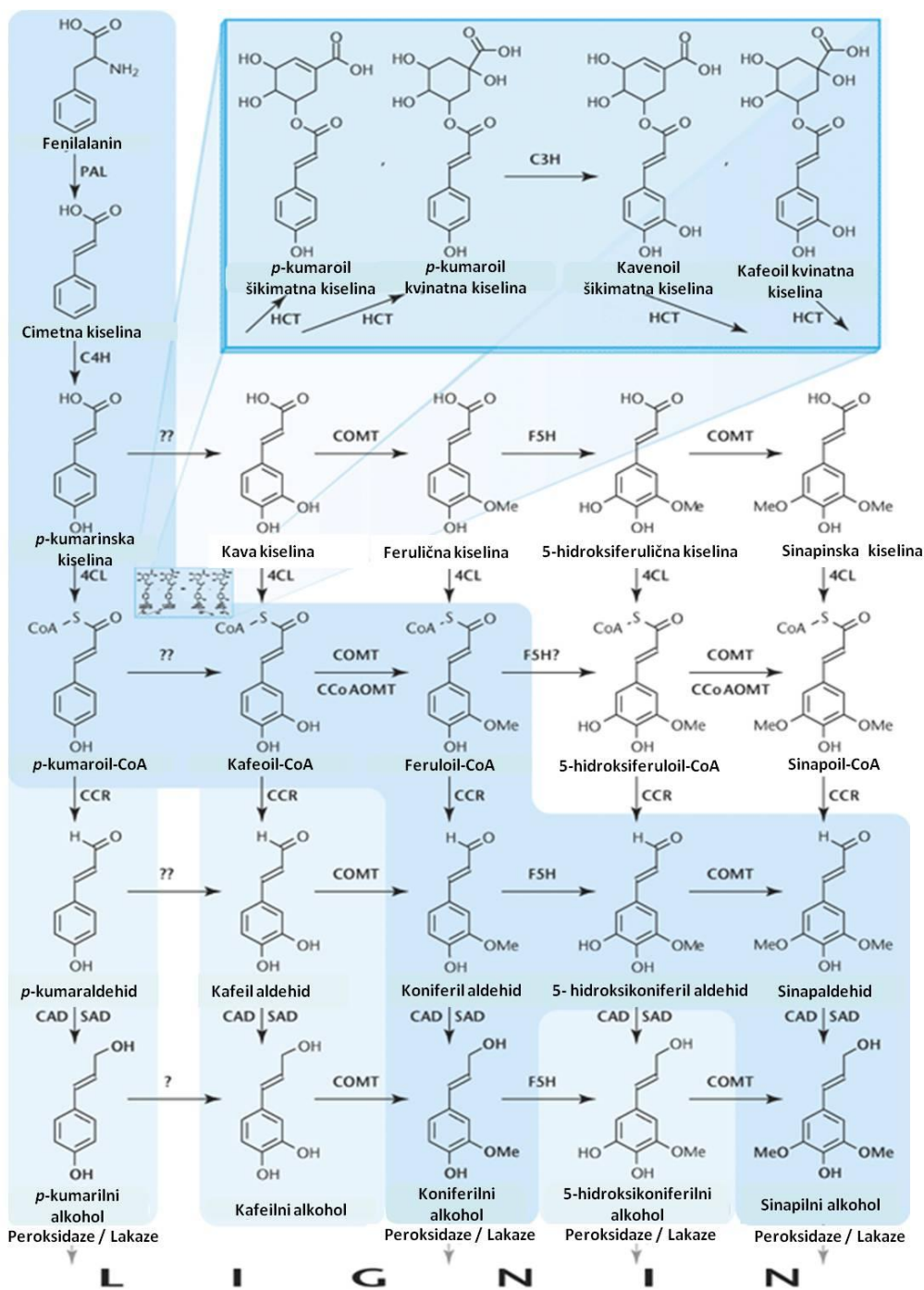
Monolignoli nastaju kao produkti tri biosintetska puta: šikimatnog, fenilpropanoidnog i specifičnog monolignolskog. Šikimatni biosintetski put završava produkcijom fenilalanina koji predstavlja ishodišnu točku za sintezu cimetne kiseline uz pomoć enzima fenilalanin-amonij lijaze (PAL, EC 4.3.1.5). PAL katalizira deaminaciju fenilalanina, što ujedno predstavlja početak fenilpropanoidnog biosintetskog puta pri čemu nastaje cimetna kiselina.

Cimetna (engl. cinnamic acid) kiselina nadalje se modificira reakcijama hidroksilacije u kojima sudjeluju cinamat 4-hidroksilaza (engl. cinnamate 4-hydroxylase; C4H, EC 1.14.13.11), *p*-kumarat 3-hidroksilaza (engl. *p*-coumarate 3-hydroxylase; C3H, EC 1.10.3.1) i ferulat 5-hidroksilaza (engl. ferulate 5-hydroxylase; F5H), te metiltransferaze: 3-*O*-metiltransferaza kavine kiseline (engl. caffeic acid *O*-methyltransferase; COMT, EC 2.1.1.68) i kafeoil-koenzim A *O*-metiltransferaza (engl. caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase; CCoAOMT, EC 2.1.1.104), pri čemu nastaju *p*-kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina (slika 5). Potom slijedi formiranje hidroksicimetnih estera koenzima A pomoću enzima 4-kumarat:koenzim A ligaze (engl. 4-coumarate:CoA ligase; 4CL, EC 6.2.1.12).

Hidroksicimentni esteri koenzima A ulaze u posljednju etapu modifikacije u kojoj se, kao dio specifičnog puta sinteze, reduciraju do monolignola. Prvi enzim u ovom putu je reduktaza cinamoil koenzima A (engl. cinnamoyl CoA reductase; CCR, EC 1.2.1.44.) koja je specifična za ovaj biosintetski put i smatra se ključnom u regulaciji ulaska fenilpropanoidnih metabolita (Barceló, 1997). Enzim CCR katalizira pretvorbu hidroksicimetnih estera koenzima A u hidroksicimetne aldehide. Sljedeća i posljednja etapa u sintezi pretvorba je aldehida u alkohole, odnosno monolignole, koju katalizira enzim dehidrogenaza cinamil alkohola (engl. cinnamyl alcohol dehydrogenase; CAD, EC 1.1.1.195).

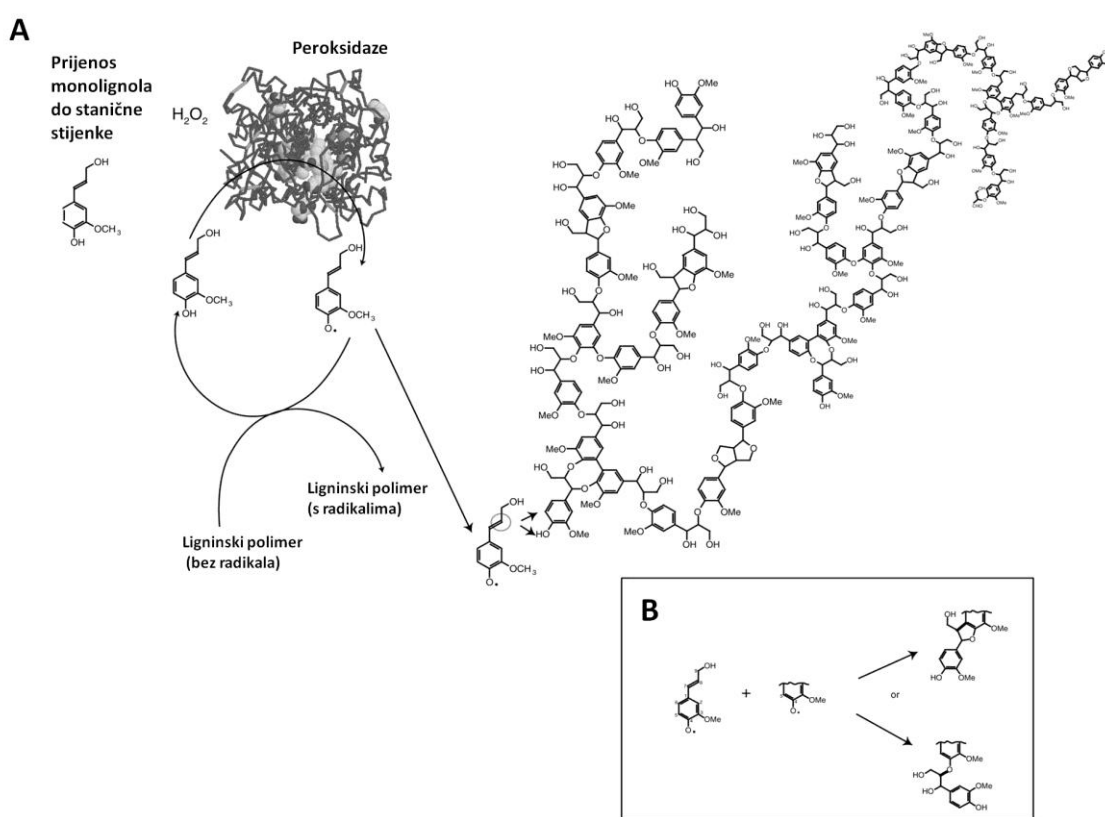
Monolignoli su nestabilni i toksični spojevi stoga se procesom glikozilacije prevode u spremišne oblike, 4-*O*- β -D-glukozide za koje je uočeno da se nakupljaju u području kambija u golosjemenjačama i nekim kritosjemenjačama (Steeves i sur., 2001). Koniferilni alkohol se konvertira u koniferin (koniferil β -D-glukozid), jedan od spremišnih oblika u golosjemenjačama, uz pomoć enzima uridin 5'-difosfoglukoza: koniferil alkohol glukozil transferaza (engl. uridine 5'-diphosphoglucose:coniferyl alcohol glucosyltransferase; UDPG:CAGT, EC 2.4.1.111), a enzim koniferin β -glukozidaza (engl. koniferin- β -glucosidase; CBG, EC 3.2.1.126) omogućava povratnu konverziju iz koniferina u koniferilni alkohol (Dharmawardhana i sur., 1995).

Način na koji se monolignoli i njihovi spremišni oblici transportiraju iz citoplazme do stanične stijenke nije u potpunosti razjašnjen. Rezultati istraživanja ukazuju da bi se ovaj proces mogao odvijati putem pasivne i olakšane difuzije te aktivnim transportom (Fagerstedt i sur., 2010).



Slika 5. Biosinteza lignina: fenilpropanoidni i specifični put sinteze monolignola. Tamnije plavom bojom označen je put sinteze lignina za koji se pretpostavlja da je dominantniji u kritosjemenjačama, a svjetlije plavom bojom označen je put koji ovisi o vrsti i uvjetima. Bijela boja označava put od kava kiseline do 5-hidroksiferuloil-CoA i sinapoil-CoA koji nema značajnu ulogu u sintezi lignina. Kratice enzima i simboli: PAL (fenilalanin amonij lijaza), C4H (cinamat 4-hidroksilaza), C3H (*p*-kumarat 3-hidroksilaza), COMT(3-*O*-metiltransferaza kava kiseline), F5H (ferulat 5-hidroksilaza), 4CL (4-kumarat:koenzim A ligaza), CCoAOMT (kafeoil koenzim A *O*-metiltransferaza), CCR (reduktaza cinamoil koenzima A), CAD (dehidrogenaza cinamilog alkohola), SAD (dehidrogenaza sinapilnog alkohola), ?= konverzija je dokazana; ??= konverzija nije u potpunosti dokazana. Prilagođeno prema Boerjan i sur. (2003).

Polimerizacija lignina odvija se spajanjem prethodno oksidiranih/dehidrogeniranih monolignola, odnosno monolignolskih radikala. Nastali radikali su relativno stabilni zbog rezonancije slobodnog elektrona u konjugiranom sistemu te se povezuju kovalentnom vezom stvarajući dimere (Vanholme i sur., 2010). Povezivanje radikala nasumičan je proces, a ovisi o dostupnosti jedinica za sintezu, kemijskoj prirodi svakog monomera i uvjetima u staničnoj stijenci (Ralph i sur., 2004). Nastali dimer se mora opet oksidirati prije nego se može povezati s drugim monomerom (slika 6).



Slika 6. Model nastanka ligninskog polimera. Nakon transporta, u staničnoj stijenci odvija se proces oksidacije monolignola pomoću peroksidaza i H_2O_2 pri čemu nastaju radikali koji se nasumično sparuju i povezuju kovalentnim vezama u ligninski polimer (A). Mogućnosti sparivanja slobodnih radikala s polimerom lignina (B). Prilagođeno prema Hatfield i Vermerris (2001).

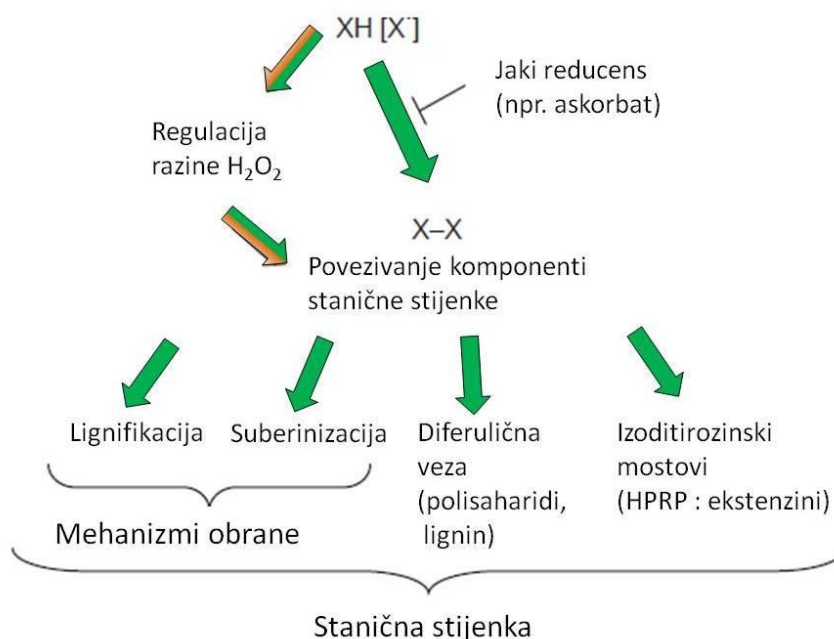
1.2. Peroksidaze i lignifikacija

Peroksidaze su enzimi koji kataliziraju redukciju H_2O_2 i oksidiraju različite supstrate. Nalazimo ih u životinjama, biljkama i mikroorganizmima gdje su uključene u brojne biološke procese. Biljne peroksidaze dijele se u tri skupine (I, II i III) (Welinder, 1992). Skupine I i III karakterizira protoporfirin IX prsten sa željezom u središtu (Passardi i sur., 2004b).

Peroksidaze skupine III (EC 1.11.1.7) sudjeluju u procesima lignifikacije, suberinizacije, metabolizmu auksina, rasta stanice, obrane od patogena, starenja i oksidativnog stresa. Većina peroksidaza ove skupine izlučuje se u apoplast i uključene su u dva procesa: redukciju H_2O_2 pomoću fenola, ligninskih prekursora i raznih sekundarnih metabolita (Hiraga i sur., 2001) i nastanak reaktivnih kisikovih jedinki (Passardi i sur., 2004b).

Geni koji kodiraju enzime ove skupine pripadaju velikoj multigenskoj porodici (Duroux i Welinder, 2003; Passardi i sur., 2004a). Multigenske porodice rezultat su duplikacija gena (Zhang, 2003), a brojne izoforme peroksidaza njihova su posljedica. U uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) je utvrđeno 75, u pšenici (*Triticum aestivum* L.) 110, riži (*Oryza sativa* L.) 149, kukuruzu (*Zea mays* L.) 155, a ječmu (*Hordeum vulgare* L.) 105 gena (Fawal i sur., 2012).

Regulirajući dostupnost H_2O_2 (slika 8) peroksidaze utječu na rast, odnosno elongaciju stanice te povezivanje fenolnih komponenti s ciljem inhibicije rasta kao odgovorom na signale izazvane napadom patogena, ozljedom tkiva, okolišnim čimbenicima i starenjem (Passardi i sur., 2004b). Tijekom rasta i diferencijacije stijenke uključene su u umrežavanje (engl. *cross-linking*) diferulnične kiseline s polisaharidima ili ligninom vezanim na polisaharide. Vezanjem ekstenzina (slika 10), hidroksiprolinom bogati proteini (HPRP) koji sudjeluju u rastu stanične stijenke onemogućavaju rast stanice (Brownleader i sur., 1995; Cosgrove, 2000; Lamport i sur., 2011).



Slika 8. Uloga peroksidaza u izgradnji stanične stijenke. Peroksidaze oksidiraju različite supstrate (simbol $XH[X']$) poput tirozinskih ostataka, monolignola, suberinskih podjedinica i ferulične kiseline kroz peroksidativni ciklus (zelene strelice). Nastali radikali mogu se umrežavati (simbol $X-X$) s polimerima stanične stijenke i proteinima koji sudjeluju u mehanizmima obrane u biljkama te procesom izgradnje stanične stijenke. Peroksidaze reguliraju razinu H_2O_2 kroz peroksidativni i katalitički ciklus (zeleno/narančaste strelice). Prilagođeno prema Pasardi i sur. (2004b).

U procesu lignifikacije peroksidaze, lakaze te oksidaze polifenola i koniferilog alkohola smatraju se odgovornima za reakcije oksidacije bilo da koriste H_2O_2 ili O_2 kao supstrat (Boerjan i sur., 2003) katalizirajući završni korak u sintezi lignina. U staničnoj stijenci peroksidaze oksidiraju monolignole u fenoksi radikale koji se međusobno povezuju tvoreći ligninski polimer.

Barceló (1998) grupira peroksidaze, koje sudjeluju u lignifikaciji na temelju izoelektrične točke na anionske, lokalizirane u staničnoj stijenci i kationske koje se nalaze i u vakuoli. Utvrđeno je da i anionske (Holst Christensen i sur., 2001; Li i sur., 2003; Østergaard i sur., 2000) i kationske (Blee i sur., 2003; Gabaldón i sur., 2006; Koutaniemi i sur., 2005) peroksidaze sudjeluju u procesima lignifikacije.

Modificiranje ekspresije, bilo utišavanjem ili pojačavanjem aktivnosti gena za peroksidaze, pokazuje različit utjecaj na količinu lignina i sastav u pojedinim biljnim vrstama. U vrstama roda *Populus sp.* smanjena ekspresija gena izazvala je smanjenje

sadržaja lignina (Li i sur., 2003). Istraživanja na duhanu pokazala su različit utjecaj smanjene ekspresije gena za peroksidaze. Naime, ili nije bilo nikakvog utjecaja (Barceló, 1997) ili je izazvala smanjenje sadržaja lignina (Blee i sur., 2003; Elfstrand i sur., 2002). Povećana ekspresija gena za peroksidaze dovela je do ektopične lignifikacije u rajčici (El Mansouri i sur., 2002).

Premda je njihova aktivnost potvrđena u svim tkivima koja se lignificiraju do danas nije utvrđena niti jedna peroksidaza koja bi izravno bila povezana s procesom lignifikacije (Cesarino i sur., 2013). Pretpostavlja se da su razlog tome brojne izoforme enzima i veliki broj različitih supstrata (Cosio i Dunand, 2009).

Lakaze (EC 1.10.3.2.) su glikoproteini koji u svom aktivnom mjestu sadrže atom bakra (Cu). Za razliku od peroksidaza koje koriste H_2O_2 , lakaze koriste O_2 za oksidaciju monolignola. Iako je njihova ekspresija dokazana u mnogim tkivima i stanicama koje se lignificiraju (Bao i sur., 1993; Driouich i sur., 1992; Ranocha i sur., 2001; Sterjiades i sur., 1992) istraživanja u kojima je modificirana ekspresija gena s ciljem detaljnijeg utvrđivanja njihove uloge u procesu lignifikacije, vrlo je malo. Rezultati istraživanja pokazali su da utišavanje ekspresije gena nije utjecalo na količinu i sastav lignina u pripadnika roda *Populus sp.* (Ranocha i sur., 2002) i vrsti tulipovac (*Liriodendron tulipifera* L.) (Dean Jeffrey i sur., 1998).

1.3. Utjecaj modifikacije ekspresije gena na sintezu i sastav lignina

Uz biokemijske metode, kojima se mjeri aktivnost pojedinih enzima u sintezi lignina i njihov afinitet za određene supstrate, primjena "antisense" tehnologije kojom se u stanicu unose analogni oligonukleotidi u cilju degradacije ili onemogućavanja prepisivanja RNA molekule, te uvođenje drugih mutacija u gen koje dovode do utišavanja ili pojačavanja ekspresije gena, omogućili su nastanak genetički modificiranih biljaka s ciljem proučavanja utjecaja jednog ili više gena na sintezu, sadržaj, sastav i strukturu lignina kao i utjecaj na sam fenotip biljke (Leljak-Levanić, 2009). Primjena genetski modificiranih biljaka u istraživanjima biosinteze lignina pridonosi razumijevanju uloge enzima i načina njihove regulacije na transkripcijskom i translacijskom nivou u stanici koja utječe na dostupnost i količinu komponenti potrebnih za sintezu kao i nastanak ligninskog polimera kao konačnog produkta (Goujon i sur., 2003; Guo i sur., 2001; Jouanin i sur., 2000; Jouanin i sur., 2004; Leplé i sur., 2007; Prashant i sur., 2011; Ralph i sur., 2007b; Thévenin i sur., 2011).

Utišavanje ekspresije gena u duhanu za enzime PAL i C4H, koji se nalaze na početku biosintetskog puta lignina, imalo je za posljedicu smanjeni sadržaj lignina kao i smanjen omjer podjedinica S/G (Sewalt i sur., 1997). Smanjena ekspresija gena *PAL* izazvala je smanjenje udjela podjedinica G, a gena *C4H* podjedinica S.

Sličan utjecaj na sadržaj lignina izazvalo je utišavanje gena *4CL* u uročnjaku, vrstama roda *Populus sp.* i duhanu, za razliku od sastava lignina, odnosno omjera S/G podjedinica, koji se razlikovao ovisno o biljnoj vrsti. U duhanu je zabilježeno smanjivanje udjela podjedinica S, u uročnjaku G, a u vrstama roda *Populus sp.* nije došlo do promjene omjera podjedinica S/G (Hu i sur., 1999; Kajita i sur., 1997; Kajita i sur., 1996; Lee i sur., 1997).

Utišavanjem gena za CCoAOMT i COMT enzime dobiveni su slični rezultati. Uz smanjenje sadržaja lignina, znatno se promijenio udio podjedinica S kao posljedica utišavanja gena *COMT*, odnosno G kao posljedica utišavanja gena *CCoAOMT* (Atanassova i sur., 2003; Guo i sur., 2001; Jouanin i sur., 2000; Marita i sur., 2003).

Produkt gena *CCR* ključan je enzim specifičnog puta sinteze monolignola, a njegovim utišavanjem dolazi do znatnog smanjenja sadržaja lignina (Piquemal i sur., 1998) i promjene sastava lignina (Ralph i sur., 1998) u duhanu. Mutacija u genu *CCR* u biljkama kukuruza (*ZmCCR1*) izazvala je smanjenje sadržaja Klasonovog lignina za 10%, ali značajnije promjene fenotipa nije bilo (Tamasloukht i sur., 2011). Također, isti su autori zamijetili zastoj u lignifikaciji vlakana kao i modificiranost stanica sklerenhima. Tu i suradnici (2010) primjenom RNA interferencije utjecali su na smanjenje transkripcije gena *CCR* u engleskom ljuju (*Lolium perrene* L.) što je uzrokovalo smanjenje sadržaja lignina za 37%.

Gen *CCR* prvi put su karakterizirali i klonirali u eukalptusu Lacombe i sur. (1997), a kasnije i Piquemal i sur. (1998) u duhanu. U uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) karakterizirana su i identificirana dva gena *AtCCR1* i *AtCCR2*, a gen *AtCCR1* imao je pojačanu ekspresiju u stabljici (Lauvergeat, 2001). U kukuruзу Pichon i sur. (1998) kao i u pšenici su također izolirane dvije cDNA *TaCCR1* (Ma, 2007) i *TaCCR2* (Ma i Tian, 2005). U ječmu je do sada kloniran i karakteriziran gen *HvCCR* čija je ekspresija potvrđena u stabljici i korijenu što ukazuje na povezanost s procesima lignifikacije (Larsen, 2004).

U mutanata uročnjaka (tzv. *irx* prema engl. *irregular xylem*) koji imaju narušenu građu stanica ksilema pronađeno je da *irx4* ima mutaciju u genu *CCR* koja za posljedicu ima smanjenje sadržaja lignina u stijenci, karakterističan izgled ksilema i niži rasti biljke (Jones i sur., 2001).

Enzim CAD katalizira redukciju cimetnih aldehida u alkohole kao zadnji korak u sintezi monolignola, a postoji u nekoliko proteinskih izoformi (Goffner i sur., 1992; Hawkins i Boudet, 1994) koje kodira veći broj gena, a njihova uloga u lignifikaciji se još uvijek istražuje u brojnim biljnim vrstama (Bukh i sur., 2012; Dixon i sur., 2001).

Istraživanja su pokazala da utišavanje gena za CAD ima različit utjecaj na sadržaj lignina i njegov sastav ovisno o biljnoj vrsti. U vrstama roda *Populus sp.* sadržaj lignina se neznatno smanjio (3-4%) u odnosu na kontrolnu skupinu (Lapierre i sur., 1999) dok kod duhana (Halpin i sur., 1994; Vailhe i sur., 1999; Yahiaoui i sur., 1997) i lucerne (*Medicago sativa* L.) nije zabilježena nikakva promjena (Baucher i sur., 1999). Najveće

smanjenje sadržaja lignina zbog mutacije u genu za CAD zabilježeno je u vrsti *Pinus taeda* L. (MacKay i sur., 1997). Također u navedenim biljnim vrstama zabilježena je i promjena sastava lignina koja se očitovala u smanjenoj količini podjedinica S.

Modifikacija ekspresije dva ili više gena u sintezi lignina postignuta je križanjem biljaka u kojima je transformiran po jedan gen, križanjem dvostruko transformiranih biljaka i unošenjem konstrukta koji su utišavali više od jednog gena.

Istovremeno utišavanje dvaju gena *CCoAMT/COMT* te *COMT/CCR* u duhanu (Pinçon i sur., 2001; Zhong i sur., 1998) utjecalo je na razvoj i rast biljke te sadržaj i sastav lignina, a rezultati dobiveni u lucerni (Guo i sur., 2001) bili su slični onima u duhanu, izuzev utjecaja na rast biljke. Chabannes i sur. (2001) istovremenim su utišavanjem dvaju gena *CCR* i *CAD* u duhanu, dobili biljke sa smanjenim sadržajem lignina i različitim udjelom podjedinica, ali to nije znatno utjecalo na fenotip biljke. Abbott i sur. (2002) istovremeno su utišali tri gena za sintezu lignina *CAD*, *COMT* i *CCR* u duhanu što je pak utjecalo na rast i morfologiju provodnih elemenata kao i na sadržaj lignina.

U jednosupnicama, odnosno porodici trava (*Poaceae*), mutanti kukuruza (*Zea mays* L.), šećernog sirka (*Sorghum bicolor* (L) Moench.) i bisernog prosa (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) poznati pod nazivom *brown midrib* (*bmr*) najpoznatiji su primjer utjecaja modifikacije gena na ekspresiju odnosno fenotip biljke (Cherney i sur., 1991). Svojim karakterističnim fenotipom središnje vene smeđeg obojenja, *bmr* mutanti (slika 9), ukazuju na manjak lignina i promijenjeni sastav što za posljedicu ima smanjenu čvrstoću stabljike.

U kukuruзу je ovakav fenotip prvi put opisan 1924. godine i posljedica je spontane recesivne mutacije (Jorgenson, 1931). Do danas su identificirana četiri *bm* lokusa: *bm1*, *bm2*, *bm3* i *bm4* (Ali i sur., 2010), a dva lokusa *bm1* i *bm3* povezana su sa genima za sintezu lignina. Lokus *bm3* povezan je sa mutacijama u *COMT* genu (Vogel, 2008). U šećernom sirku (Porter i sur., 1978) kao i na bisernom prosu (Cherney i sur., 1988) kemijskom mutagenozom, primjenom dietil sulfata, dobiveno je nekoliko mutanti ovakvoga fenotipa.

Mutaciju u genu *CAD* sadrže mutanti kukuruza *bm1* (Halpin i sur., 1998) i *bm6* u sirku (Sattler i sur., 2009). U sirku *bm6* mutanti pokazuju smanjenu količinu Klason-ovog lignina za 22% te povećanje sadržaja glukoze za 7% (Pillonel i sur., 1991).



Slika 9. Karakterističan fenotip *bmr* mutanti prepoznaje se prema crveno-smeđem obojenju središnje žile na listovima. A) stabljike *bm3* kukuruza (lijevo) i divljeg tipa (desno), B) listovi *bm3* kukuruza (izvor Dow AgroSciences LLC), listovi šećernog sirka C) *bmr-6* i D) *bmr-12*. Prema Oliver i sur. (2005).

1.4. Ulaganje lignina u staničnu stijenku

Stanična stijenka jedinstvena je struktura u eukariotskoj stanici i kao takva karakteristična je za biljke. Daje stanicama oblik i čvrstoću, važna je za obranu od patogena, metabolizam i provođenje signala te pohranu ugljikohidrata. Stanična stijenka ima vrlo važnu ulogu u regulaciji rasta stanice i morfogenezi biljaka.

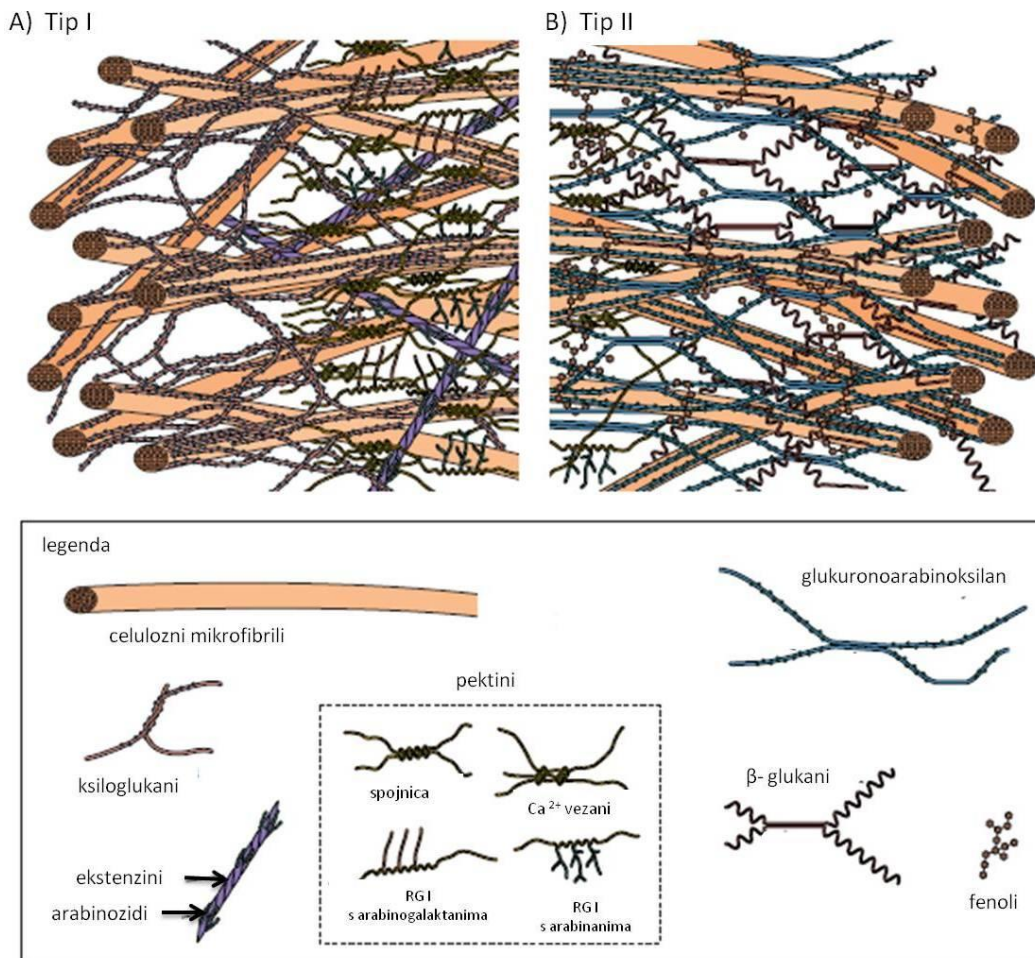
Tijekom stanične diobe svaka novonastala stanica razvija svoju stijenku. Razvoj stijenke započinje u telofazi kada se iz fragmoplasta razvija središnja lamela (primordijalna stijenka), tanka struktura građena od pektina koja se najčešće ne razlikuje od primarne stanične stijenke. Na primarnu staničnu stijenku nastavlja se sekundarna stanična stijenka.

Primarna stanična stijenka karakteristična je za stanice koje rastu i dijele se, a građena je od polisaharida, glikoproteina, fenolnih estera, enzima i proteina ekspanzina koji imaju vrlo važnu ulogu u rastu stanice (Cosgrove, 2000). Polisaharidi uključuju celulozu (9-25%), hemicelulozu (25-50%), u koju ubrajamo ksiloglukan i glukuroarabinoksilane kao najzastupljenije, a tu još pripadaju i glukomanani, galaktoglukomanani i galaktomanani. Pektini koji čine 10-35% stijenke su polisaharidi bogati galakturonskom kiselinom (Carpita i McCann, 2000).

Celuloza sadrži 40% ukupnog ugljika u biljkama i strukturni je temelj biljnih stanica. Nalazimo je u sastavu građe jednostaničnih i višestaničnih organizama. Glavni je građevni element drva gdje čini oko 40% suhe tvari. U staničnoj stijenci celuloza se sastoji od kristalnih i amorfni područja (Bessueille i Bulone, 2008). Celulozna vlakna nazivaju se mikrofibrilima i predstavljaju skup molekula β -D-glukoze, povezanih glikozidnom vezom, organiziranih u kristalnu strukturu (Guerriero i sur., 2010).

Građa i sastav primarne stanične stijenke u biljaka iz porodice trava (*Poaceae*) pripada tzv. tipu II stanične stijenke i razlikuje se od tipa I (slika 10) kojem pripadaju biljke iz skupine dvosupnica kao i ostalih pripadnika iz skupine jednosupnica te golosjemenjača. Tip I stanične stijenke sastoji se od celuloznih mikrofibrila uklopljenih u mrežu ksiloglukana, pektina i strukturalnih proteina. U staničnim stijenkama tipa II nalazimo

glukuronoarabinoksilane, hidroksicimetne kiseline (ferulična i *p*-kumarinska kiselina), malo pektina i proteina te β -glukane koji su karakteristični za stijenku biljaka iz porodice trava (Vogel, 2008).

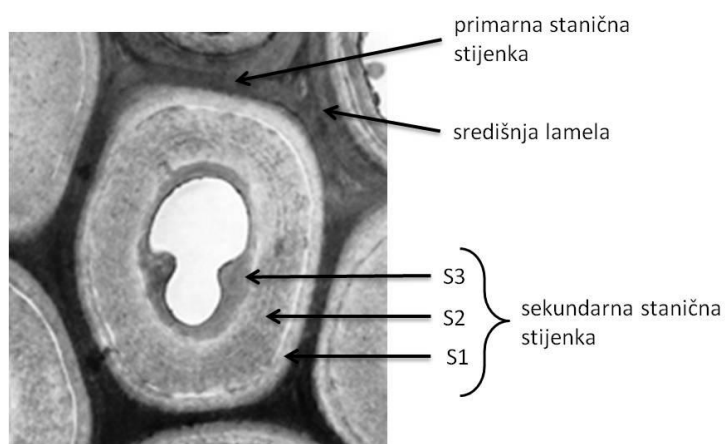


Slika 10. Modeli građe primarne stanične stijenke. (A) Model građe stijenke tipa I prikazuje interakcije između molekula celuloze, ksiloglukana (XyG), pektina i proteina u staničnoj stijenci. Osnovnu rešetku čini polimer celulozних mikrofibrila i XyG uklopljen u matriks građen od pektina, homogalakturonana (HGA) i ramnogalakturonana I (RG I), koji se kasnije zamjenjuju arabinanima, galaktanima i arabinogalaktanima. Mikrofibrili su promjera 5-10 nm i debljine 20 do 30 nm. Primarna stijenka debljine 80 nm može sadržavati oko 5-10 ovakvih slojeva građenih od lamela mikrofibrila. Tijekom rasta, cijepanje ili disocijacija XyG pomoću enzima, "opušta" mrežu celuloze i XyG i omogućavajući razdvajanje mikrofibrila. Nakon rasta, molekule ekstenzina povezuju se s mikrofibrilima učvršćujući tako strukturu stijenke. (B) Model građe stijenke tipa II prikazuje interakcije između molekula celuloze, glukuronoarabinoksilana (GAX), pektina i aromatskih spojeva. Mikrofibrili se isprepliću s GAX koji umjesto ksilana sadrže L-arabinozu i koja blokira stvaranje vodikovih veza. Za razliku od tipa I, u tipu II stanične stijenke nalaze se i razni ne-celulozni polimeri. Ovakav tip stanične stijenke specifičan je za red *Poales*. Tijekom rasta u stanici se sintetiziraju β -glukani. Prilagođeno prema Carapita i McCann (2000).

Način organizacije i mehanizmi kojim se ove komponente slažu u jedinstvenu strukturu predmet su brojnih istraživanja. Predloženo je nekoliko modela koji opisuju organizaciju makromolekula unutar stanične stijenke (Carpita i Gibeaut, 1993; Keegstra i sur., 1973). Istraživanja su pokazala da je celuloza povezana u mikrofibrilna vlakna koja su organizirana u obliku rešetke (Somerville i sur., 2004) na koje se onda kovalentno veže hemiceluloza, a sve to uklopljeno je u pektinski matriks koji stabilizira cijelu strukturu, ali ujedno omogućava i kretanje mikrofibrila za vrijeme rasta stanice (Cosgrove, 2005).

Nakon što prestanu rasti neki tipovi stanica zadržavaju primarnu staničnu stijenku dok se kod nekih počinje razvijati i sekundarna stanična stijenka. Ovakav tip stijenke nalazimo kod stanica koje su mrtve i izgrađuju provodne elemente odnosno ksilem (traheje i traheide), mehaničko tkivo – sklerenhim te sklereide koje se javljaju u nekih biljnih vrsta. Na primarnu staničnu stijenku nastavlja se sekundarna stanična stijenka (slika 10).

Sekundarna stanična stijenka uz 40-80% celuloze i 10-40% hemiceluloze, u koju ubrajamo ksilan, glukuronoksilan, arbinoksilani glukomanan, sadrži i 5-25% lignina (Bidlack i sur., 1992) .



Slika 11. Građa stijenke sklerenhimskih stanica drvenastih vrsta roda *Robinia sp.* Na primarnu staničnu stijenku nastavlja se sekundarna građena od tri sloja: vanjski S1, središnji S2 i unutarnji S3, koji se međusobno razlikuju u orijentaciji celuloznih mikrofibrila. Prilagođeno prema Carpita i McCann (2000).

U stanicama s dobro razvijenom sekundarnom stijenkom možemo razlikovati tri sloja: S1, S2 i S3 (slika 11). Slojevi se međusobno razlikuju u debljini, sastavu i orijentaciji celuloznih mikrofibrila (Mellerowicz i Sundberg, 2008).

Proces ulaganja lignina u sekundarnu staničnu stijenku dijeli se u nekoliko faza, a započinje u kutovima stanice i središnjoj lameli nakon ulaganja ugljikohidrata u sloj S1. Zatim slijedi sporija faza lignifikacije kada se ulažu ugljikohidrati i celulozni mikrofibrili u sloj S2. U trećoj fazi odvija se glavna procesa lignifikacije nakon formiranja sloja S3, odnosno nakon prvotnog ulaganja celuloze i hemiceluloze (Terashima i Fukushima, 1988).

Sekundarna stanična stijenka biljaka iz porodice trava sadrži oko 20% lignina. Istraživanja su ukazala na postojanje razlika u sastavu ligninskih podjedinica između pripadnika porodice trava i dvosupnica. Analizama se utvrdilo da kukuruz (*Zea mays* L.) ima 4% H, 35% G i 60% S podjedinica, za razliku od pšenice (*Triticum aestivum* L.) koja sadrži 5, 49 i 46 %, a riža (*Oryza sativa* L.) sadrži 15, 45 i 40% udjela podjedinica H, G i S (Baucher i sur., 1998). Ono što karakterizira pripadnike ove skupine je znatno veći udio podjedinica H nego što to nalazimo u dvosupnicama, a udio podjedinica G i S je podjednak i kreće se oko 14-66%. U golosjemenjačama podjedinice G čine 95% sastava lignina, a ostatak čine H i S u podjednakim omjerima (Baucher i sur., 1998).

Prisutnost veće količine hidrokscimetnih kiselina posebno *p*-kumarinske i ferulične karakterizira staničnu stijenku porodice trava. Uloga ovih kiselina važna je za ulaganje lignina u stijenku, naime, Grabber i sur. (2004) smatraju da pridonose stvaranju esterskih i/ili eterskih veza u ligninskom polimeru.

Poznata je činjenica da u provodnim elementima i sklerenhimu dolazi do ranije lignifikacije sekundarne stanične stijenke, nego što je to slučaj s parenhimskim stanicama. Parenhim sadrži podjedinice G i S, dok u traheidama nalazimo još i podjedinice H. Terashima i sur. (1988), koristeći se mikroautoradiografijom u svojim istraživanjima, pokazali su da lignifikacija započinje ulaganjem podjedinica H, nakon čega slijede G, a kasnije i podjedinice S. Müsel i sur. (1997) istražujući razvoj koleoptila kukuruza pokazali su da se podjedinice S mogu čak uočiti i u ranoj fazi lignifikacije.

Omjeri pojedinih podjedinica, posebno S i G, mijenjaju se tijekom razvoja biljke. Naime, u jednosupnicama količina podjedinica S kao i omjer S/G raste sa starenjem biljke (Chen i sur., 2002). Provodni elementi i sklerenhimske stanice pokazuju veći omjer S/G u odnosu na parenhimske stanice (Chesson i sur., 1997). Ukupna količina lignina također se povećava tijekom razvoja biljke i najveći porast zamijećen je kada se biljka približava reproduktivnoj fazi razvoja (Chen i sur., 2002). Proces ulaganja lignina je tkivno i vremenski specifičan, odnosno ovisi o tipu stanice. Istraživanja su pokazala da taj proces može trajati od nekoliko sati do nekoliko tjedana kao što je to slučaj tijekom razvoja internodija kukuruza (Jung i Casler, 2006a).

1.5. Ječam

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) 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* (C.Koch) Thell. njegov divlji predak. Obje podvrste imaju diploidan broj kromosoma $2n=2x=14$.

1.5.1. Morfološka građa ječma

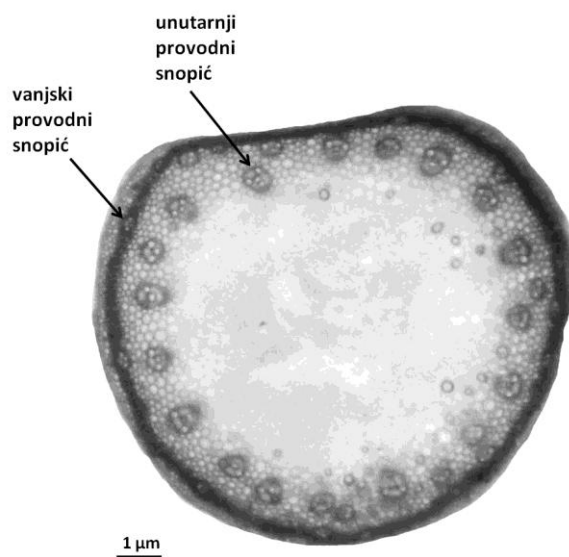
Ječam je jednogodišnja biljka prosječne visine od 60 – 120 cm. Stabljika ječma karakteristične je morfologije. Sastavljena je od nekoliko članaka (internodija) na kraju kojih se nalaze koljenca (nodiji) (Denffer i Ziegler, 1982). Rast stabljike jednosupnica vrlo je specifičan i za razliku od drugih biljnih vrsta, odvija se u bazalnom dijelu nodija i rukavcu lista.

Odrasla biljka sastoji se od glavne i nekoliko bočnih izdanaka stabljike, 2-5 u prosjeku. 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 (glumae) i cvijeta, koji uz tučak i prašnike, sadrži pljevice koje na vrhovima prelaze u osje.

1.5.2. Anatomska građa ječma

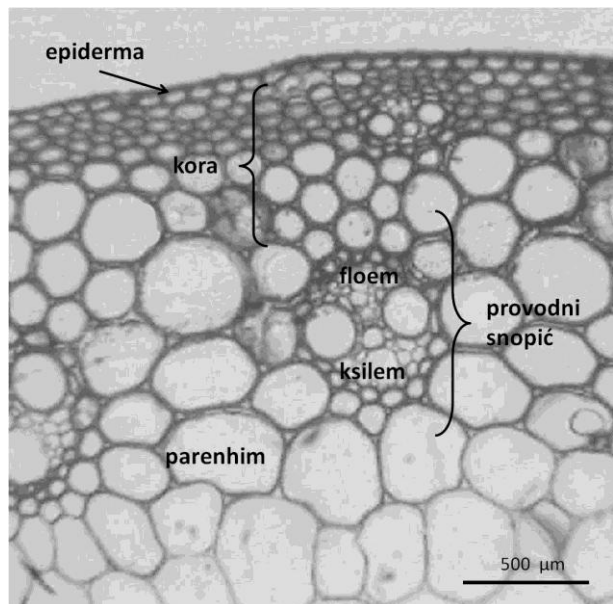
Na poprečnom prerezu (slika 12) stabljika ječma okrugla je i šuplja s provodnim snopićima, građenim od floema i ksilema, raspoređenim u dva reda (vanjski i unutrašnji) slično kao i u pšenici, riži, raži i zobi za razliku od dvosupnica gdje su složeni u obliku prstena u središnjem cilindru (Esau, 1953).



Slika 12. Poprečni prerez stabljike ječma. Stabljika je šuplja s prstenasto raspoređenim provodnim snopićima. Vanjski (manji) nalaze se u prstenu u području kore, a u parenhimu unutarnji (veći) provodni snopići.

Na površini stabljike nalazi se epiderma s kutikulom građenom od kutina koja ima zaštitnu funkciju (slika 13). Područje kore proteže se od epiderme do parenhima i građeno je od sklerenhima (Lepeduš i Cesar, 2010). U njemu se uočava prstenasti sloj lignificiranih stanica u kojem se nalaze vanjski provodni snopići (Esau, 1953). Stanice u području kore imaju različit stupanj lignifikacije ovisno o razvojnom stadiju, dijelu internodija i njegovoj starosti. Parenhimske stanice, koje se nastavljaju na ovaj sloj, imaju slabije lignificirane stijenke (slika 13). U protoplastu nalazimo plastide, a kloroplaste rijetko osim u biljkama sjene. Srčika je vidljiva jedino u donjem (bazalnom) internodiju.

Interkalarni merstemi, odgovorni za rast stabljike, smješteni su u području spajanja nodija i internodija iznad tzv. nodalnih ploča (Fahn, 1982). Ovaj tip meristema zadržava svoju aktivnost i u slučajevima kada je internodij u potpunosti diferenciran što omogućava ponovni rast stabljike ako dođe do njezinog mehaničkog oštećenja (Moore i sur., 1995).



Slika 13. Poprečni presjek stabljike ječma. Na površini se nalazi epiderma s kutikulom, zatim slijedi sloj kore, građen od sklerenhima, te osnovno tkivo-parenhim. Provodni elementi su zatvorenog kolateralnog tipa.

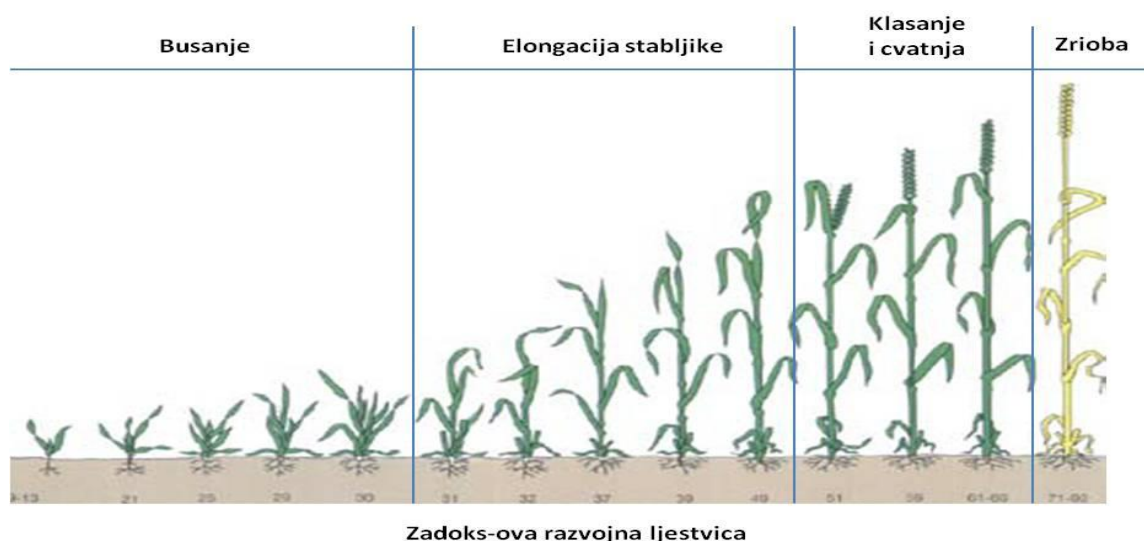
Sekundarni rast stabljike podrazumijeva primarno zadebljanje odnosno povećavanje volumena stanica parenhima (Esau, 1953). Tijekom razvoja, stabljika ječma prolazi kroz brojne anatomske i fiziološke promjene koje utječu na njezinu građu i čvrstoću, a povezane su s procesom lignifikacije.

Na površini listova nalazi se epiderma, s kutikulom na površini, građena od stanica različite duljine s antiklinalnim valovitim stijenkama. U epidermi možemo naći i povećane – buliformne stanice s vrlo tankim stijenkama koje imaju ulogu u savijanju lista kao zaštitnim mehanizmom od gubitka vode (Esau, 1953). S obje strane lista nalazi se graminejski tip puči. Mezofil lista nije jasno diferenciran na palisadni i spužvasti parenhim. Provodni snopići raspoređeni su paralelno ili u obliku luka, a sklerenhim je dobro razvijen.

Primarna građa korijena ječma obuhvaća rizodermu, primarnu koru, koja uključuje egzodermu, mezodermu i endodermu, te središnji cilindar. Korijen ječma pripada tipu busenastog korijenja i nema sekundarni rast (Fahn, 1982). Već tijekom klijanja iz klicinog korijenka razvije se 2-6 izboja glavnog korijena uz koje se razvija i adventivno korijenje iz bazalnog dijela stabljike (Moore i sur., 1995). Ovakav rast i razvoj korijenovog sustava dovodi do stvaranja mreže korijenja koja se rasprostire kako u širinu tako u dubinu što daje stabilnost biljci u nepovoljnim vremenskim uvjetima.

1.5.3. Razvoj ječma

Za određivanje razvojnih stadija žitarica najčešće se primjenjuje nekoliko ljestvica, jedna od njih je i ljestvica po Zadoks-u (slika 14) nazvana po fitopatologu Jan. C. Zadoksu (Zadoks i sur., 1974).



Slika 14. Zadoks-ova ili decimalna razvojna ljestvica žitarica često se primjenjuje u poljoprivredi i u istraživanjima žitarica. Razvojna ljestvica podijeljena je u 9 primarnih razvojnih stadija od kojih je svaki podijeljen na još 10 sekundarnih stadija. Ljestvica omogućava uzgajivačima praćenje razvoja žitarica i pravovremene primjene gnojiva, herbicida, regulatora rasta i zaštite od bolesti i nametnika.

Razvoj ječma dijeli se u nekoliko faza i započinje klijanjem i nicanjem, nakon čega slijedi busanje, vlatanje, klasanje, cvatnja, formiranje zrna, nalijevanje zrna te voštana i puna zrioba kojom završava razvoj. Razvojni ciklus ječma traje u prosjeku od 90-240 dana. Sjeme ječma klije na temperaturama od 1-2°C. Razvojem primarnog korijena omogućava se učvršćivanje i prehrana biljke. Nicanje je karakterizirano pojavom klice koja je zaštićena koleoptilom. Prestankom rasta koleoptile dolazi do pojave prvog lista, nakon čega daljnji listovi pojavljuju svakih 3-5 dana ovisno o sorti i klimatskim uvjetima. Dolazi do intenzivnog rasta i razvoja sekundarnog korijenja koje se razvija iz čvora busanja i podzemnih dijelova stabljike.

Faza busanja podrazumijeva stvaranje izdanaka i podzemnog grananja stabljike koje je vrlo karakteristično svojstvo za biljke iz porodice trava. Izdanci stabljike pojavljuju se u razdoblju od dva tjedna, a njihov broj ovisi o sorti i vremenskim uvjetima. Broj izdanaka smanjuje se s gušćom sjetvom, odnosno busanje je pojačano pri nižim temperaturama i većom količinom dušika u tlu.

Vlatanje je sljedeća faza u razvoju ječma koje je obilježeno produženim rastom stabljike. Rastom gornjih internodija biljka se pojavljuje iznad površine tla. Klas je još uvijek zatvoren u rukavcu lista.

Početak faze klasanja označava pojava klasa koji izlazi iz rukavca gornjeg lista, zastavičara. Budući da je ječam samooplodna biljka, oprašivanje se odvija tijekom ili neposredno prije izlaska klasa iz rukavca lista, a neposredno nakon toga prašnici izlaze izvan cvijeta. U ovoj fazi ječam je osjetljiv na visoke temperature i manjak vode što može kasnije imati utjecaja na prinos.

Formiranje i nalijevanje zrna označavaju fazu u kojoj zrno naraste do potpune dužine i dolazi do intenzivnog nakupljanja organskih tvari i minerala.

Zrioba se dijeli u nekoliko stadija. Mliječnu zriobu, koja traje 10-tak dana, obilježava prestanak funkcije stabljike i odumiranje baznih listova, a zrno intenzivno raste i nakuplja se škrob. Zatim slijede voštana zrioba, u kojoj se smanjuje nakupljanje organskih tvari i vlaga, a ubrzo nakon voštane nastupa i puna zrioba u kojoj zrno poprima konačan oblik i vlaga se smanjila 30-40% što označava kraj fiziološkog razvoja.

1.6. Cilj rada

Tijekom razvoja stabljika ječma prolazi kroz različite morfološke i anatomske promjene koje su posljedica diferencijacije stanica i tkiva, a povezane su s ulaganjem lignina u staničnu stijenku. Ulaganje lignina povećava debljinu staničnih stijenki i čvrstoću stabljike. Sinteza i ulaganje lignina složeni su procesi regulirani brojnim endogenim i egzogenim čimbenicima, stoga je potreban integrirani pristup u istraživanju razvoja stabljike.

Ciljevi ovog rada su:

1. Utvrditi raspored i ulaganje lignina u internodijima stabljike ječma tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba.
2. Utvrditi aktivnost gvajakol peroksidaza, sadržaj ukupnih topljivih fenola, ukupnog lignina i sadržaj celuloze u internodijima stabljike ječma tijekom razvoja.
3. Analizirati ekspresiju gena biosintetskog puta lignina *HvCCR* i *HvCAD* tijekom četiri razvojne faze stabljike ječma.

2. MATERIЈAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Biljni materijal uključivao je tri sorte dvorednog jarog ječma (*Hordeum vulgare* L.), Astor i Jaran iz Hrvatske i Scarlett iz Njemačke. Sorta Astor (Villa x Nehaj) stvorena je na Poljoprivrednom institutu Osijek i priznata u Republici Hrvatskoj 1991. godine, dok je Jaran ([Browarny x Villa] x Sultan) također stvoren na Poljoprivredom Institutu Osijek, priznat 1983. godine. Sorta Scarlett (Amazone x Br./ St.2730e x Kym) priznata je 1995. godine i stvorena u Njemačkoj na "Josef Breun GDBR–Herzogenbrauch breeding station".

Sorta Astor pripada ranijim sortama po dužini vegetacije, tolerantna je na bolesti i štetočine. Karakterizira ju niža, čvršća i elastična stabljika, dvorednog je i polurastresitog klasa.

Jaran je visokorodna sorta sa srednjom visinom stabljike oko 70 cm i pripada srednje ranim sortama. Ima dvoredan, rastresit klas i također pokazuje toleranciju na bolesti i štetočine ječma.

Sorta Scarlett je jedna od najčešće uzgajanih sorti jarog ječma u Europi zbog pivarskih kvaliteta i pripada kasnijim sortama. Srednja visina stabljike kreće se oko 57 cm. Također otporna je na štetočine i ima stabilan prinos.

Sorta Astor je prvenstveno namijenjena stočarskoj industriji za razliku od sorti Jaran i Scarlett koje svoju namjenu pronalaze u proizvodnji slada za industriju piva. Sorta Jaran, kao i Scarlett klasa 8-10 dana kasnije od sorte Astor.

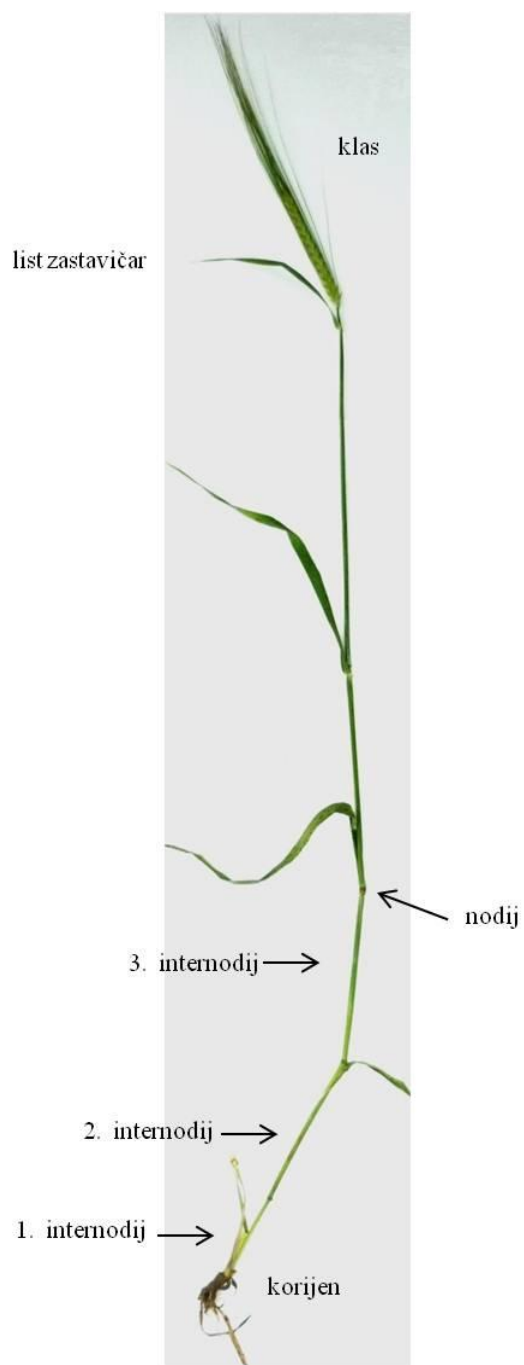
2.2. Uzorkovanje

Uzorke stabljika navedenih sorti skupljala sam s tijekom dvije vegetacijske sezone 2010. i 2011. na pokusnim poljima Poljoprivrednog instituta Osijek u Osijeku. Lokalitet Osijek karakterizira eutrični kambisol, aluvijalno tlo 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. Sorte su posijane na parcelama veličine 7,56 m² s normom sjetve od 450 zrna/m², raspoređene prema slučajnom blok rasporedu (Lalić, 2009). Biljni materijal uzorkovala sam u razdoblju od svibnja do lipnja (tablica 1).

Tablica 1. Datumi uzimanja uzoraka biljnog materijala na pokusnim poljima.

Razvojna faza	Astor		Scarlett		Jaran	
	2010.	2011.	2010.	2011.	2010.	2011.
Klasanje	20.5.	17.5.	1.6.	27.5.	29.5.	25.5.
Cvatnja	29.5.	27.5.	11.6.	7.6.	8.6.	6.6.
Nalijevanje zrna	8.6.	7.6.	20.6.	17.6.	17.6.	15.6.
Zrioba	17.6.	17.6.	28.6.	27.6.	25.6.	26.6.

Prvo uzorkovanje poklapalo se s početkom klasanja. Početak klasanja odredila sam vizualno, na polju na temelju pojave klasa koji izlazi iz rukavca lista zastavičara. Klasanje je prvo započelo kod sorte Astor, koja pripada ranijim sortama, a potom su slijedile sorte Jaran i Scarlett, koje pripadaju kasnijim sortama. Nakon toga uzorke sam uzimala svakih desetak dana, ovisno o vremenskim uvjetima i obuhvatila razvojne stadije: cvatnju, nalijevanje zrna i zriobu. Faze sam odredila na temelju fenotipskih karakteristika. Za analize sam uzimala tri donja internodija (slika 15).



Slika 15. Sorta Astor u fazi cvatnje.

Podatke o prosječnoj temperaturi i količini oborina za mjesec svibanj i lipanj 2010. i 2011. godine dobila sam od Državnog hidrometeorološkog zavoda Republike Hrvatske.

2.3. Fiksiranje i uklapanje tkiva za svjetlosnu mikroskopiju

Svaki internodij ručno sam izrezala žiletom na manje dijelove (5 mm) i fiksirala u 6% otopini glutaraldehida (Grade II, Sigma) u fosfatnom puferu koji je sadržavao natrij dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 7,64 g/L i dinatrij hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 8,899 g/L pomiješanih jednakom omjeru (v/v). Uzorke sam dehidrirala u seriji alkohola prema sljedećem protokolu u tablici 2.

Tablica 2. Postupak dehidracije biljnog materijala

Alkohol	Vrijeme
100% 2-metoksietanol	2 x 2 sata
96 % etanol	2 x 1 sat
100 % n-propanol	2 x 1 sat
100 % n-butanol	2 x 1 sat

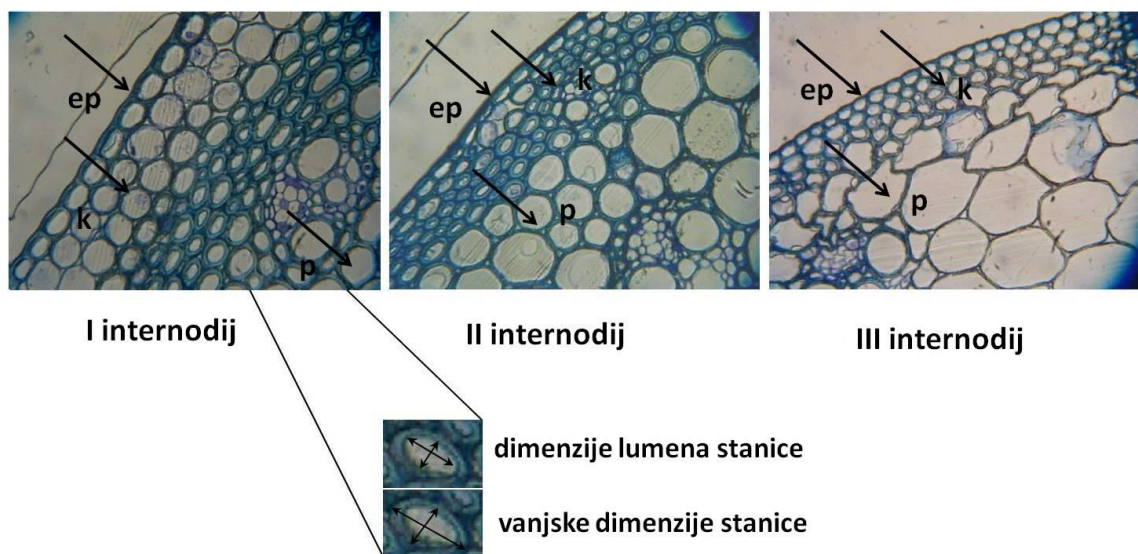
Nakon dehidracije uzorke sam uklopila u termoplastičnu smolu (Leica Historesin Embedding Kit) prema uputama proizvođača. Nakon uklapanja, tkivo sam izvadila iz kapsulica otapajući ih u vodi, zalijepila na drvene blokiće (2x2 cm) koristeći super ljepilo i ostavila na sušenju preko noći. Sve uzorke izrezala sam staklenim nožem na debljinu od 3 μm pomoću rotacionog mikrotoma Leica RM2155.

2.4. Mjerenje dimenzija stanice

Prije mjerenja uzorke sam obojila 0,05 % otopinom toluidin plave boje u benzoatnom puferu (10 mM benzoatna kiselina, 10 mM natrijev benzoat, pH= 4,4) u trajanju od 5 minuta i nakon toga ispirala pod tekućom vodom dok se pozadina nije odbojala, te isprala u destiliranoj vodi.

Za mjerenje dimenzija stanice koristila sam digitalnu mikroskopsku kameru Moticam 350 pri povećanju od 400 puta i program Motic Images Plus 2.0ML.

Internodije sam podijelila na tri strukturalna dijela: epiderma, sloj kore i parenhim s provodnim elementima u kojima sam odredila broj slojeva stanica te izmjerila njihove dimenzije. Svakoj stanici izmjerila sam četiri dimenzije: duljinu i širinu lumena te duljinu i širinu vanjskih rubova (slika 16). Stanice sam mjerila u središnjem dijelu internodija. Izmjerila sam po 100 stanica epiderme i 200 stanica u kori i parenhimu.



Slika 16. Poprečni prerez internodija stabljike ječma. Strelicama su označeni slojevi u kojima su mjerene dimenzije stanica: ep-epiderma, k-kora i p-parenhim. Uvećani odsječak prikazuje položaj mjerenja.

Dobivene rezultate izrazila sam kao omjer: duljina vanjskog ruba/duljina lumena stanice (dv/dl), te širina vanjskog ruba/širina lumena stanice ($šv/šl$). Dobiveni omjeri poslužili su za određivanje debljine stanične stijenke, odnosno izračun koeficijenta lignifikacije.

2.5. Histokemijske metode bojanja lignina

Internodije sam podijelila u tri dijela: bazni, središnji i gornji dio i izrezala na dijelove veličine 0,5 cm. Donji, bazni dio graniči s nodijem prethodnog internodija, osim u slučaju prvog internodija. Zatim središnji dio i gornji dio koji se nalazi na vrhu odnosno na prijelazu u nodij višeg internodija.

2.5.1. Wiesnerova reakcija – test za lignin

Wiesnerova reakcija (Adler i sur., 1949) koristi se kao univerzalni test za cimetne aldehide, odnosno za dokazivanje prisutnosti lignina. Temelji se na reakciji floroglucinola u kiselom mediju (HCl) s koniferilnim i sinapilnim aldehydima pri čemu nastaje ružičasto do crveno obojenje (Pomar i sur., 2002).

Ručne, poprečne prereze internodija inkubirala sam 2 minute u 0,5% otopini floroglucinola, nakon čega sam dodala kap koncentrirane kloridne kiseline i prenijela ih u kapljicu destilirane vode na predmetno staklo. Prereze sam fotografirala koristeći digitalni fotoaparat Olympus μ 1040.

2.5.2. Maüleova reakcija

Maüleova reakcija nastaje kao posljedica oksidacije siringilnih podjedinica kalij permanganatom (KMnO_4) i uočavamo je kao crveno obojenje za razliku od gvajacilnih podjedinica koje se boje žuto-smeđom bojom. Test se koristi za razlikovanje građe drveta u četinjačama i listopadnim vrstama (Meshitsuka i Nakano, 1979).

Poprečne prereze internodija inkubirala sam u 1% otopini kalij permanganata 3 minute, isprala tri puta u destiliranoj vodi, i inkubirala u 12% kloridnoj kiseline (HCl) u trajanju od 2 minute, ponovila ispiranje u destiliranoj vodi i dodala nekoliko kapi 1,5% otopine natrij bikarbonata (NaHCO_3). Prereze sam stavila u kap vode na predmetnicu i fotografirala.

2.6. Bojanje safraninom i alcian plavim

Poprečne prereze internodija, koje sam podijelila u tri dijela (bazni, središnji i gornji dio), obojala sam otopinama 1% safranina u 50% etanolu i 1% alcian plavo 8GS u 0,05% octenoj kiselini koja je sadržavala 0,04% formaldehid. Prereze sam prvo obojala u safraninu u trajanju od 1 minute, isprala ih u destiliranoj vodi i zatim obojala alcian plavim također u trajanju od 1 minute i ponovo ispirala u destiliranoj vodi i promatrala pod mikroskopom. Kombinacijom ovih dviju boja može se utvrditi prisutnost lignina (crveno) i celuloze (plavo) u stabljici (Marjamaa i sur., 2003).

2.7. Određivanje aktivnosti peroksidaza *in situ*

Na svježim, ručno-izrađenim poprečnim prerezima internodija podijeljenim na tri dijela, bazni, središnji i gornji dio, utvrdila sam aktivnost gvajakol peroksidaza *in situ*. Reakcijska smjesa sadržavala je iste komponente kao i za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti. Uzorke sam inkubirala 2 minute u reakcijskoj smjesi i stavila u kap destilirane vode na predmetnicu.

2.8. Priprema uzoraka za biokemijske i molekularne analize

Nakon sakupljanja, uzorke sam smrznula u tekućem dušiku i pohranila na -80°C. Za sve analize uzorke sam usitnila u tekućem dušiku koristeći tučak i tarionik, osim za analize lignina i celuloze.

2.9. Mjerenje aktivnosti gvajakol peroksidaza

U prethodno izvagane tubice odvagala sam oko 0,4 g usitnjenog tkiva i dodala 1 mL pufera za ekstrakciju (100mM Tris-HCl, pH=8,0) uz dodatak polivinilpirolidona (PVP) te promiješala. Ekstrakcija se odvijala na ledu 15 minuta, nakon čega sam uzorke centrifugirala 15 minuta na 18 000 g (Eppendorf, 5084 R) odvojila supernatante i ponovila postupak.

Aktivnost peroksidaza izmjerila sam spektrofotometrijski na valnoj duljini od 470 nm (Spekord 40, Analytik Jena) koristeći gvajakol kao supstrat (Siegel i Galston, 1967). Dodala sam 1-20 µL ekstrakta, ovisno o uzorku, u reakcijsku smjesu, koja se sastojala od 5mM otopine gvajakola (Sigma Aldrich) u fosfatnom puferu pH= 5,8 (0,2 M KH₂PO₄, i 0,2 M Na₂PO₄ · 12 H₂O,) i 5 mM H₂O₂ i mjerila povećanje apsorbancije svake sekunde tijekom dvije minute. Ukupnu aktivnost peroksidaza izrazila sam kao promjenu apsorbancije u minuti izraženu po masi svježe tvari ($\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ sv. t.}$) koristeći dolje navedeni izraz.

$$\text{Ukupna aktivnost peroksidaza} = \frac{X \cdot Y \cdot Vu}{m \cdot Va}$$

X – srednja vrijednost razlika u promjeni apsorbancije u određenom vremenskom intervalu

Y – faktor potreban za izražavanje promjene apsorbancije po minuti (60)

Vu – ukupni volumen proteinskog ekstrakta

m – masa svježe tvari (izražena u gramima)

Va – volumen mjerenog alikvota uzorka

Koncentraciju proteina u uzorcima izmjerila sam metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Baždarnu krivulju izradila sam koristeći otopinu albumina goveđeg seruma koncentracije 1 mg/mL. Specifičnu aktivnost peroksidaza izrazila sam kao ukupnu aktivnost peroksidaza s obzirom na koncentraciju proteina u uzorku i izrazila je u $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina.

2.10. Određivanje izoenzimskih formi gvajakol peroksidaza

Za elektroforezu proteinskih ekstrakata u gelu koristila sam prethodno pripravljene uzorke za mjerenje aktivnosti peroksidaza. Uzorke, koji su sadržavali oko 10 µg proteina, nanijela sam na 0.8% agarozni gel pripremljen u TAE puferu (Tris-acetat EDTA, pH=8,0), češalj sam stavila u sredinu gela kako bih dobila razdvajanje kationskih i anionski peroksidaza, odnosno pozitivnih i negativnih izoformi (Cesarino i sur., 2012). Elektroforetsko razdvajanje izoenzimskih formi peroksidaza provela sam pri 100 V tijekom jednog sata (Sci-Plas, Velika Britanija). Reakcijska smjesa bila je ista kao i za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti.

2.11. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola

Folin-Ciocalteuovim reagensom

Ukupne topljive fenole u internodijima ječma ekstrahirala sam u 95% etanolu tijekom 48 sati na -20°C. Uzorke sam centrifugirala na 10 000 g , 10 minuta na +4°C i odvojila supernatante.

Sadržaj ukupnih topljivih fenola izmjerila sam uz pomoću Folin–Ciocalteuovog reagensa (Singleton i Rossi, 1965) razrijeđenog s destiliranom vodom u omjeru 1:2 neposredno prije uporabe. Zasićenu otopinu natrij karbonata (Na₂CO₃) pripremila sam otapajući 100 g bezvodnog Na₂CO₃ u 400 mL destilirane vode nakon čega sam otopinu zagrijala do vrenja, ohladila i profiltrirala sljedeći dan te nadopunila do konačnog volumena od 500 mL.

U reakciju sam dodala 100 µL uzorka, 700 µL destilirane vode i 50 µL FC reagensa, promiješala i inkubirala na sobnoj temperaturi 5 minuta, dodala 150 µL Na₂CO₃ i dobro izmiješala. Uzorke sam inkubirala 60 minuta na 37°C u vodenoj kupelji i izmjerila apsorbanciju na 725 nm.

Isti postupak primijenila sam i za izradu baždarnе krivulje koristeći razrjeđenja taninske kiseline otoplјene u 95% etanolu u početnoj koncentraciji od 5 mg/mL.

Sadržaj ukupnih toplјivih fenola izrazila sam u miligramima ekvivalenta taninske kiseline po gramu svježe tvari (mg ETK/g sv.t.)

2.12. Određivanje sadržaja lignina

Količina lignina preostalog nakon razgradnje 72% sulfatnom kiselinom (H_2SO_4) određuje se gravimetrijski i naziva se Klasonov lignin (netoplјiv u kiselini). Lignin koji je toplјiv u kiselini mjeri se spektrofotometrijski koristeći ekstinkcijski koeficijent za lignin (Dence i Lin, 1992).

2.12.1. Određivanje sadržaja Klasonovog lignina

Prije određivanja lignina uzorke sam sušila 48 sati na 65°C u sušioniku i samljela ih na mlinu (Retsch, Njemačka) koristeći sito s veličinama otvora od 0,5 cm. Uzorke sam ekstrahirala u 80% etanolu 30 minuta na 80°C u vodenoj kupelji, centrifugirala na 1000 g i dekantirala supernatant nakon svake inkubacije. Postupak sam ponovila četiri puta. U završnom koraku talog sam oprala 96% acetonom i uzorke sušila preko noći u sušioniku na 70°C.

Za određivanje Klasonovog lignina izvagala sam po 100 mg ekstrahiranog tkiva svakog uzorka u triplikatu i stavila ih u Erlenmeyerove tikvice od 150 mL te dodala 1,5 mL 72% sulfatne kiseline. Uzorke sam inkubirala 1 sat na 30°C u vodenoj kupelji uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije, 72% sulfatnu kiselinu sam razrijedila destiliranom vodom do 4% i autoklavirala uzorke 1 sat na 121°C. Uzorke sam filtrirala na prethodno izvagane filter papire i odvajala filtrate za određivanje toplјivog lignina, a talog sam ispirala vrućom destiliranom vodom do neutralne reakcije. Filter papire sam osušila preko noći u sušioniku na 70°C do konstantne mase i izvagala.

Za izračun Klasonovog lignina koristila sam slijedeći izraz:

$$\text{Klasonov lignin} = \frac{m_1}{m_2} \cdot 1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

m_1 = ostatak nakon sušenja u g

m_2 = masa prije hidrolize u g

2.12.2. Određivanje sadržaja lignina topljivog u kiselini

Tijekom postupka izolacije lignina metodom po Klasonu u filtratu se zadržava dio lignina koji je topljiv u sulfatnoj kiselini. Topljivi lignin odredila sam spektrofotometrijski (Analytic Jena, Specord 40) mjereći apsorbanciju na 205 nm prema TAPPI UM-250 protokolu (TAPPI, 1985) u kvarcnoj kiveti dodatkom 200 μL uzorka i 1800 μL destilirane vode, destilirana voda poslužila je i kao slijepa proba.

Za izračun sam koristila slijedeći izraz:

$$\text{Lignin topljiv u kiselini} = \frac{A_{205} \cdot R \cdot V}{e \cdot l \cdot m_1} \cdot 1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

A_{205} = apsorbancija na 205 nm

R = razrjeđenje

V = volumen filtrata (u litrama)

e = ekstinkcijski koeficijent lignina $110 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

l = širina kivete (1 cm)

m_1 = masa prije hidrolize u gramima

Sadržaj lignina izrazila sam kao ukupni lignin, koji predstavlja zbroj Klasonovog i lignina topljivog u kiselini, u miligramima po gramu suhe tvari (mg/g s.t.).

2.13. Određivanje sadržaja celuloze

Metoda se zasniva na razgradnji lignina i hemiceluloze, odnosno polisaharida, u uzorku pomoću Updegraffovog reagensa nakon čega se celuloza hidrolizira pomoću 72% sulfatne kiseline pri čemu nastaje glukoza koja reagira s antronom i nastaje žuto do zeleno obojenje ovisno o koncentraciji glukoze u uzorku (Updegraff, 1969).

Za određivanje celuloze u koristila sam prethodno ekstrahirane i osušene uzorke uz određenu modifikaciju protokola (Foster i sur., 2010). Svježe pripremljen Updegraffov reagens sadržavao je octenu kiselinu, nitratnu kiselinu i destiliranu vodu u omjeru 8:1:2 (v/v). Izvagala sam po 30 mg tkiva svakog uzorka u plastičnu tubicu s čepom na navoj i dodala 1 mL reagensa, promiješala i inkubirala na 100°C 30 minuta. Nakon inkubacije uzorke sam ohladila na ledu 5 minuta i centrifugirala na 18 000 g (Eppendorf, 5804R) 15 minuta. Supernatante sam odvojila pazeći na talog i dodala 1 mL destilirane vode, promiješala i ponovila centrifugiranje. Supernatante sam odvojila i talog oprala s 1 mL 100% acetona i centrifugirala 10 minuta, postupak sam ponovila tri puta. Uzorke sam ostavila na sušenju preko noći u digestoru.

Idući dan sam dodala 175 µL 72% sulfatne kiseline i inkubirala ih na sobnoj temperaturi 30 minuta, nakon čega sam ih promiješala i inkubirala daljnjih 15 minuta. Dodala sam 825 µL destilirane vode, promiješala i centrifugirala na 10 000 g 5 minuta.

Baždarnu krivulju izradila sam koristeći otopinu glukoze u destiliranoj vodi koncentracije 1 mg/mL. Standardne otopine pripremila sam u triplikatu pipetirajući 0, 10, 20, 30, i 40 µL glukoze i dodala destilirane vode do 500 µL. Antron (Acros) sam otopila u koncentriranoj sulfatnoj kiselini u koncentraciji 2 mg/mL.

Na pripremljene standarde dodala sam 1 mL antrona i inkubirala ih 30 minuta na 80°C, ohladila na sobnu temperaturu, promiješala i izmjerila apsorbanciju na 625 nm.

Isti postupak ponovila sam i za uzorke pojedinih internodija koje sam izmjerila u triplikatu. Sadržaj celuloze izračunala sam iz baždarne krivulje i izrazila u miligramima po gramu suhe tvari (mg/g s.t.)

2.14. Izolacija genomske DNA iz tkiva

Genomsku DNA izolirala sam iz homogenog uzorka sva tri internodija za pojedinu sortu koristeći pufer koji je sadržavao 2% CTAB (cetil-trimetilamonij bromid), 1 M Tris, 1,4 M NaCl, 0,5% 2-merkaptoetanol i 20mM EDTA (pH=8,0) u konačnim koncentracijama (Šeruga i sur., 2003). Nakon homogenizacije 500 mg tkiva u 1 mL pufera uzorke sam inkubirala 20 minuta na 65 °C, dodala 1 mL kloroforma (99%, p.a.), promiješala i centrifugirala 10 minuta na 10 000 g pri 4 °C. Vodenu fazu prebacila sam u novu tubicu i dodala 1 mL izopropanola, promiješala i ponovila centrifugiranje u trajanju od 15 minuta. Izopropanol sam odvojila, a talog oprala s 1 mL 70% etanola, centrifugirala 10 minuta te talog osušila na sobnoj temperaturi. Talog sam otopila u 50 µL sterilne ultra čiste vode (MiliQ). Koncentraciju DNA izmjerila sam spektrofotometrijski (NanoVue) na 260 i 280 nm s 2µL uzorka i destiliranom vodom kao slijepom probom. Omjer A_{260}/A_{280} bio je u rasponu od 1.9 do 2.0 što je ukazivalo na čistu DNA u uzorku.

2.15. Izolacija ukupne RNA iz tkiva

Prije izolacije RNA bilo je potrebno sterilizirati suđe i ukloniti RNaze koje utječu na uspješnost izolacije RNA. Tarionike, tučke, špatule i pincete namočila sam 1 sat u 0.5 M NaOH, isprala u destiliranoj vodi tretiranoj dietil pirokarbonatom (DEPC, Sigma) i ostavila u sušioniku 2 sata na 200°C. Ultra čistu vodu (Mili Q) također sam tretirala sam s 0.1% DEPC-om (v/v), dobro promiješala i ostavila preko noći i idući dan autoklavirala na 121°C, 15 minuta. Sve plastične nastavke sam prethodno sterilizirala autoklaviranjem.

U sterilne tube od 12 mL izvagala sam oko 0,4 g tkiva, dodala 2 mL TRI Reagent® (Sigma, T9424), promiješala kratko na miješalici, inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega sam dodala 0,4 mL mješavine kloroforma:izoamilnog alkohola u omjeru 1:1 (v/v). Otopinu sam snažno promućkala rukom i centrifugirala 25 minuta

na 3310 g i 4°C. Nakon centrifugiranja vodenu fazu sam pažljivo prenijela u nove tubice i precipitirala dodatkom jednakog volumena izopropanola i ponovo centrifugirala 20 minuta na 16 000 g i 4°C. Dobiveni talog oprala sam s 1mL 75% etanola (v/v) u DEPC vodi, ponovila centrifugiranje, bacila supernatant i osušila talog na zraku.

Talog sam otopila u 100 µL DEPC vode i dodala 100 µL 5M litij klorida (LiCl) za precipitaciju RNA te ostavila da stoji preko noći u hladnjaku na 4°C. Uzorke sam ponovno centrifugirala 30 minuta na 16 000 g, oprala talog u 1 mL 75% etanola, centrifugirala 5 minuta na 4°C i 8000 g. Talog sam resuspendirala u 25 µL DEPC vode i pohranila na -80°C.

Koncentraciju RNA u uzorcima izmjerila sam 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.

2.16. Sinteza cDNA

Prije sinteze cDNA uzorke RNA tretirala sam s DNazom (DNase I, Amplification grade, Invitrogen) prema protokolu proizvođača. Na uzorak koji je sadržavao 1 µg RNA dodala sam 1 µL 10x reakcijskog pufera, 1 µL DNaze (1 U/ µL) i DEPC vode do 10 µL.

Uzorke sam inkubirala na sobnoj temperaturi ne duže od 15 minuta, zatim dodala 1 µL 25mM EDTA (pH=8,0), nakon čega je uslijedila inkubacija 10 minuta na 65°C kako bi se inaktivirala DNaza.

Na tako pripremljene uzorke RNA dodala sam 10 µL smjese za obrnuto prepisivanje (eng. *reverse transcription*, RT) prema protokolu proizvođača (Applied Biosystems) u konačnim koncentracijama kako slijedi: PCR Gold Buffer 1x, $MgCl_2$ 1 mM, dNTP smjesa 0,2 mM, oligo d(T)₁₆ početnice 2,5 µM, inhibitor RNaze (RNasin, Promega) 1U/µL i

MuLV reverzna transkriptaza 2,5 U/ μ L. Ukupni volumen reakcije iznosio je 20 μ L. Sve uzorke i smjese držala sam na ledu tijekom rada.

Reakcija sinteze cDNA odvijala se 10 minuta na 25°C, 25 minuta na 42°C, 5 minuta na 99°C i 5 minuta na 5°C. Uzorke sam pohranila na -20°C do daljnjeg korištenja.

2.17. Izrada početnica

Za analizu ekspresije gena koji sudjeluju u biosintezi lignina odabrala sam gene specifičnog monolignolskog puta - *CCR* i *CAD*, a kao kontrolu ekspresije odabrala sam gen za dehidrogenazu 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 sam izrađivala na temelju sljedova istraživanih gena pohranjenih u bazi EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) pod pristupnim brojem M36650 za *HvGAPDH* (Chojecki i Blaschek, 1986) i AY149607 za *HvCCR* (Larsen, 2004). Sekvenca za *HvCAD* gen pohranjena pod pristupnim brojem X92754 nije omogućila izradu funkcionalnih početnica.

Početnice za *HvCAD* gen izradila sam na temelju pretraživanja baze "Barley Full-Lenght cDNA database" (<http://barleyflc.dna.affrc.go.jp/hvdb/index.html>) i sekvenci za gene koji sudjeluju u sintezi lignina (Matsumoto i sur., 2011). Početnice za gen *HvCAD* kreirala sam na osnovi usporedbe sekvence s kodirajućom sekvencom gena *TaCAD* u pšenici na mjestu najveće homologije između ova dva gena.

Odabrane početnice dodatno sam provjeravala programom Primer3Plus (Untergasser i sur., 2007). U programu sam namjestila postavke kako bi dobivene početnice odgovarale specifičnim uvjetima reakcije qRT-PCR. Poželjno je da početnice budu duljine 18-25 parova baza (pb). Sadržaj GC baza treba biti od 40-60%, a temperatura

tališta (T_m) mora biti $60 \pm 1^\circ\text{C}$, veličina PCR produkta treba biti od 60-150 parova baza. Početnica korištene u reakcijama qRT-PCR nalaze se u tablici 3.

Početnice su otopljene u sterilnoj ultra čistoj vodi u početnoj koncentraciji od $100 \mu\text{M}$ i razrijeđene do $10 \mu\text{M}$. Sve otopine su čuvane na -20°C .

Tablica 3. Nukleotidni sljedovi početnica korišteni u reakcijama PCR i qRT-PCR.

Naziv gena	Uzvodna početnica (F) 5'→3'	Nizvodna početnica (R) 5'→3'
<i>HvGAPDH</i>	ATCATTCCAAGCAGCACTGG	GCCATTCCAGTCAACTTTCC
<i>HvCCR</i>	GAAGCAGCCTTACAAGATGTCC	TCGTACAACGACGTCTACACC
<i>HvCAD</i>	CGTACAGAGAGTCGTTACAGG	TCACCACGAACTTCTGATCG

2.17.1. Provjera početnica lančanom reakcijom polimeraze

Kvalitetu početnica provjerila sam lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR). Reakcija se sastojala od 1x PCR Gold Buffer, 1,5 mM MgCl_2 , dNTP smjesa 0,2 mM, Ampli Taq Gold polimeraze (Applied Biosystems) 0,5 U/ μL , 250 nM uzvodne i nizvodne početnice za *HvGAPDH* gen, te kao kalup ili 50 ng genomske DNA (pozitivna kontrola) ili 1-2 μL cDNA kalupa ovisno o uzorku u konačnom volumenu od 20 μL . Negativna kontrola sadržavala je odgovarajući volumen sterilne destilirane vode umjesto kalupa. Reakcija PCR-a odvijala se prema sljedećem protokolu (Mastercycler gradient, Eppendorf): inicijalna denaturacija 5 minuta na 95°C , 35 ciklusa denaturacije na 95°C 45 s, prijanjanje 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 .

2.18. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Ekspresiju gena *HvCCR* i *HvCAD* u internodijima ječma mjerila sam kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. real-time PCR, quantitative RT-PCR, qRT-PCR).

2.18.1. Mjerenje efikasnosti kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

U cilju što preciznijeg mjerenja ekspresije pojedinog gena potrebno je prethodno odrediti efikasnost vezanja pojedinog para početnica na kalup (Pfaffl, 2004). Dobivene vrijednosti nam govore o kvaliteti kalupa i specifičnosti početnica i ukazuju na njihov optimalan odnos. Vrijednosti efikasnosti smiju se kretati od 95-110% (Bustin, 2004).

Sve uzorke cDNA iz pojedine sorte sam pomiješala i napravila decimalna razrjeđenja zajedničkog uzorka cDNA od 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} . Svaki uzorak nanijela sam u triplicatu na optičku mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića (Applied Biosystems), uključujući i negativnu kontrolu za svaki gen koja je umjesto kalupa sadržavala sterilnu ultra čistu vodu u istom volumenu. Sastav reakcijske smjese u ukupnom volumenu od 20 μ L napravila sam prema uputama proizvođača (Applied Biosystems) koristeći Power Sybr Green master mix 1x, 250 nM specifične uzvodne i nizvodne početnice i 5 μ L cDNA kalupa.

Baždarnu krivulju sam dobila na temelju ovisnosti Ct vrijednosti o razrjeđenju uzoraka cDNA. Iz nagiba pravca sam izračunala efikasnost (E) prema matematičkom izrazu (Higuchi i sur., 1993; Rasmussen, 2001):

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{nagib pravca}}\right)} - 1$$

2.18.2. Mjerenje ekspresije gena *HvCCR* i *HvCAD* u ječmu

Za mjerenje ekspresije gena koristila sam isti sastav reakcijske smjese kao i za mjerenje efikasnosti. Na optičku mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića nanosila sam svaki uzorak u triplikatu za svaki od gena (*HvGAPDH*, *HvCCR* i *HvCAD*) i za negativnu kontrolu koja je sadržavala sterilnu ultra čistu vodu u istom volumenu umjesto cDNA. Koristila sam cDNA uzoraka razrijeđenu 100 puta (10^{-2}) u ukupnom volumenu reakcije od 20 μ L zbog optimalnog odnosa količine početnica i kalupa. Sve reakcije qRT-PCR, i one za mjerenje efikasnosti i one za određivanje ekspresije gena, provela sam na uređaju ABI 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) pri istim uvjetima: aktivacija na 50°C 2 min, denaturacija na 95°C 10 min, 40 ciklusa denaturacije na 95°C 15 s, sparivanje početnica i produljivanje lanca na 60°C 1 min te završni korak na 5°C i 5 min. Nakon svake reakcije qRT-PCR slijedio je korak mjerenja disocijacijske krivulje kako bi se vidjelo da li dolazi do nastanka nespecifičnih produkata.

2.18.3. Kvantifikacija rezultata ekspresije gena

Za izračun ekspresije gena *HvCCR* i *HvCAD* koristila sam metodu relativne kvantifikacije (Pfaffl, 2006). Dobivene rezultate normalizirala sam u odnosu na gen *HvGAPDH* (kontrolni gen). Za izračun ekspresije gena *HvCCR* i *HvCAD* u ječmu koristila sam matematički izraz koji uključuje i korekciju na osnovu dobivene efikasnosti (Pfaffl, 2006) unutarnje kontrole i ciljnog gena.

$$omjer = \frac{(E_{ref})^{Ct\ uzorak}}{(E_{target})^{Ct\ uzorak}} : \frac{(E_{ref})^{Ct\ kalibrator}}{(E_{target})^{Ct\ kalibrator}}$$

(E=efikasnost ; ref= kontrolni gen; target=ciljni gen)

Ekspresija istraživanih gena prvo se normalizira u odnosu na kontrolni gen u istom uzorku, a taj broj se zatim može koristiti za usporedbu ekspresije istraživanih gena u različitim internodijima i sortama.

Rezultat gore navedenog omjera govori koliko je pojedini istraživani gen nakon normalizacije u odnosu na kontrolni gen jače ili slabije eksprimiran u odnosu na kalibrator. Kalibratoru se pridružuje vrijednost 1. Značajnu promjenu u jačini ekspresije smatrala sam sve što je 2 puta veće, odnosno upola manje u odnosu na vrijednost kalibratora. Standardnu devijaciju izračunala sam iz srednje vrijednosti tri replike istog uzorka.

2.18.4. Elektroforeza DNA odsječaka u agaroznom gelu

Nakon reakcije PCR-a produkte sam razdvajala koristeći 2% agarozni gel u 1X TAE puferu (Tris-acetat EDTA, pH=8,0) pri 100V (RunOne electrophoresis cell, Embi Tec) koristeći 50kb DNA marker (Sigma).

2.19. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka koristila sam analizu varijance (engl. analysis of variance, ANOVA) jednosmjernu i multifaktorijalnu. Testovi statističke značajnosti uključivali su Fisher's LSD test (engl. least significant difference) za analizu aktivnosti gvajakol peroksidaza i lignina, te DMRT (engl. Duncan multiple range test) za analizu polifenola i celuloze. Sve analize provedene su uz pomoć računalnog programa Statistica 7.1. (StatSoft, Inc. 2005).

3. REZULTATI

3.1. Razvojne faze ječma

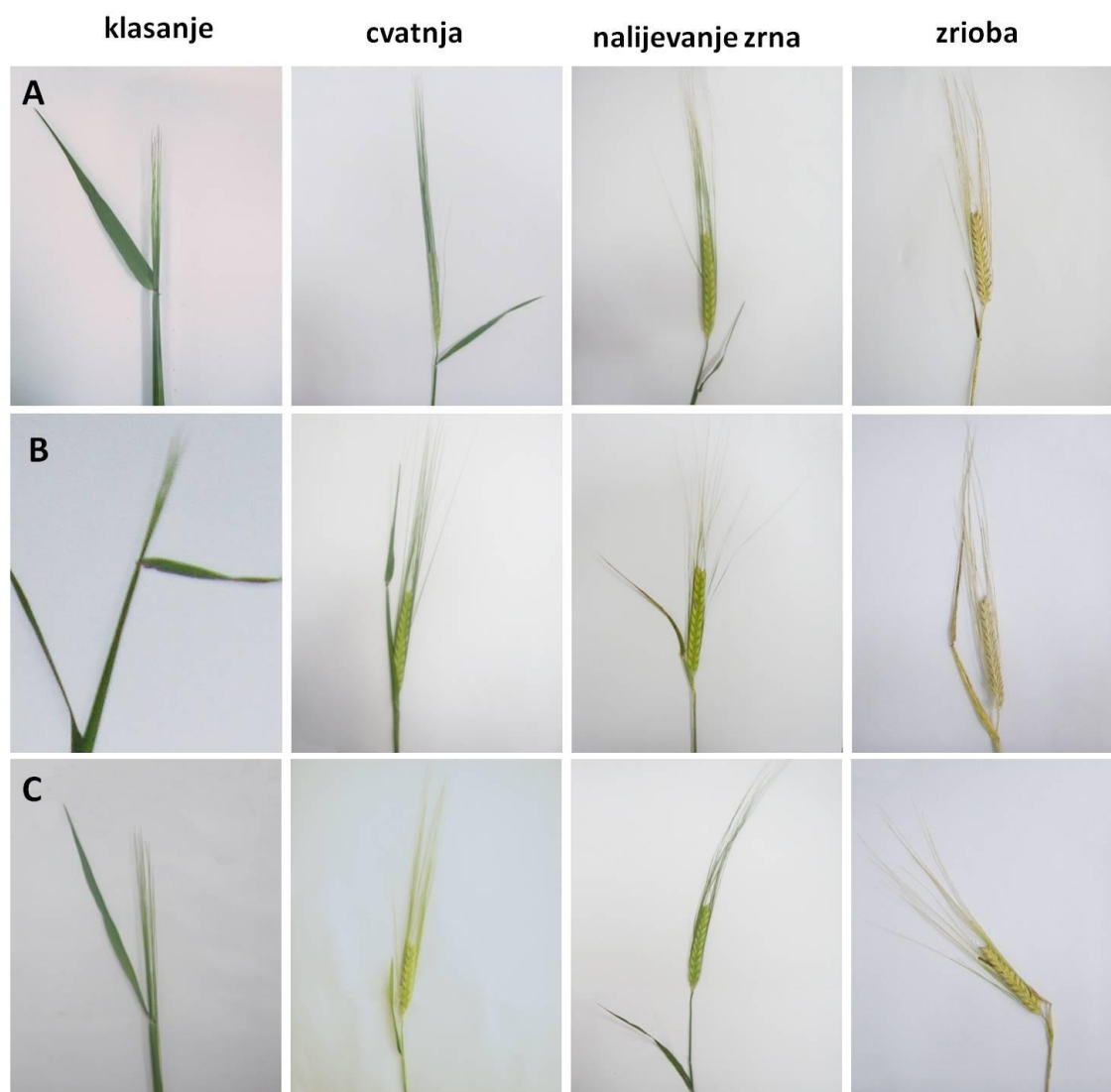
Tijekom uzorkovanja faze sam određivala na temelju morfoloških karakteristika vršnog dijela ječma (slika 17). Uzorkovanje je započelo s fazom klasanja koju karakterizira izlazak klasa iz rukavca lista. Sorta Astor prva je započela s klasanjem, a deset dana kasnije započelo je i klasanje u sortama Scarlett i Jaran. Sljedeća uzorkovanja uslijedila su u razmacima od deset dana i poklapala su se s fazom cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe. Obzirom da sam uzorke uzimala s pokusnih polja (Poljoprivredni institut Osijek), predviđeni termin uzorkovanja ovisio je o vremenskim uvjetima. Podatke o dnevnim oborinama i srednjim dnevnim temperaturama za 2010. i 2011. godinu dobila sam od Državnog hidrometeorološkog zavod Republike Hrvatske, a prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Prosječna temperatura i količina oborina* u vrijeme uzorkovanja biljnog materijala.

mjesec	Prosječna temperatura u °C		Maksimalna dnevna temperatura u °C		Minimalna dnevna temperatura u °C		Dnevne oborine u mm	
	2010.	2011.	2010.	2011.	2010.	2011.	2010.	2011.
svibanj	16,5 ± 3,5	16,7 ± 4,0	21,9 ± 5,0	22,9 ± 4,7	11,8 ± 2,3	10,1 ± 3,8	120,8	81,2
lipanj	20,4 ± 4,6	20,8 ± 2,8	25,2 ± 5,8	27,1 ± 2,7	15,5 ± 3,2	14,7 ± 2,5	234,0	49,9

*Podaci Državnog hidrometeorološkog zavoda RH

U 2010. godini razdoblje u kojem sam uzorkovala biljni materijal (svibanj i lipanj) obilježila je obilna kiša koja je onemogućavala uzorkovanje točno na deseti dan, kako sam planirala, pa sam uzorke uzimala s razmakom od ± 2 dana. Vremenski uvjeti u 2011. godini nisu utjecali na termine uzorkovanja te je bilo provedeno svaki deseti dan.



Slika 17. Morfološke osobine vršnog dijela ječma tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba. A) sorta Astor, B) sorta Scarlett i C) sorta Jaran.

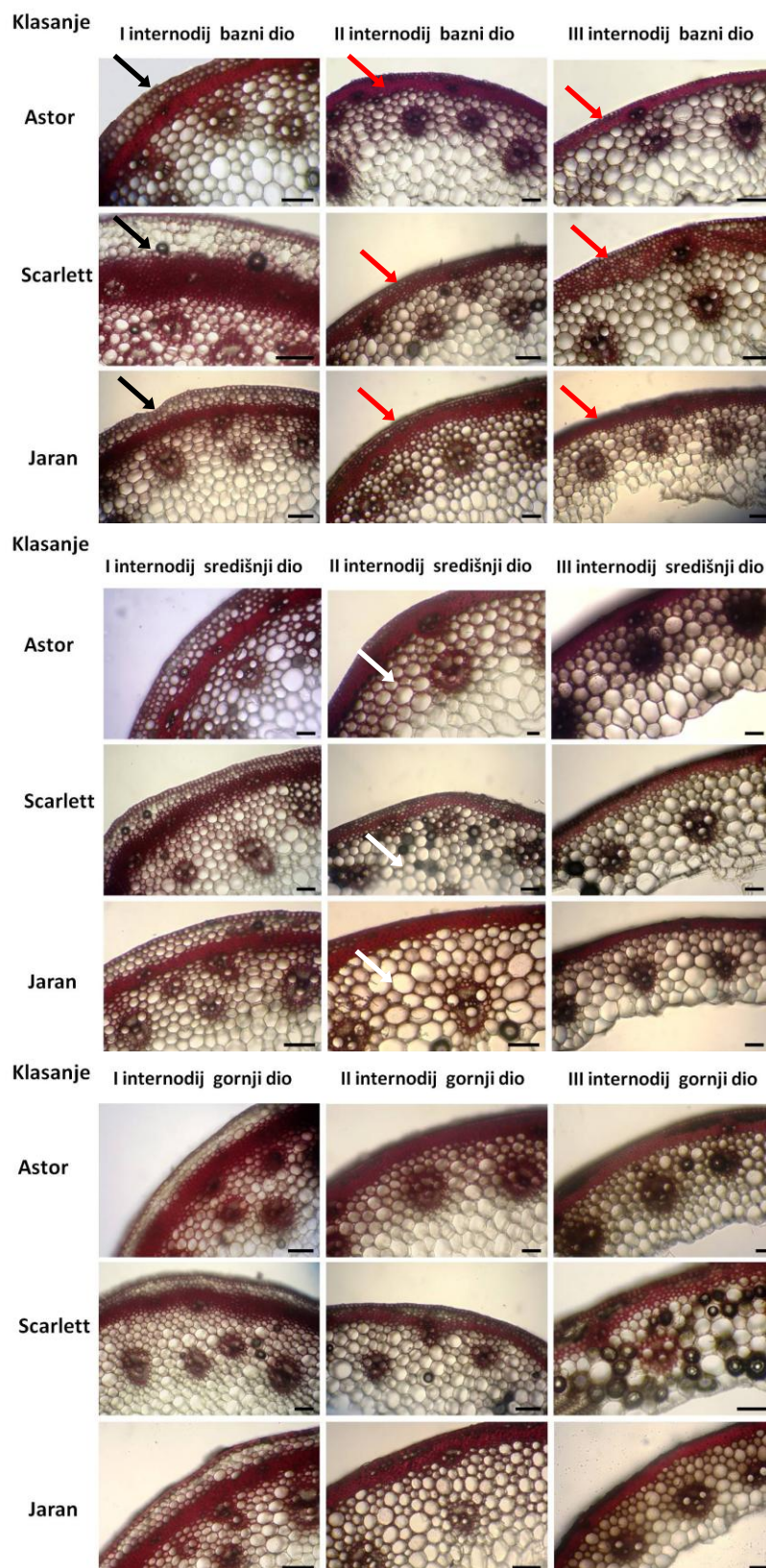
3.2. Lignifikacija stanične stijenske

3.2.1. Histokemijski dokazi lignina

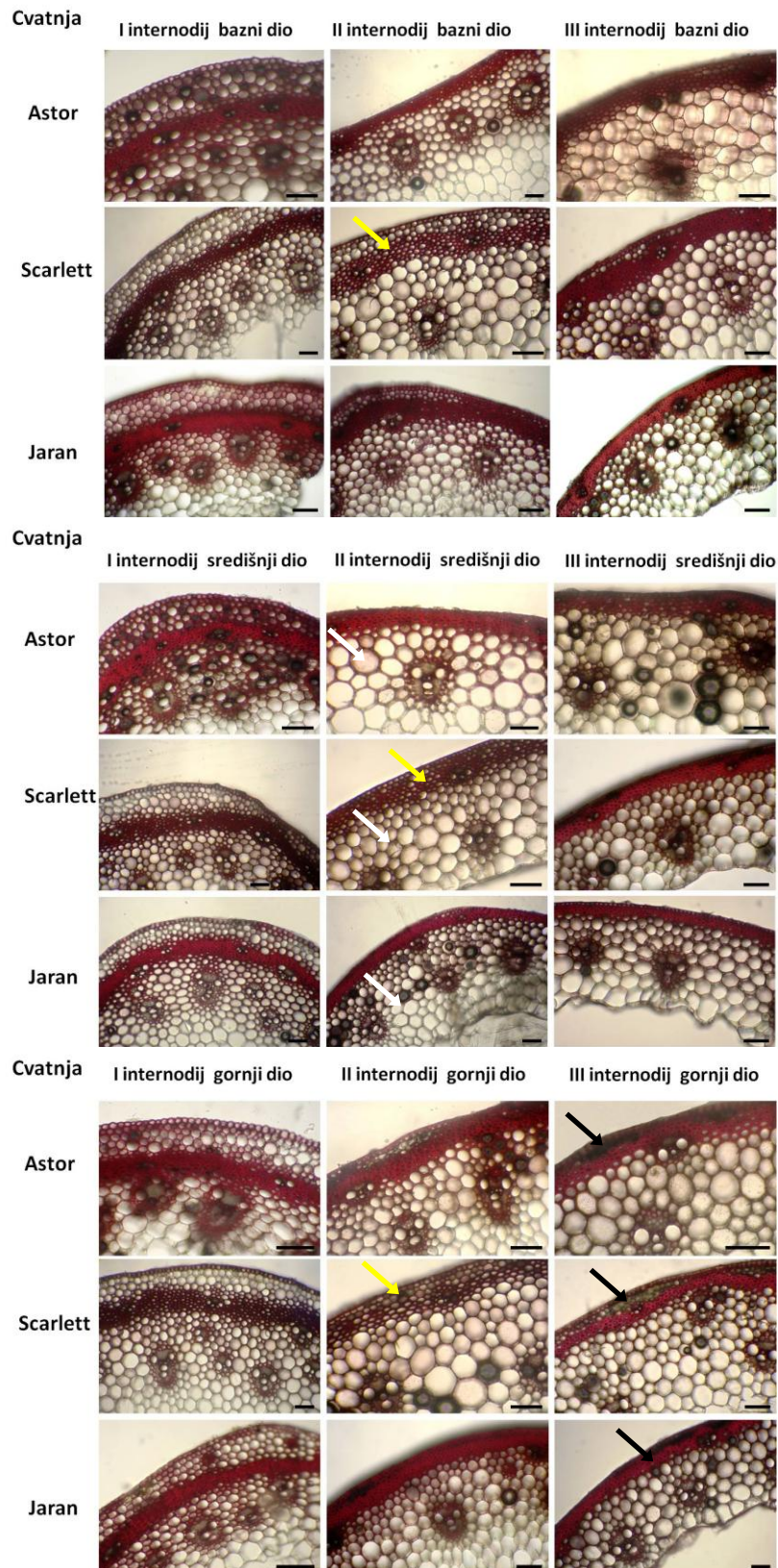
Prisutnost lignina u internodijima tri sorte jarog ječma, Astor, Scarlett i Jaran, dokazana je pomoću Wiesnerove reakcije (floroglucinol-HCl). Mikroskopskom analizom utvrđena je lokalizacija lignina na poprečnim prerezima tri internodija. Stanice s lignificiranim stijenkama prisutne su u epidermi, području kore i djelomično u parenhimu kao i u provodnim snopićima (ksilem) svih sorti.

Prvi internodij razlikuje se u građi od ostala dva internodija, a karakterizira ga prstenasti sloj stanica–sklerenhimski prsten, koji se nalazi u području kore bliže epidermi (slika 18-21) u svim sortama. Najveći sadržaj lignina u prvim internodijima upravo se zamjećuje u prstenastom sloju, koji je udaljen nekoliko slojeva stanica od epiderme, tijekom sve četiri razvoje faze klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba (slika 18, crne strelice). U drugom i trećem internodiju svih sorti jarog ječma prstenasti sloj stanica nalazi se periferno, odnosno bliže epidermi (slika 18, crvene strelice). U provodnim snopićima također se zamjećuju lignificirane stanice, u području ksilema, te u sklerenhimu koji ih okružuje. Stanice parenhima svih sorti ječma slabije su lignificirane u odnosu na stanice epiderme i kore u svim razvojnim fazama i u sva tri internodija, a lignifikacija se smanjuje prema unutrašnjosti stabljike (slika 18-21, bijele strelice).

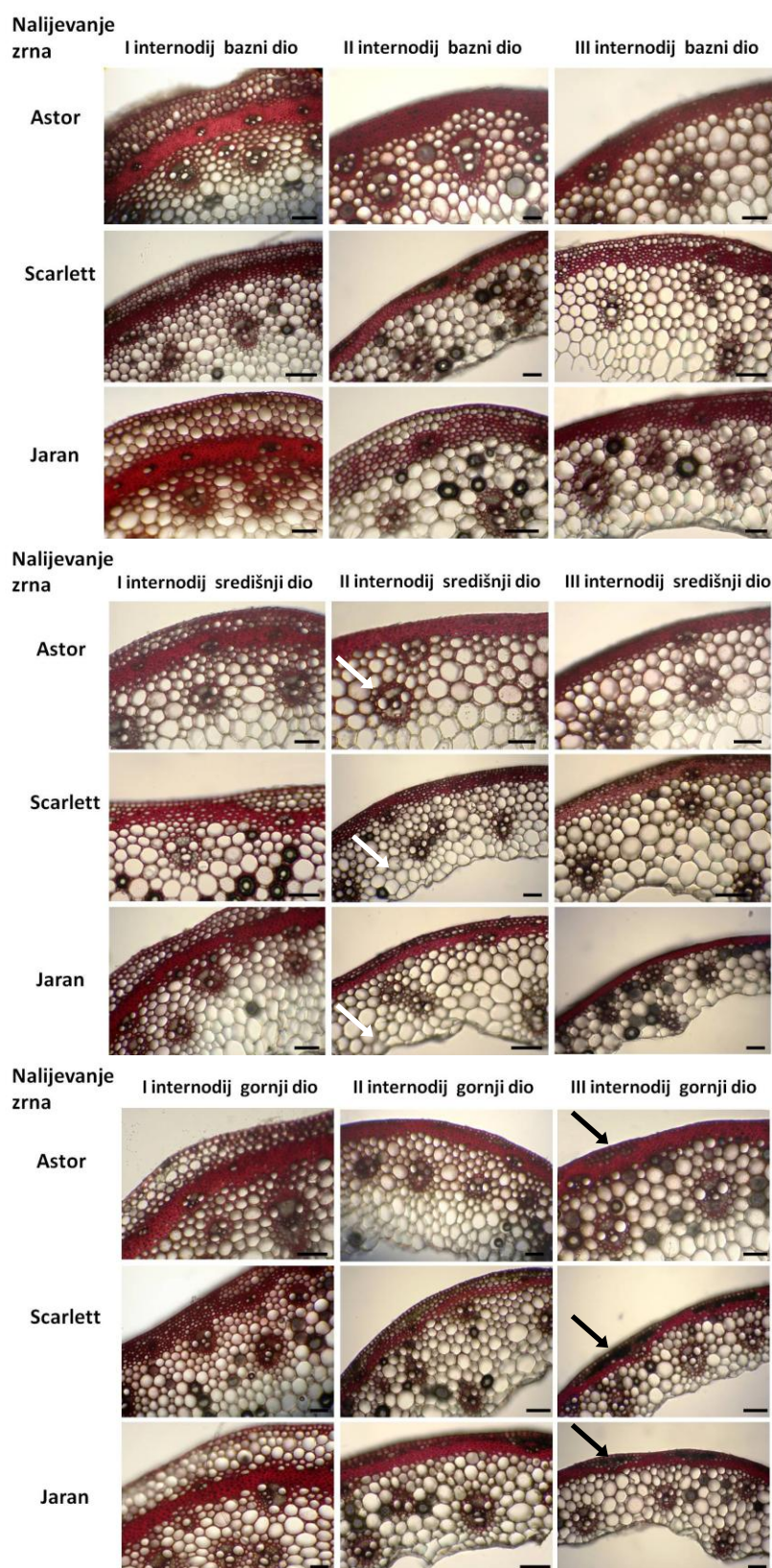
Tijekom cvatnje (slika 19, crne strelice) i nalijevanja zrna (slika 20, crne strelice) u gornjem dijelu trećeg internodija zamijećeni su dijelovi parenhima sa slabije lignificiranim stijenkama koji se nalaze između sklerenhimskog prstena bliže epidermi u svim sortama. Također u sorti Scarlett u središnjem dijelu sva tri internodija stanice sklerenhimskog prstena nešto su manje lignificirane u odnosu na druge sorte (slika 19, žute strelice). U fazi zriobe (slika 21) nema promjena u odnosu na prethodne razvojne faze. Najviše lignina lokalizirano je u sklerenhimskom prstenu duž svih internodija u svim sortama (slika 21, crne strelice), a najmanje u području parenhima (slika 21, bijele strelice). Lokalizacija lignina u epidermi, području kore i parenhimu ne mijenja se tijekom razvoja.



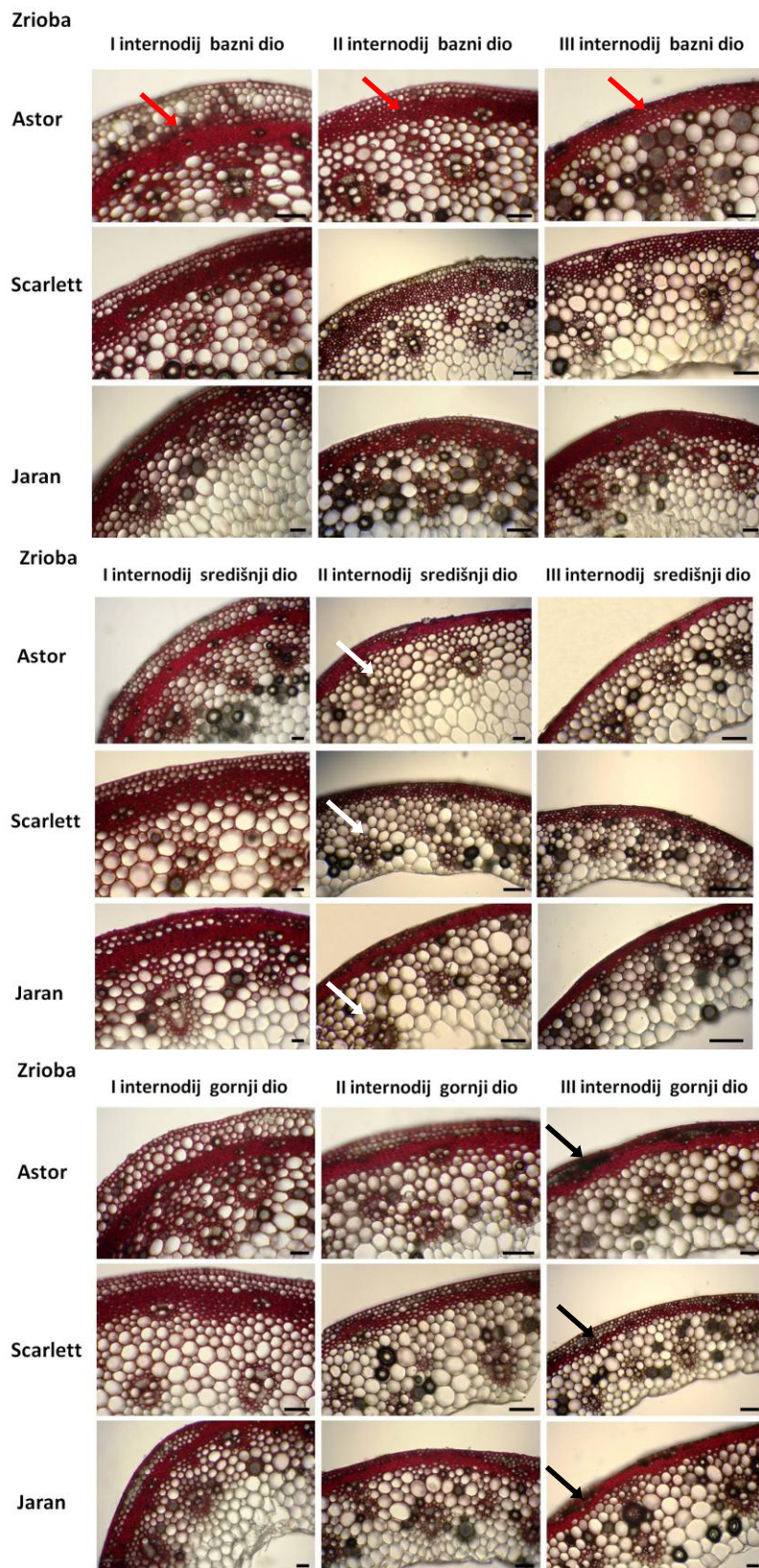
Slika 18. Lokalizacija lignina (crvena boja) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi klasanja. Najviše je lignina u prstenastom sloju duž cijelog prvog internodija (crna strelica) i u kori drugog i trećeg internodija (crvena strelica). Stanice parenhima slabije su lignificirane u odnosu na epidermu i koru (bijele strelice, označeno samo na središnjem dijelu drugog internodija). Bar =500 μ m.



Slika 19. Lokalizacija lignina (crvena boja) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi cvatnje. U gornjem dijelu trećeg internodija u području kore, uz epidermu, uočavaju se manje lignificirane stanice (crna strelica). U sorti Scarlett u svim dijelovima drugog internodija u sklerenhimskom prstenu stijenke su manje lignificirane (žuta strelica). Stanice parenhima slabije su lignificirane u odnosu na epidermu i koru (bijeले strelice, označeno samo na središnjem dijelu internodija). Bar =500 μm.



Slika 20. Lokalizacija lignina (crvena boja) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi nalijevanja zrna. U gornjem dijelu trećeg internodija u području kore, uz epidermu, uočavaju se manje lignificirane stanice u svim sortama (crna strelica). Stanice parenhima slabije su lignificirane u odnosu na epidermu i koru (bijeke strelice, označeno samo na središnjem dijelu internodija). Bar =500 μ m.

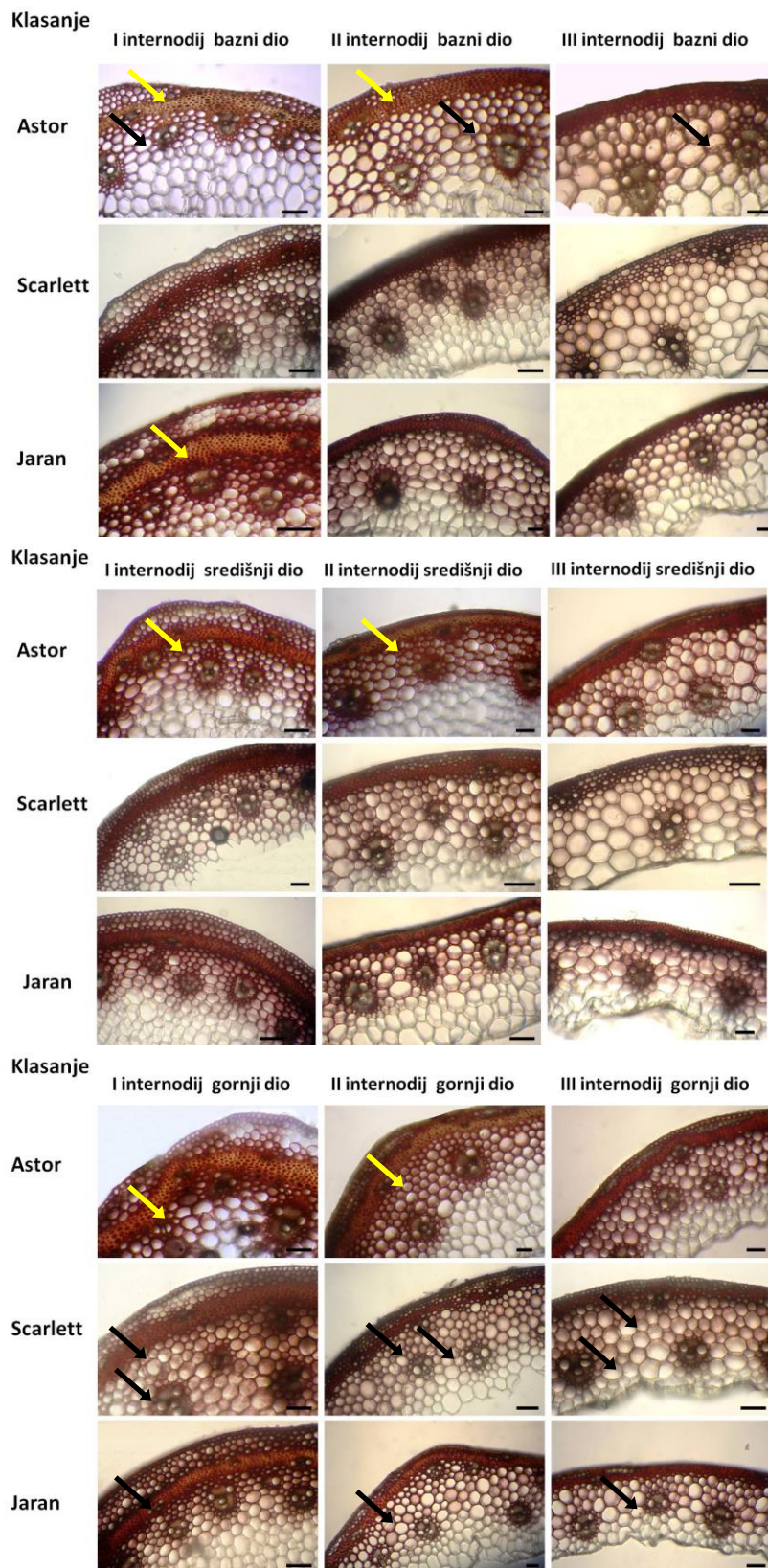


Slika 21. Lokalizacija lignina (crvena boja) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi zriobe. Najviše lignina zamjećuje se u sklerenhimskom prstenu (crvena strelica označeno samo na sorti Astor), a najmanje u parenhimskim stanicama svih internodija u svim sortama (bijela strelica, označeno samo na središnjem dijelu). U gornjem dijelu trećeg internodija u području kore, uz epidermu, uočavaju se manje lignificirane stanice u svim sortama (crna strelica). Bar =500 μ m.

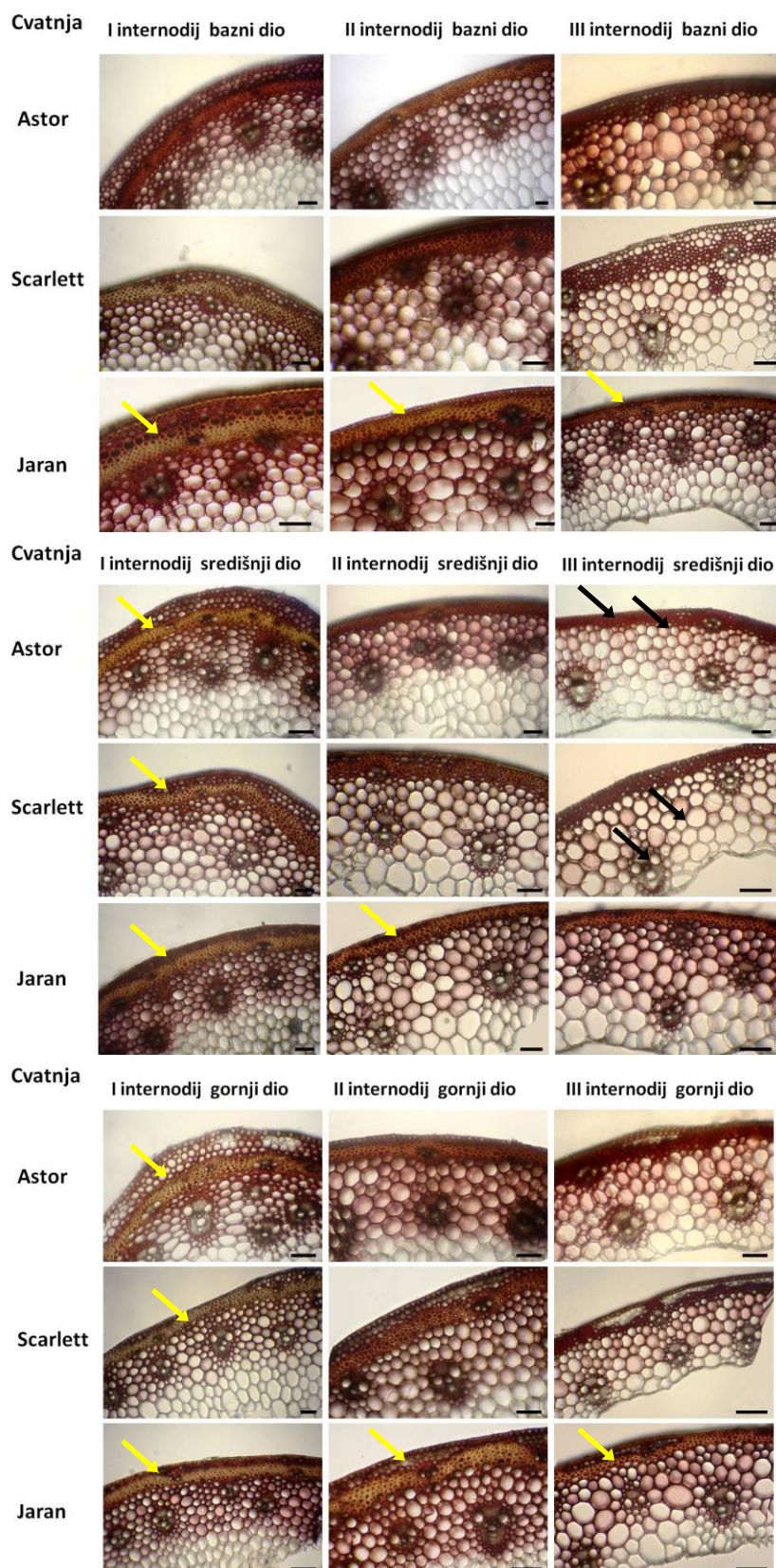
Prisutnost i lokalizacija ligninskih podjedinica, sirigilnih (S) i gvajacilnih (G), u internodijima tri sorte jarog ječma—Astor, Scarlett i Jaran utvrdila sam pomoću Maüleove reakcije. Reakcijom s permanganatom siringilne podjedinice boje se crveno, a gvajacilne žuto. U svim sortama jarog ječma u epidermi, provodnim snopićima svih internodija uočavaju se S podjedinice u svim razvojnim fazama, od faze klasanja do faze zriobe, (slika 22 - 24, crne strelice). U gornjem dijelu parenhima, bliže kori, stijenke stanica su više lignificirane u usporedbi sa stanicama bliže sredini stabljike i lignin je bogatiji podjedinicama S, a podjedinice G su manje zastupljene (slika 22-24, crne strelice).

U središnjem dijelu internodija, u području kore, uočavaju se podjedinice S i G u podjednakom omjeru u svim razvojnim fazama: klasanje (slika 22, crne i žute strelica), cvatnja (slika 23, crne i žute strelica), nalijevanje zrna (slika 24, crne i žute strelica) i zriobi (slika 24, crne i žute strelica).

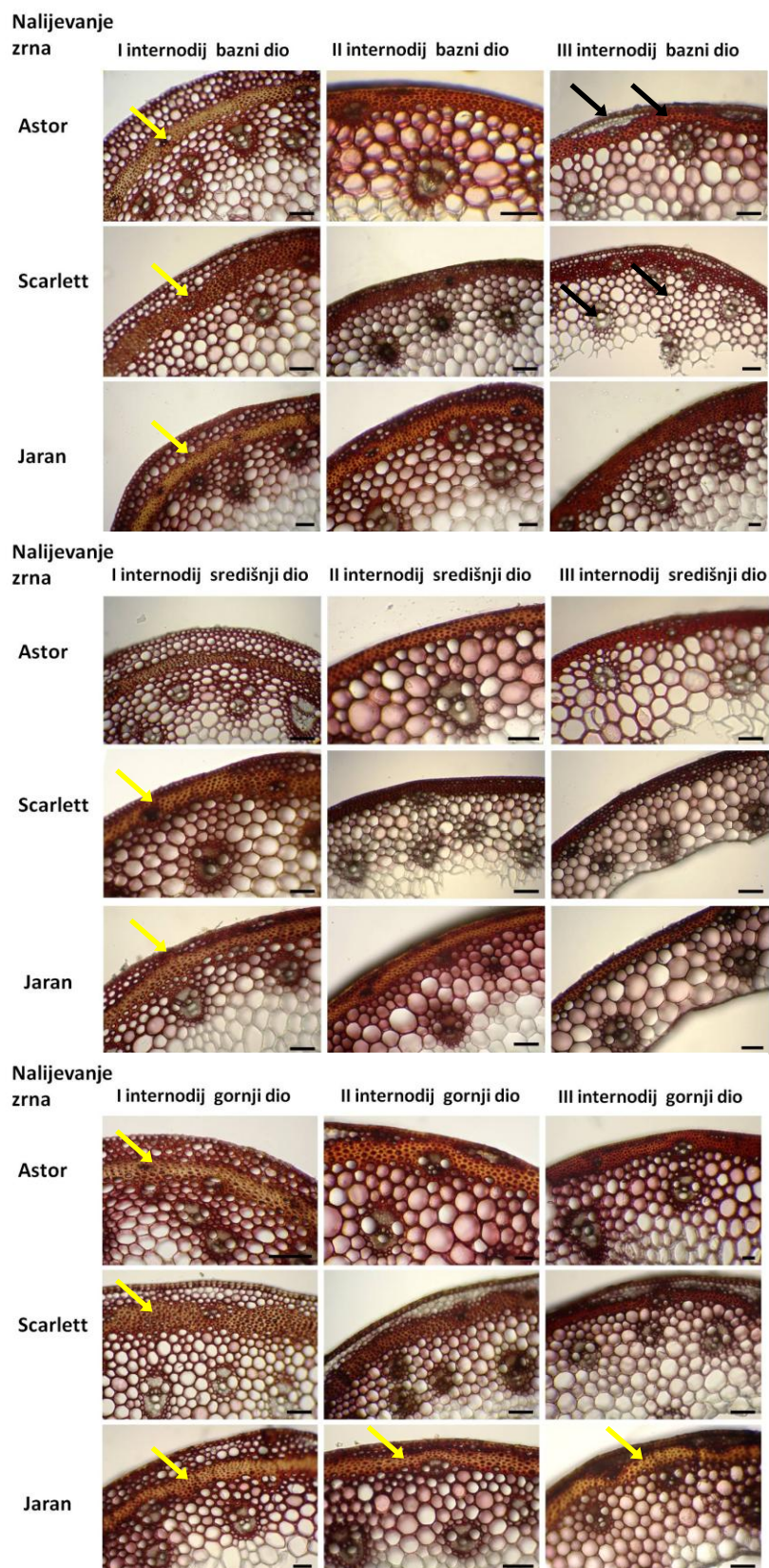
Podjedinice G brojnije su u baznim dijelovima internodija koji graniče s interkalarnim meristemima, ali prisutne su i u središnjim i gornjim dijelovima pojedinih sorti tijekom razvoja. U fazi klasanja uočavaju se u baznim, središnjim i gornjim dijelovima prvog i drugog internodija u području kore (sklerenhimski prsten) u svim sortama jarog ječma (slika 22, žute strelice). U fazi cvatnje podjedinice G uočavaju se u baznom i gornjem dijelu svih internodija sorte Jaran, središnjem dijelu prvog i drugog internodija sorte Jaran te središnjem i gornjem dijelu prvog internodija sorti Astor i Scarlett (slika 23, žute strelice). Tijekom razvojne faze nalijevanje zrna podjedinice G uočavaju se u baznom dijelu prvog internodija svih sorti jarog ječma, u središnjem dijelu sorti Scarlett i Jaran te u gornjim dijelovima prvog internodija sorti Astor i Scarlett, a u sorti Jaran u gornjem dijelu svih internodija (slika 24, žute strelice). U fazi zriobe podjedinice G uočavaju se u baznim dijelovima prvog internodija sorte Astor, prvog i drugog sorte Scarlett te drugog internodija sorte Jaran. U središnjim dijelovima prvih internodija istraživanih sorti uočavaju se podjedinice G, a u gornjim dijelovima u svim internodijima sorte Jaran i prvom internodiju sorte Astor (slika 25, žute strelice).



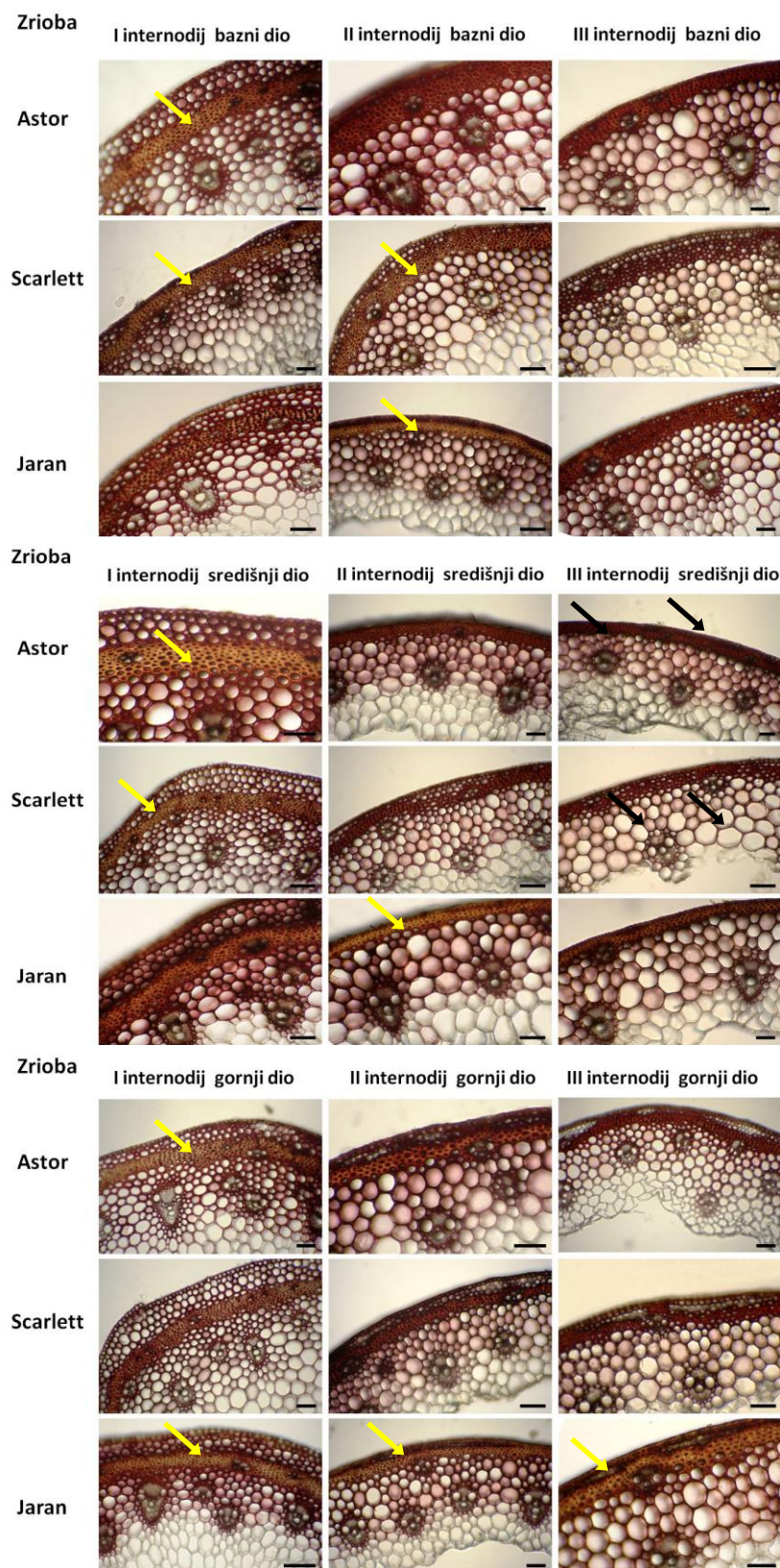
Slika 22. Prisutnost i lokalizacija ligninskih podjedinica Maüleovom reakcijom u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi klasanja. Siringilne (S) podjedinice boje se crveno u epidermi i kori (crne strelice, oznake na sorti Astor) i u provodnim snopićima i parenhimu (crne strelice, oznake na sorti Scarlett). Gvajacilne (G) podjedinice boje se žuto u području kore (žute strelice). Bar= 500 µm.



Slika 23. Prisutnost i lokalizacija ligninskih podjedinica Maüleovom reakcijom u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi cvatnje. Siringilne (S) podjedinice boje se crveno u epidermi i kori (crne strelice, oznake na sorti Astor) i u provodnim snopićima i parenhimu (crne strelice, oznake na sorti Scarlett). Gvajacilne (G) podjedinice boje se žuto u području kore (žute strelice). Bar= 500 µm.



Slika 24. Prisutnost i lokalizacija ligninskih podjedinica Maüleovom reakcijom u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi nalijevanja zrna. Siringilne (S) podjedinice boje se crveno u epidermi i kori (crne strelice, oznake na sorti Astor) i u provodnim snopićima i parenhimu (crne strelice, oznake na sorti Scarlett). Gvajacilne (G) podjedinice boje se žuto u području kore (žute strelice). Bar= 500 µm.



Slika 25. Prisutnost i lokalizacija ligninskih podjedinica Maüleovom reakcijom u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi zriobe. Siringilne (S) podjedinice boje se crveno u epidermi i kori (crne strelice, oznake na sorti Astor) i u provodnim snopićima i parenhimu (crne strelice, oznake na sorti Scarlett). Gvajacilne (G) podjedinice boje se žuto u području kore (žute strelice). Bar= 500 µm.

3.2.2. Ulaganje lignina u staničnu stijenku

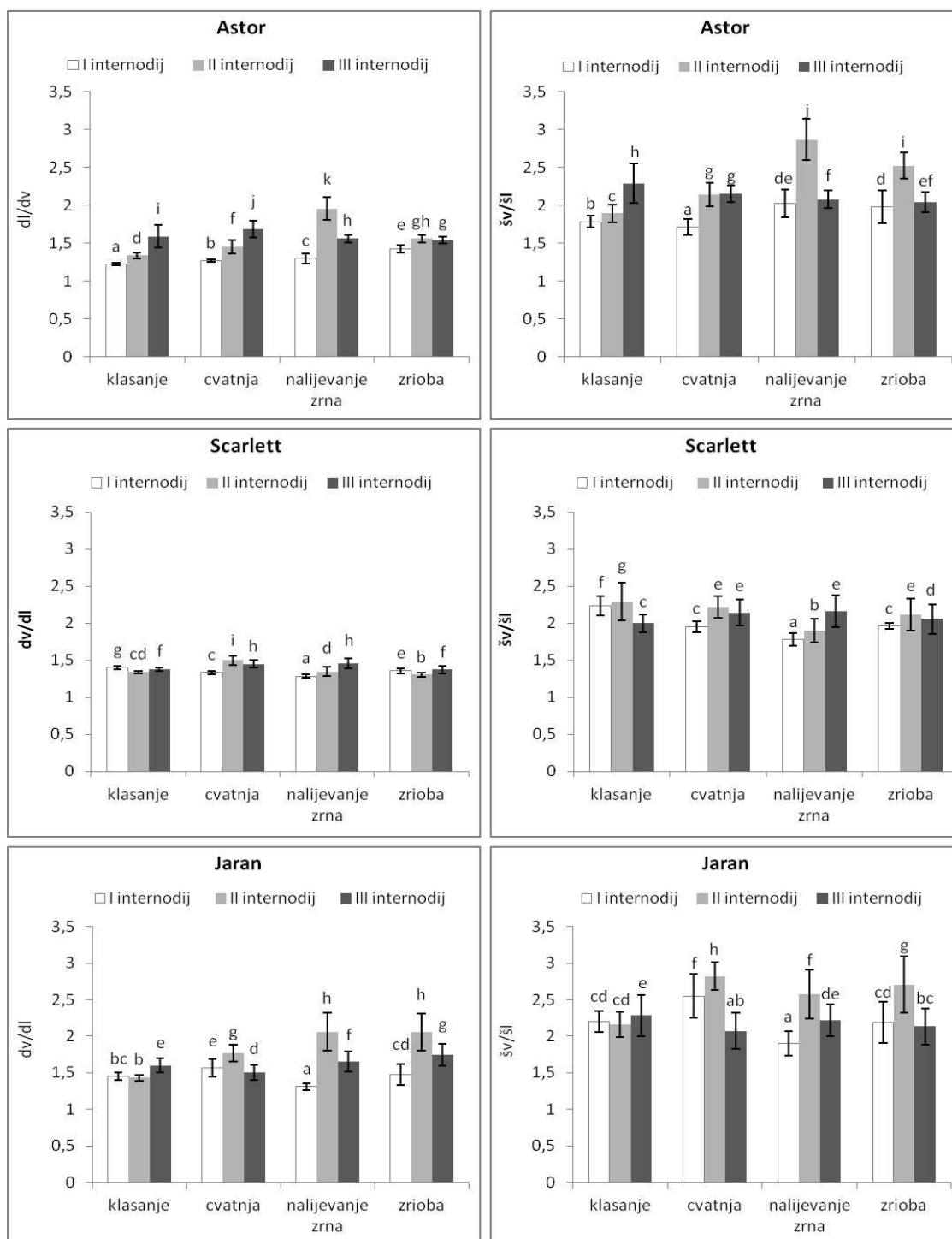
Lignifikacija započinje u kutovima stanice i središnjoj lameli i kreće se u smjeru unutrašnjosti stanice. Ulaganjem lignina u staničnu stijenku dolazi do povećanja njezine debljine što se uočava kao smanjenje lumena stanice. Kako bih izračunala promjenu debljine stanične stijenke tijekom četiri razvojne faze: klasanja, cvatnje, nalijevanje zrna i zriobe u internodijima ječma, izmjerila sam vanjsku dimenziju i dimenziju lumena, odnosno duljinu i širinu, u stanicama epiderme, kore i parenhima. U svrhu izračuna koeficijenta lignifikacije stanica, vrijednosti sam prikazala kao omjer duljine vanjskog ruba i duljine lumena te širine vanjskog ruba i širinu lumena. Što je omjer veći, više je lignina u stanicama i obrnuto.

Omjer dv/dl opisuje debljinu stanične stijenke tangencijalno, a omjer $šv/šl$ opisuje koliko se stijenka tijekom razvoja zadebljala u širinu odnosno radijalno.

U stanicama epiderme sorte Astor (slika 26) debljina stijenke, kao posljedica ulaganja lignina, povećava se tijekom razvoja od klasanja do nalijevanja zrna. Najdeblju stijenku imaju stanice epiderme u prvom internodiju za razliku od trećeg gdje je ona manja za 20%. U prvom internodiju stijenka je najdeblja u fazi klasanja, u drugom u fazi nalijevanja zrna, a u trećem u cvatnje u duljini i širini stanice. Usporedbom debljine stijenke stanica epiderme u internodijima sorte Astor najdeblju stijenku ima drugi internodiju u fazi nalijevanja zrna, a najmanju prvi internodij u fazi klasanja.

Debljina stijenki epidermalnih stanica sorte Scarlett (slika 26) u prvom internodiju opada tijekom sazrijevanja, najveća je u fazi klasanja, a smanji se u trećoj fazi, nalijevanje zrna za 10% u duljinu i 20% u širinu stanice, odnosno tangencijalno i radijalno. U drugom internodiju do smanjenja debljine stijenke dolazi već u fazi cvatnje, gdje je ona manja za 10% u odnosu na fazu klasanja. U trećem internodiju debljina stijenke jednaka je u fazi klasanja i zriobi te u fazi cvatnje i nalijevanja zrna gdje je ujedno najveća debljina stijenke. Uspoređujući međusobno tri internodija po razvojnim faza u klasanju je stijenka najdeblja u prvom internodiju, u cvatnji u drugom, a u fazi nalijevanja zrna i zriobe u trećem internodiju. Ukupno najmanju debljinu stijenke stanica epiderme izmjerila sam u prvom internodiju u fazi nalijevanja zrna.

Stijenke epidermalnih stanica sorte Jaran najdeblje su u drugom internodiju u usporedbi s prvim i trećim u fazi cvatnje, nalijevanja zrna i zrioba (slika 26). U prvom i drugom internodiju debljina stijenke značajno se povećava u fazi cvatnje, a u trećem u fazi nalijevanja zrna.

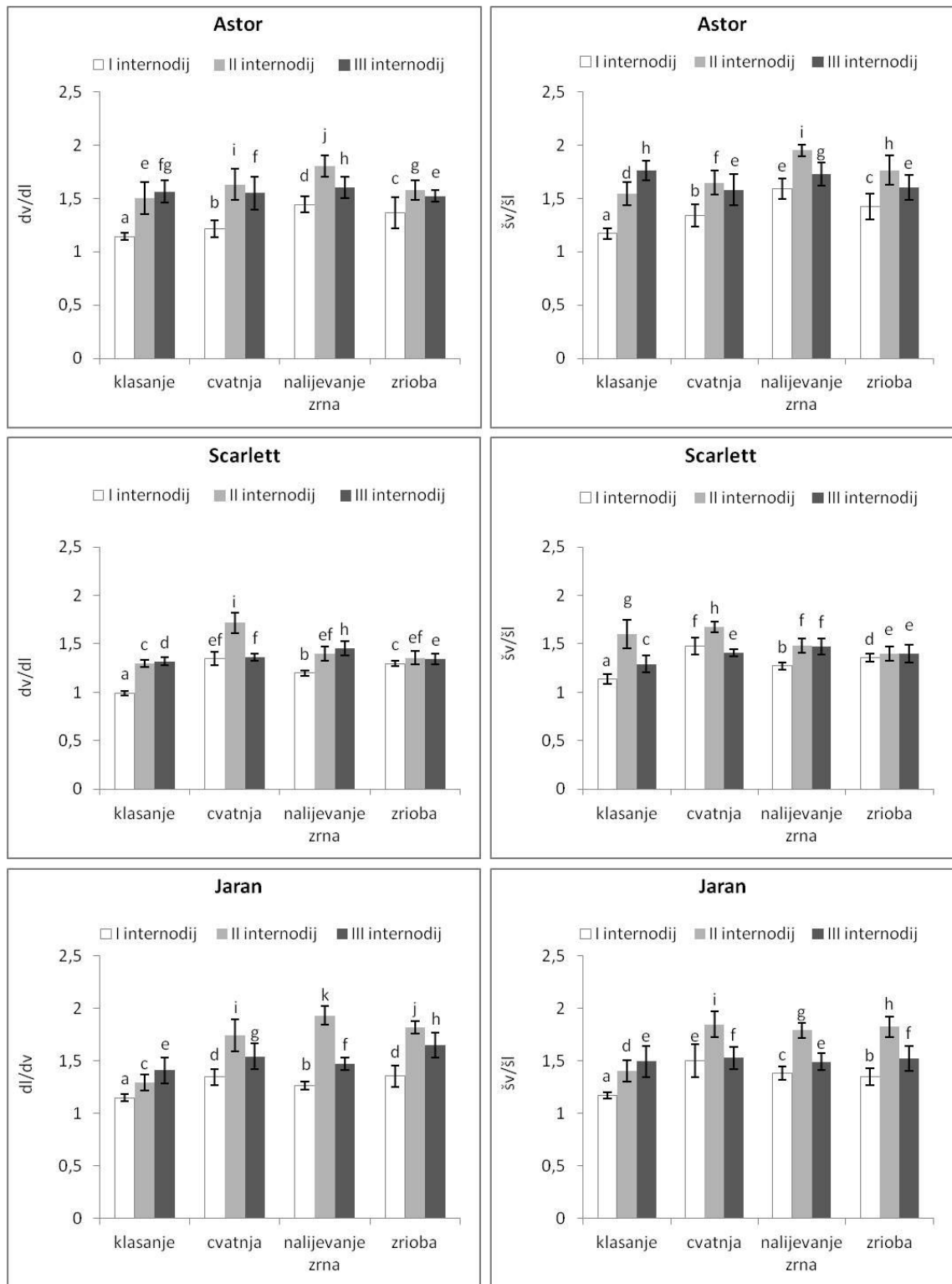


Slika 26. Debljina stijenke stanica epiderme u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze. Vrijednosti su izražene kao omjer duljine vanjskog ruba i lumena (dv/dl) te širine vanjskog ruba i lumena ($šv/šl$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost 100 mjerenja, $n=100$).

Sloj kore karakteriziraju sklerenhimske stanice u kojima je debljina stanične stijenke u prvim internodijima manja u usporedbi s drugim i trećim tijekom sve četiri razvojne faze u sorti Astor (slika 27). Uzimajući u obzir oba omjera, stijenka je najdeblja u fazi nalijevanja zrna u sva tri internodija sorte Astor, a u prvom i drugom internodiju za 20% u odnosu na klasanje. Do smanjenja debljine stijenke dolazi u fazi zriobe u svim internodijima u odnosu na fazu nalijevanja zrna.

U sorti Scarlett (slika 27) u svim internodijima debljina stijenke se povećava tijekom razvoja, a time i njezina lignifikacija. Do značajnog zadebljanja stijenke od 30% dolazi u fazi cvatnje u prvom i drugom , a u fazi nalijevanja zrna u trećem internodiju za 10% u odnosu na klasanje.

Debljina stijenki stanica (dv/dl) u području kore sorte Jaran (slika 27) povećava se tijekom razvoja. Značajno povećanje uočava se u fazi cvatnje, za 15% u prvom internodiju, a u drugom u fazi nalijevanja zrna povećanje iznosi 40%. U trećem internodiju debljina stijenke raste od klasanja do zriobe gdje je najveća debljina stijenki stanica epiderme. Uspoređujući internodije međusobno, u prvom je najtanja stijenka, zatim slijedi drugi pa treći internodij.



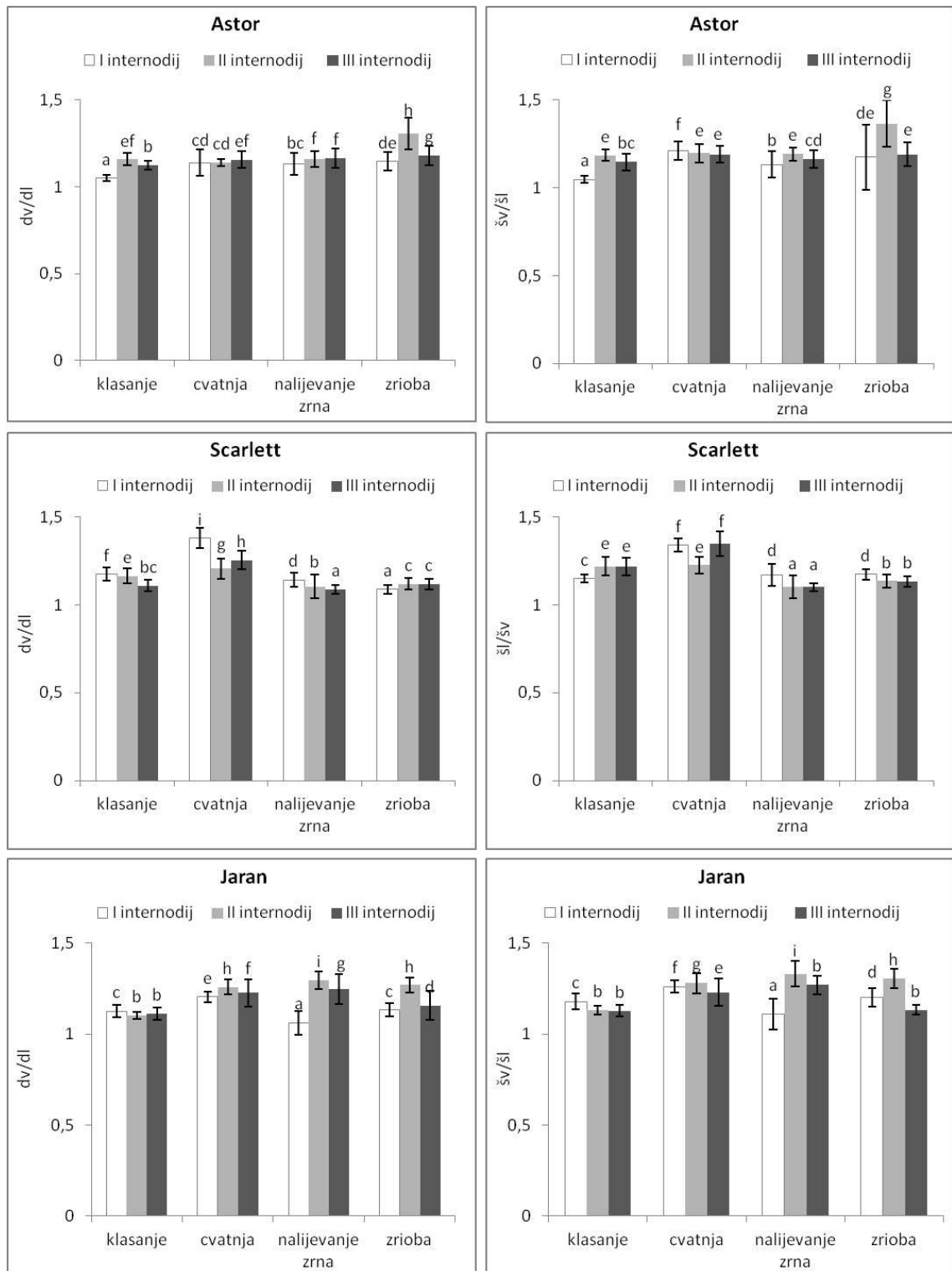
Slika 27. Debljina stijenke stanica kore u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze. Vrijednosti su izražene kao omjer duljine vanjskog ruba i lumena (dv/dl) te širine vanjskog ruba i lumena ($šv/šl$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost 200 mjerenja, $n=200$).

Parenhimske stanice imaju najtanje stijenke i najveći lumen u usporedbi sa slojem epiderme i kore. Različitih su dimenzija i veličina. Najveće stanice su bliže šupljini stabljike, a najmanje bliže sloju kore. Lignificiranost stijenki, a time i debljina, smanjuje se od površine stabljike prema unutrašnjosti.

U parenhimskim stanicama sorte Astor debljina stijenki, a time i lignifikacija, značajno se povećava tijekom razvoja u svim internodijima. Najdeblje stijenke su u trećem internodiju, a najtanje u prvom za obje dimenzije (slika 28). Debljina stijenki u fazi zriobe veća je za 10% u odnosu na početak klasanja.

Debljina stijenki parenhimskih stanica sorte Scarlett (slika 28) značajno se poveća u fazi cvatnje za 15% u prvom, 5% u drugom i 10% u trećem internodiju u odnosu na fazu klasanja. U prvom i drugom internodiju dolazi do smanjenja debljine stijenke na kraju razvoja stabljike.

U sorti Jaran (slika 28) ulaganje lignina u stijenku stanica epiderme povećava se tijekom razvoja. U drugom i trećem internodiju debljina stijenke se poveća za 10-15% u fazi nalijevanja zrna, u odnosu na fazu klasanja, za razliku od prvog internodija gdje do povećanja dolazi ranije u fazi cvatnje. Uspoređujući internodije, debljina stijenke je najmanja u prvom, a najveća u trećem u svim fazama osim klasanja.

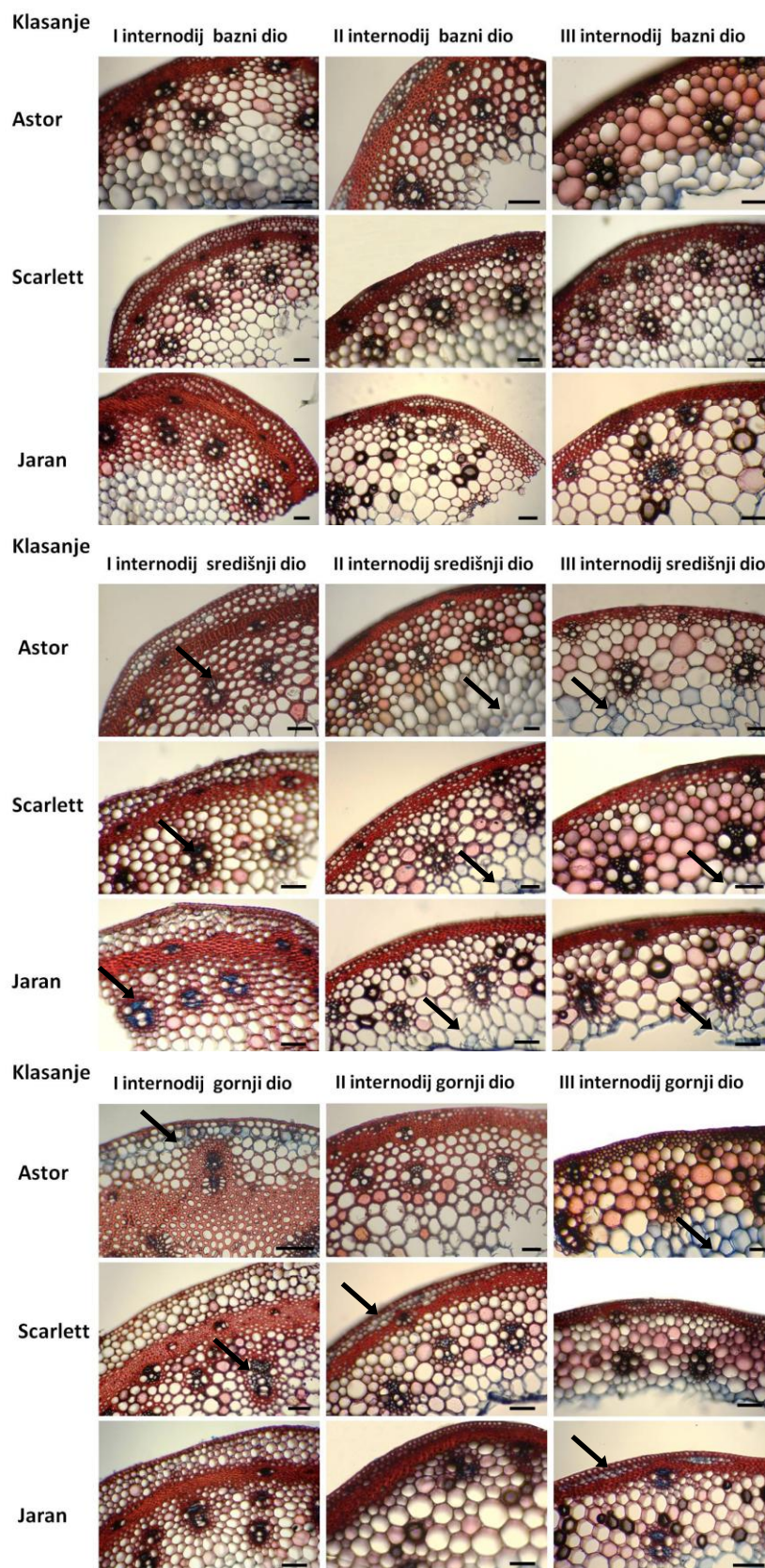


Slika 28. Debljina stijenki stanica parenhima u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze. Vrijednosti su izražene kao omjer duljine vanjskog ruba i lumena (dv/dl) te širine vanjskog ruba i lumena ($\text{šv}/\text{šl}$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost 200 mjerenja, $n=200$).

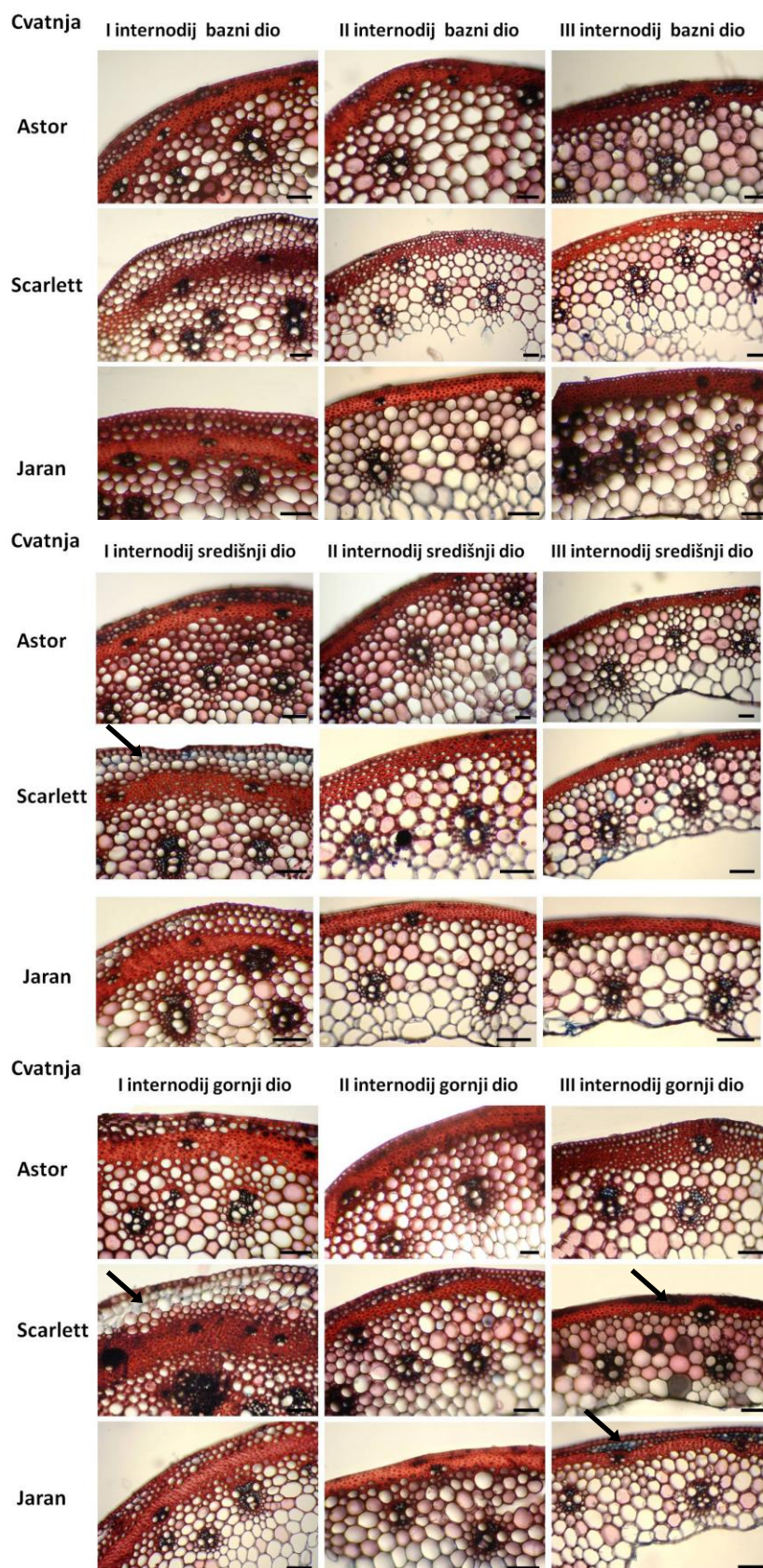
3.3. Lokalizacija celuloze u stabljici ječma

Prisutnost i lokalizaciju lignina i celuloze u internodijima tri sorte jarog ječma, Astor, Scarlett i Jaran, tijekom četiri razvojne faze, dokazala sam bojanjem safraninom i alcian plavim na poprečnim prerezima. Lignin u stanicama se boji crveno, a celuloza plavo (slika 29-32).

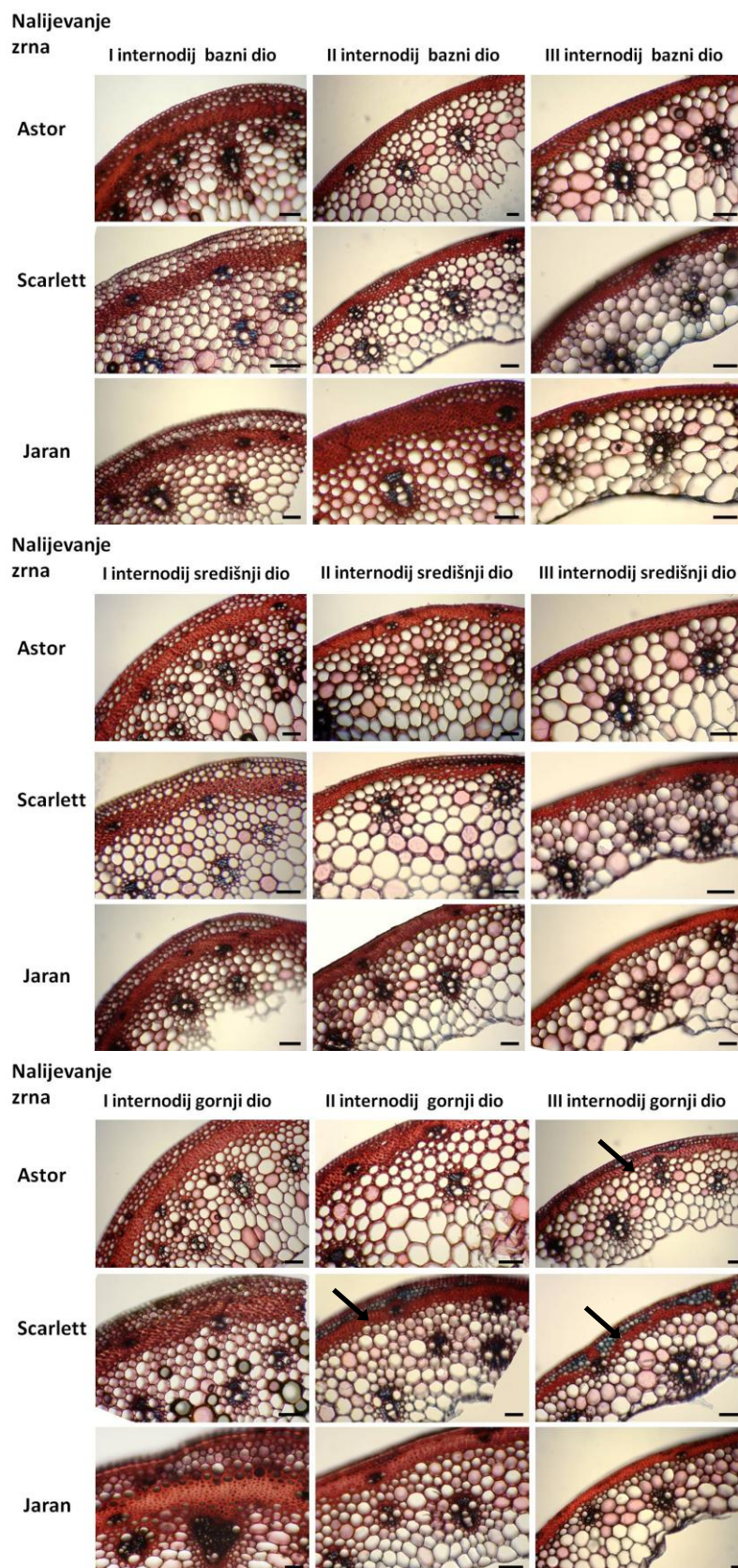
U fazi klasanja stanice s celuloznom stijenkom uočila sam u provodnim snopićima (floem) i parenhimu bliže središtu svih internodija i u svim sortama ječma (slika 29 crna strelica). U gornjem dijelu drugog internodija sorte Scarlett i gornjem dijelu trećeg internodija sorte Jaran također se uočavaju stanice s celuloznom stijenkom u području kore bliže epidermi (slika 29, crne strelice). U fazi cvatnje celulozu sam uočila u središnjem i gornjem dijelu prvog internodija te u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Scarlett jednako kao i u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Jaran (slika 30, crna strelica). U fazi nalijevanja zrna u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Astor te gornjem dijelu drugog i trećeg internodija sorte Scarlett, također se uočavaju stanice s više celuloznom stijenkom (slika 31, crne strelice). U posljednjoj fazi – zriobi, celulozu sam uočila u gornjim dijelovima trećeg internodija sorti Scarlett i Jaran (slika 32, crne strelice).



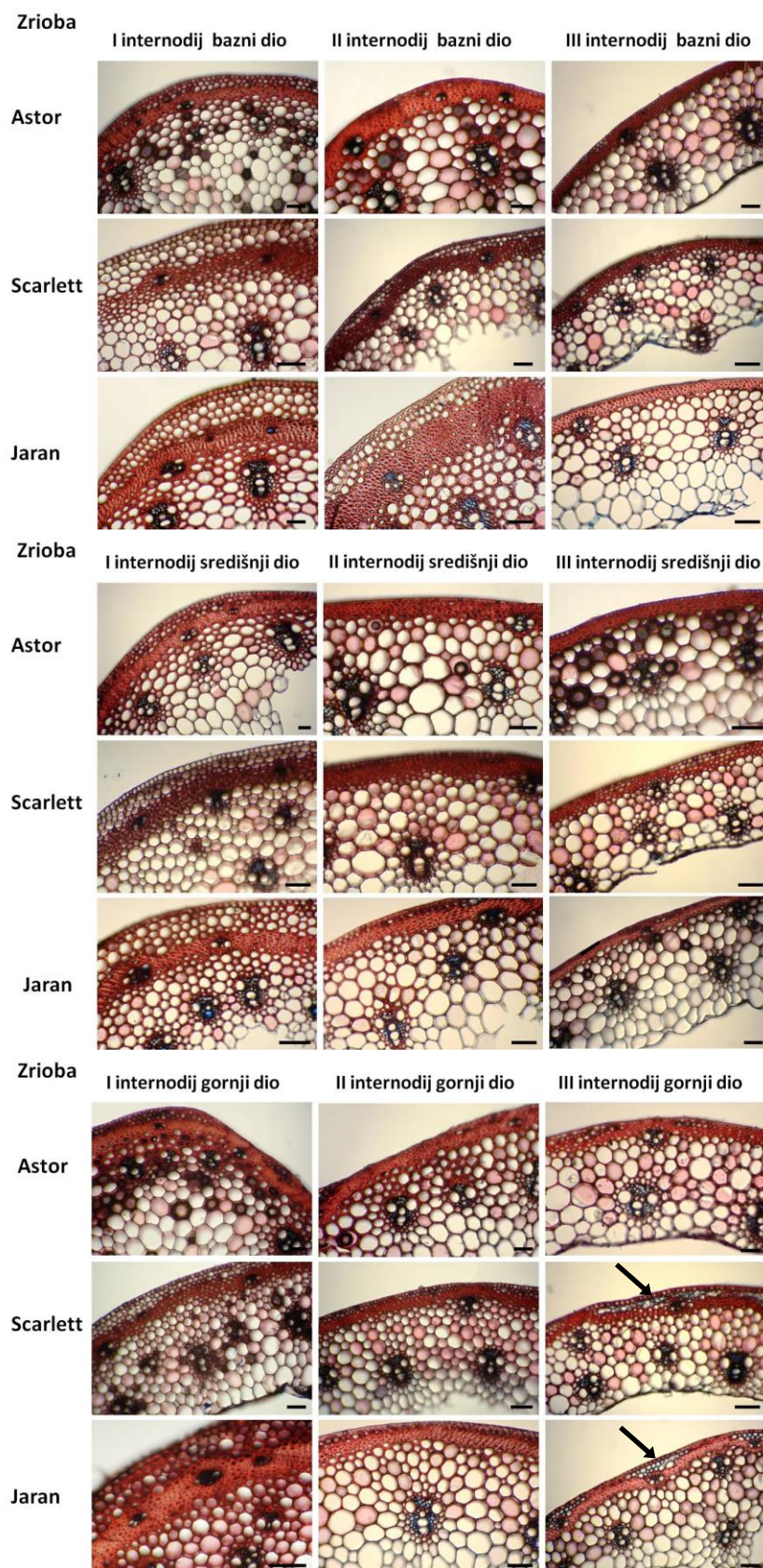
Slika 29. Lokalizacija celuloze (plavo) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi klasanja. Celuloza (crne strelice) se nalazi u provodnim snopićima i parenhimu svih sorti (označeno na središnjim dijelovima internodija), a u području kore samo u gornjim dijelovima internodija prvog internodija sorte Astor, drugog sorte Scarlett i trećeg sorte Jaran. Bar=500 μ m.



Slika 30. Lokalizacija celuloze (plavo) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi cvatnje. Celuloza se nalazi u području kore u središnjem i gornjem dijelu prvog internodija te u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Scarlett kao i u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Jaran (crne strelice). Također, prisutna je u provodnim snopićima i parenhimu svih sorti. Bar=500 μ m.



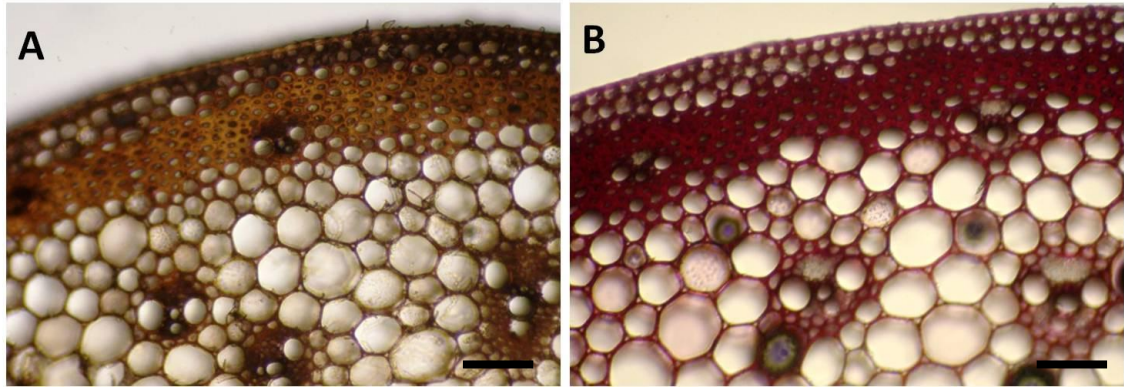
Slika 31. Lokalizacija celuloze (plavo) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi nalijevanja zrna. Celuloza se nalazi u području kore u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Astor te u gornjem dijelu drugog i trećeg internodija sorte Scarlett (crne strelice). Također, prisutna je u provodnim snopićima i parenhimu, bliže šupljini stabljike, svih sorti. Bar=500 μ m.



Slika 32. Lokalizacija celuloze (plavo) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi zriobe. Celuloza se nalazi u području kore u gornjem dijelu trećeg internodija sorte Scarlett i Jaran (crne strelice). Također prisutna je u provodnim snopićima i parenhimu, bliže šupljini stabljike, svih sorti. Bar=500 μm.

3.4. Gvajakol peroksidaze *in situ*

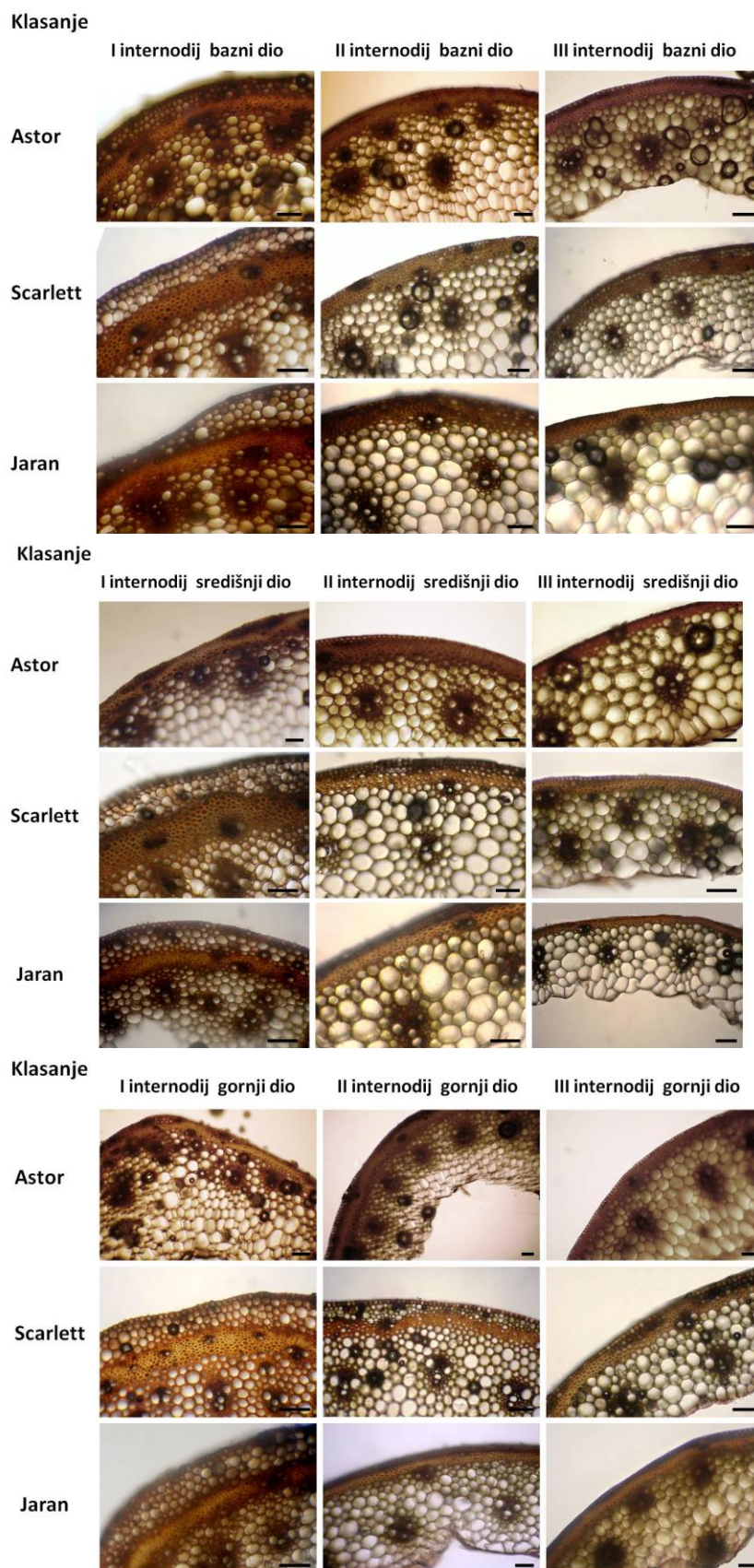
Mjesta pojačane aktivnosti gvajakol peroksidaze *in situ* kolokaliziraju s ligninom u svim internodijima i svim sortama (slika 33).



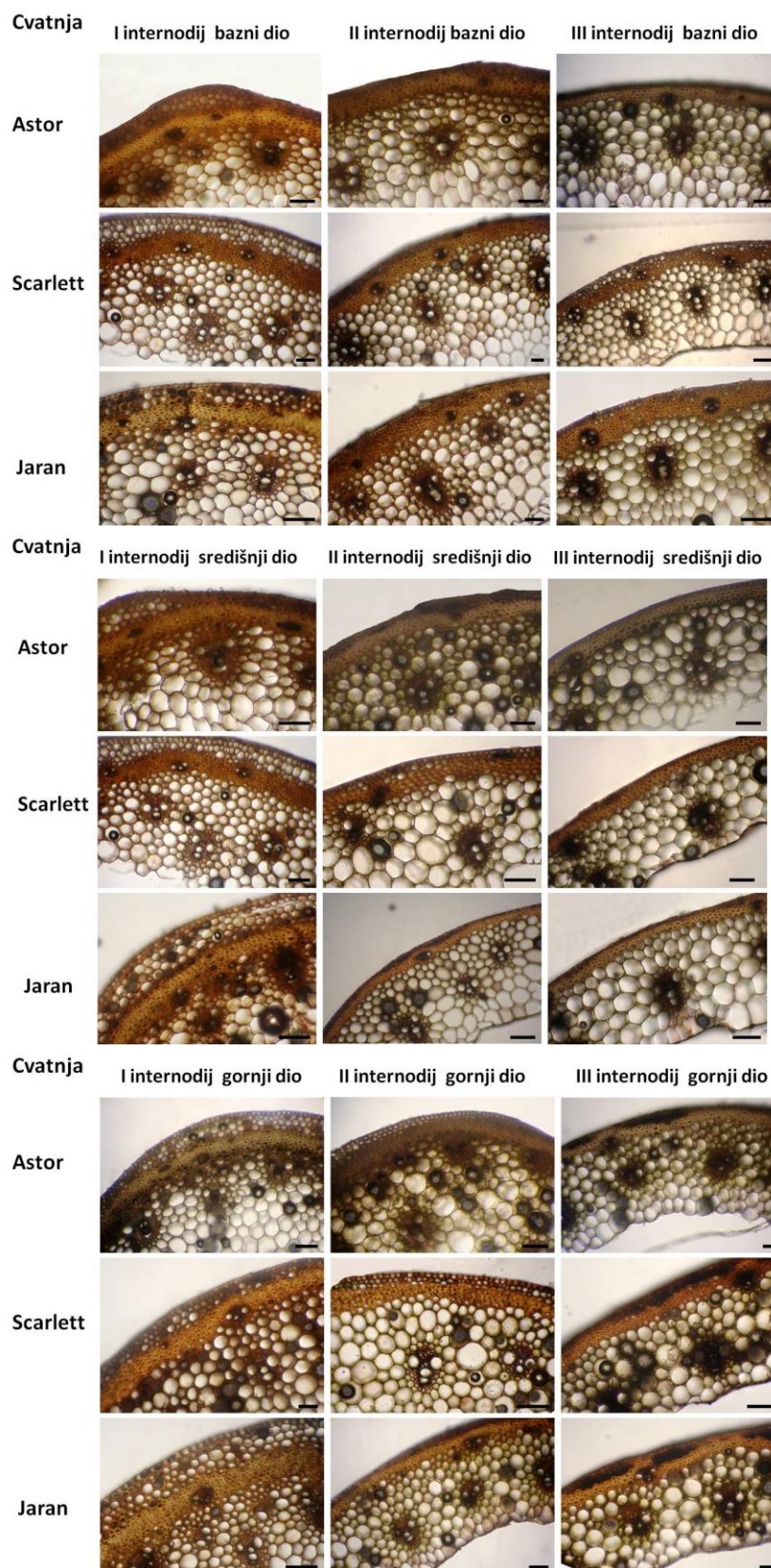
Slika 33. Usporedba aktivnosti gvajakol peroksidaza A) i bojanja floroglucinolom B) u prvom internodiju sorte Scarlett. Mjesta prisutnosti lignina i aktivnosti gvajakol peroksidaza kolokaliziraju. Bar= 500 μ m.

Stanice u kojima se uočava aktivnost gvajakol peroksidaza prisutne su u epidermi, području kore i djelomično u parenhimu kao i u provodnim snopićima (ksilem) sva tri internodija tijekom razvoja.

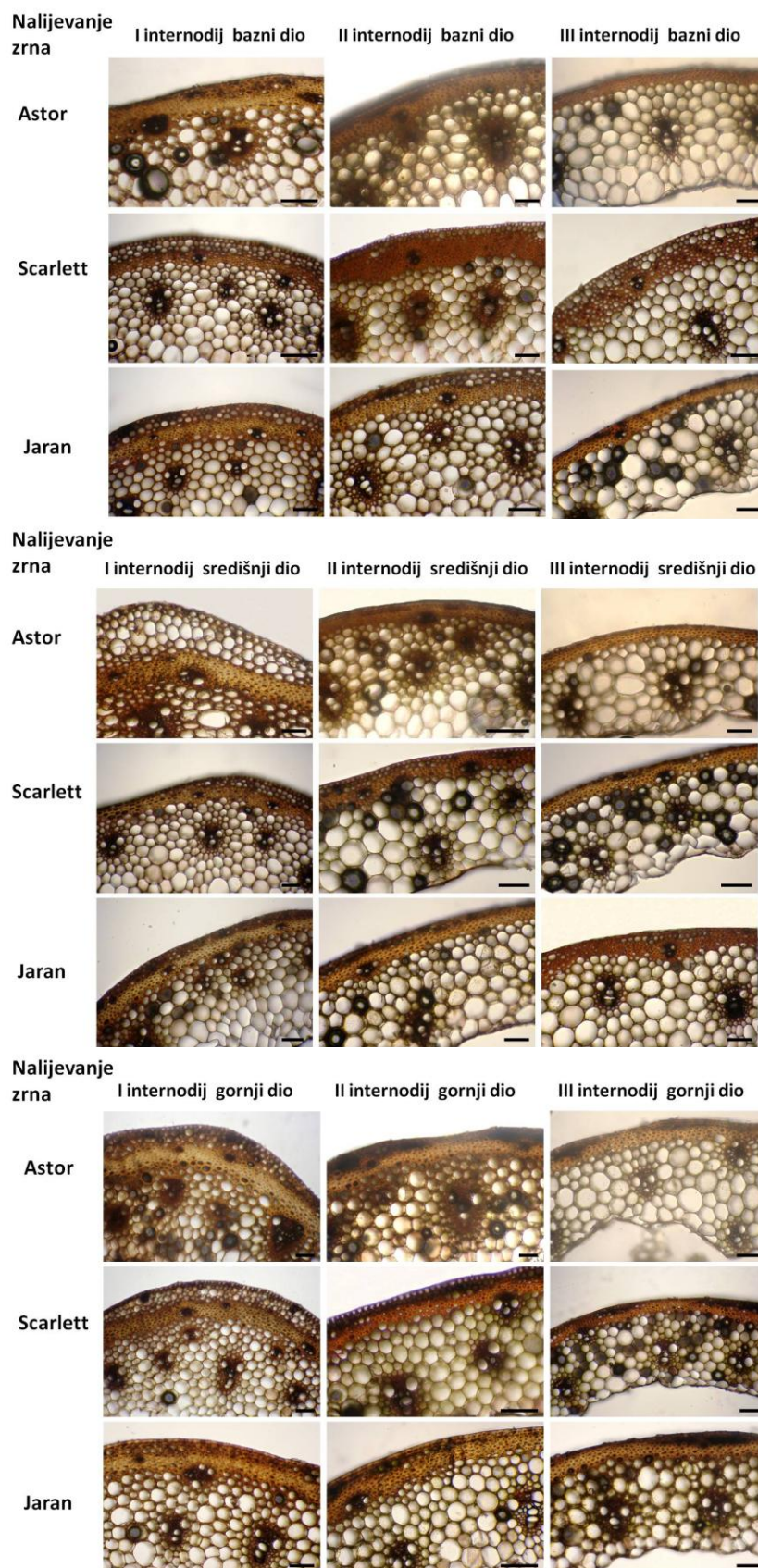
Tijekom sve četiri razvojne faze: klasanje (slika 34), cvatnja (slika 35), nalijevanje zrna (slika 36) i zrioba (slika 37) kao i u svim sortama jarog ječma najveća aktivnost zamjećuje se u sklerenhimskom prstenu u području kore u prvom, drugom i trećem internodiju. U prvim internodijima obojenje je intenzivnije u odnosu na drugi i treći internodij i ne mijenja se tijekom razvoja. U provodnim snopićima također se zamjećuje aktivnost peroksidaza u području ksilema, te u sklerenhimu koji ih okružuje. U stanicama parenhima slabija je lignifikacija i ujedno aktivnost gvajakol peroksidaza *in situ* te se ona smanjuje prema unutrašnjosti stabljike.



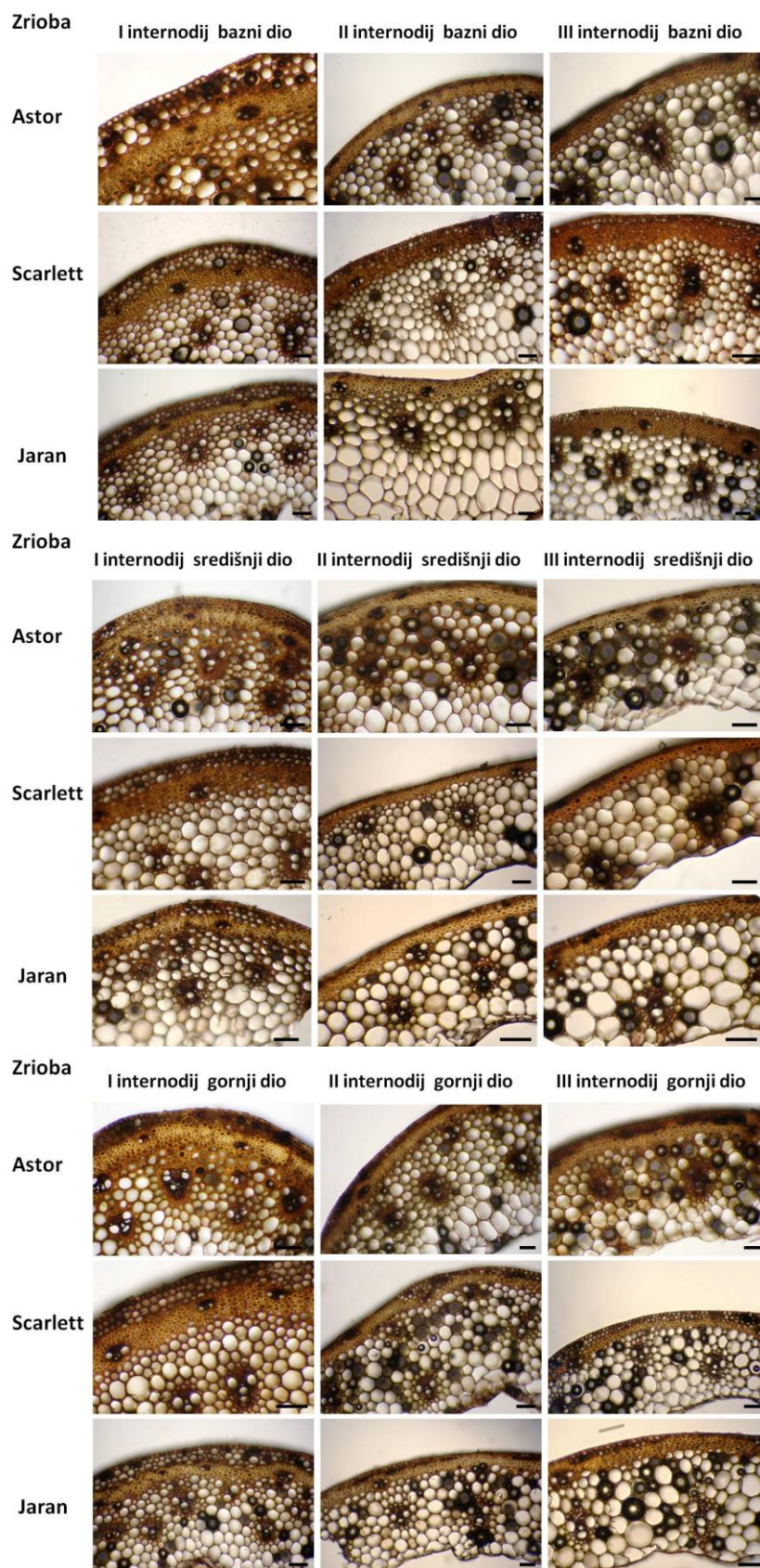
Slika 34. Aktivnost gvajakol peroksidaza *in situ* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi klasanja podudara se s mjestima jače lignifikacije unutar pojedinog internodija. Bar=500 μ m.



Slika 35. Aktivnost gvajakol peroksidaza *in situ* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi cvatnje podudara se s mjestima jače lignifikacije unutar pojedinog internodija. Bar= 500 μ m.



Slika 36. Aktivnost gvajakol peroksidaza *in situ* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi nalijevanja zrna podudara se s mjestima jače lignifikacije unutar pojedinog internodija. Bar=500 μ m.



Slika 37. Aktivnost gvajakol peroksidaza *in situ* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran u fazi zriobe podudara se s mjestima jače lignifikacije unutar pojedinog internodija. Bar=500 μ m.

3.5. Aktivnost gvajakol peroksidaza

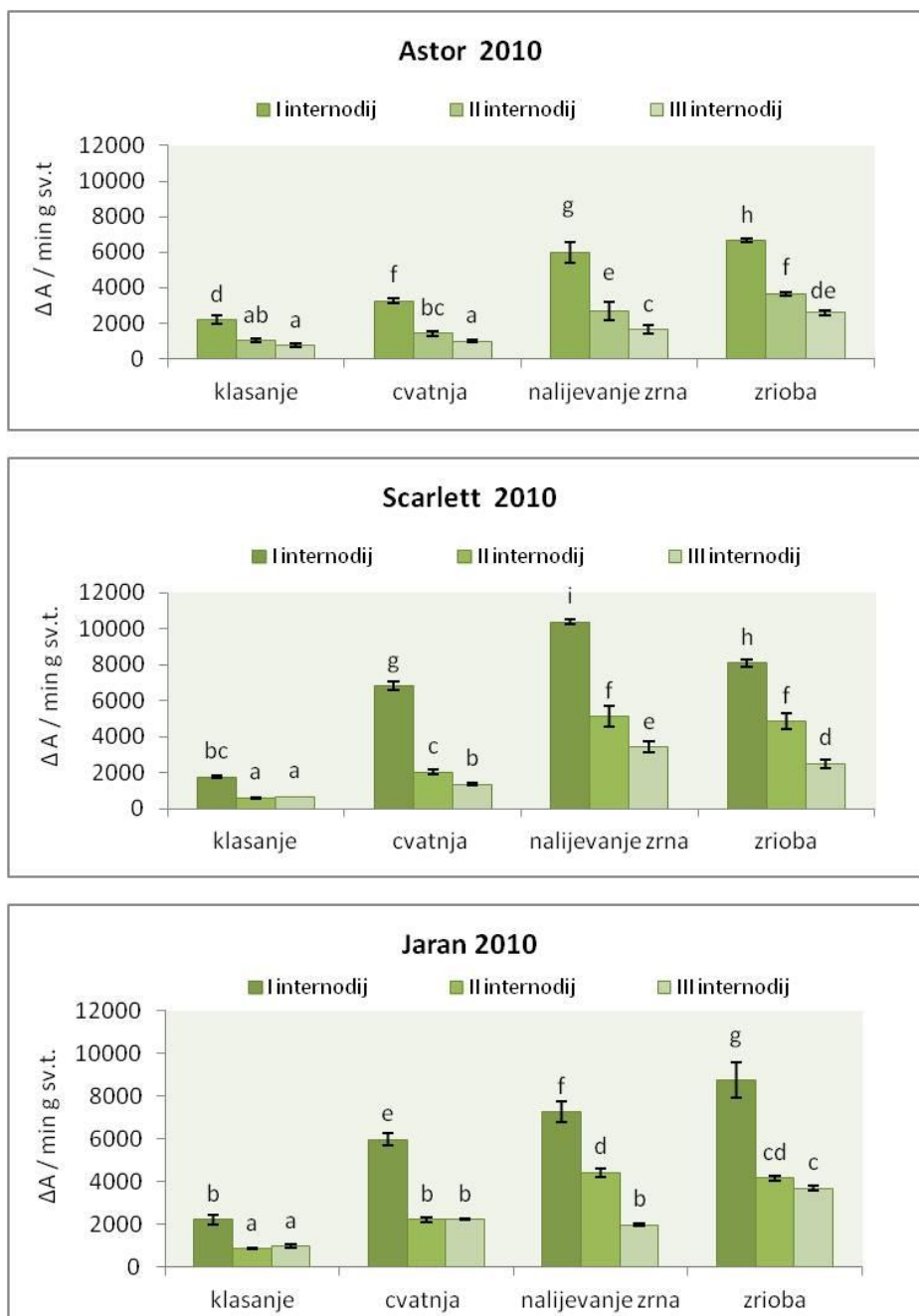
Peroksidaze sudjeluju u koraku polimerizacije ligninskih podjedinica oksidirajući hidroksicimetne alkohole (koniferilni, sinapilni i *p*-kumarilni) čime se oni povezuju polimer lignina.

U prvom, odnosno najstarijem internodiju, ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza bila je najveća (slika 38) i smanjivala se u drugom i trećem internodiju prema mjerenjima u 2010. godini. Ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza rasla je od faze klasanja do faze zriobe u svim sortama jarog ječma.

U sorti Astor (slika 38) ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza bila je veća u prvom internodiju u odnosu na drugi i treći kroz sve četiri razvojne faze. Najveću aktivnost izmjerila sam u fazi zriobe u prvom (6651,6 Δ A/min g sv.t.), a najmanju u fazi klasanja u trećem internodiju (740,7 Δ A/min g sv.t.). U fazi klasanja nema statistički značajne razlike u aktivnosti između drugog i trećeg internodija. U fazi cvatnje u drugom i trećem internodiju nije došlo do povećanja aktivnosti, već je ona ostala ista u odnosu na fazu klasanja. Tijekom nalijevanja zrna i zriobe aktivnost raste u svim internodijima sorte Astor.

Kroz sve četiri razvojne faze u sorti Scarlett (slika 38) ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza u prvom internodiju bila je veća u odnosu na drugi i treći internodij. Najveću aktivnost izmjerila sam u fazi nalijevanja zrna u prvom (10375,8 Δ A/min g sv.t.), a najmanju u fazi klasanja u drugom (595,9 Δ A/min g sv.t.) i trećem (672,2 Δ A/min g sv.t.) internodiju. U fazi klasanja nema značajne razlike u aktivnosti između drugog i trećeg internodija, a u fazi nalijevanja zrna aktivnosti je viša u svim internodijima u usporedbi s fazom klasanja i cvatnje. U drugom internodiju aktivnost gvajakol peroksidaza ostaje jednaka kao i u fazi zriobe dok se u prvom i trećem internodiju aktivnost smanjuje u usporedbi s prethodnom fazom. U prvom internodiju sorte Jaran (slika 38), u odnosu na drugi i treći ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza bila je veća kroz sve četiri razvojne faze. Najveću aktivnost izmjerila sam u fazi zriobe u prvom (8747,2 Δ A/min g sv.t.), a najmanju u fazi klasanja u drugom internodiju (851,3 Δ A/min g sv.t.). U fazi klasanja i fazi cvatnje nema značajne razlike u aktivnosti gvajakol

peroksidaza između drugog i trećeg internodija. U drugom internodiju aktivnost je ista kao i u fazi nalijevanja zrna kao i u fazi zriobe. U fazi zriobe u drugom i trećem internodiju nema značajne razlike u aktivnosti.



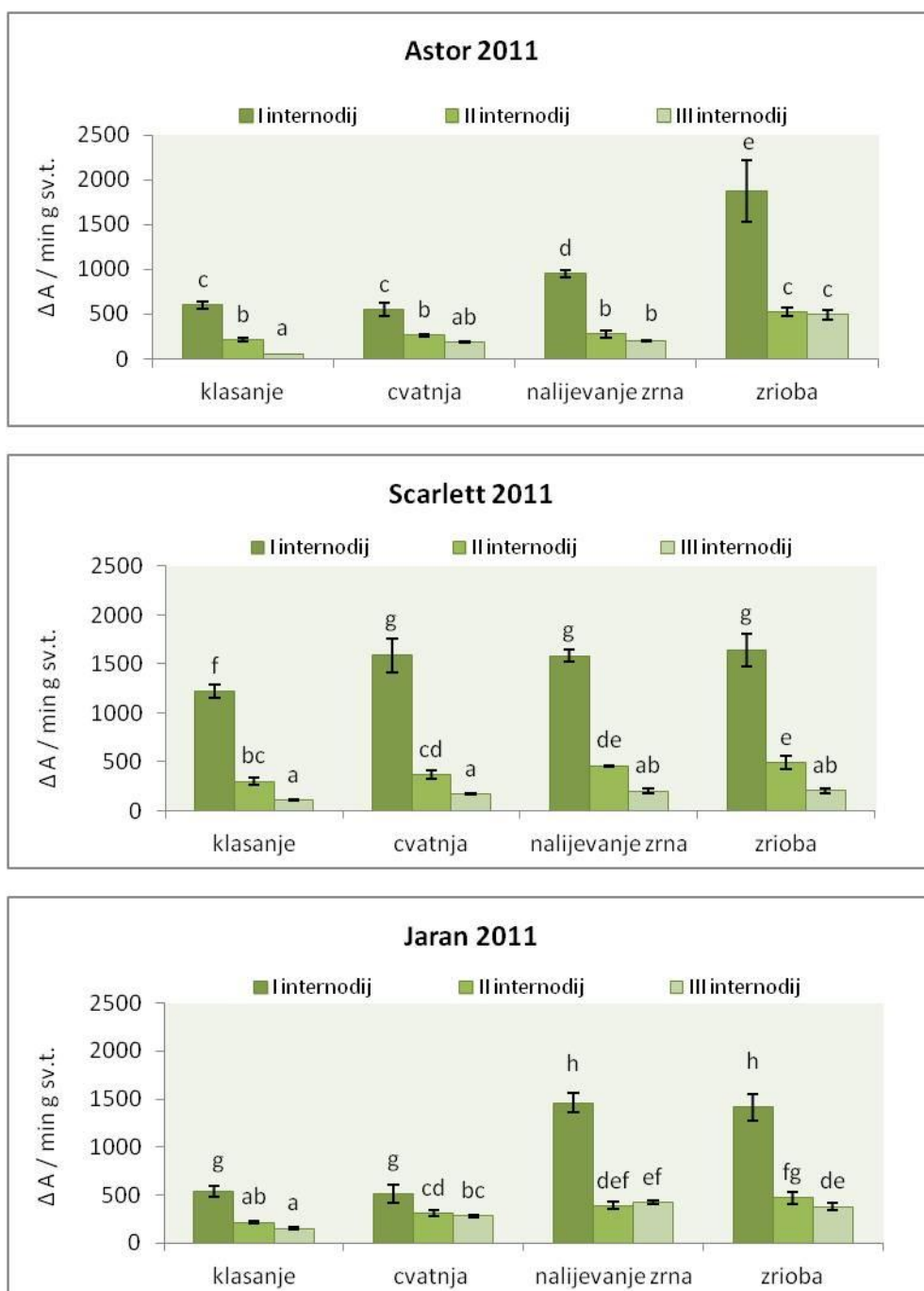
Slika 38. Ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasiranje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Aktivnost je izražena kao promjena apsorbancije u minuti po masi svježe tvari ($\Delta A / \text{min g sv.t.}$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

Prema mjerenjima u 2011. godini ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza (slika 39) bila je najveća u prvom, odnosno najstarijem internodiju i smanjivala se u drugom i trećem internodiju. U svim sortama jarog ječma zamijetila sam porast aktivnosti od faze klasanja do faze zriobe.

U prvom internodiju sorte Astor (slika 39) izmjerila sam veću ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaza u odnosu na drugi i treći kroz sve četiri razvojne faze. Najveću ukupnu aktivnosti gvajakol peroksidaza izmjerila sam u fazi zriobe u prvom ($1867,4 \Delta A/\text{min g sv.t.}$), a najmanju u trećem internodiju ($58,4 \Delta A/\text{min g sv.t.}$) u fazi klasanja. Usporedbom aktivnosti gvajakol peroksidaza drugog i trećeg internodija nisam uočila statistički značajnu razliku u fazama cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe. Također, u ovim internodijima značajniji porast aktivnosti vidljiv je tek u fazi zriobe.

U sorti Scarlett (slika 39) u prvom internodiju izmjerila sam najveću ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaza u odnosu na drugi i treći kroz sve četiri razvojne faze. Najveću aktivnost izmjerila sam u prvom internodiju (oko $1600 \Delta A/\text{min g sv.t.}$) u fazi cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe, a u trećem internodiju vrijednosti su bile manje i do 80% i značajno se ne mijenjaju tijekom sve četiri razvojne faze. Također, u drugom internodiju aktivnost ima trend rasta, ali se ne mijenja značajnije u odnosu na prethodnu fazu.

Najmanju ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaza u sorti Jaran (slika 39) izmjerila sam u trećem internodiju u fazi klasanja ($151,3 \Delta A/\text{min g sv.t.}$). U prvom internodiju izmjerila sam najveću ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaza u odnosu na drugi i treći kroz sve četiri razvojne faze. U fazi klasanja i cvatnje u prvom internodiju aktivnost je jednaka, a raste značajnije u trećoj fazi i zadržava se u fazi zriobe ($1412,7-1462,8 \Delta A/\text{min g sv.t.}$). U drugom i trećem internodiju aktivnost raste do treće faze nalijevanja zrna i ostaje jednaka u fazi zriobe. Uspoređujući drugi i treći internodij međusobno nema značajne razlike u prve tri faze razvoja, a u fazi zriobe ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza manja je u trećem internodiju u usporedbi s drugim internodijem.



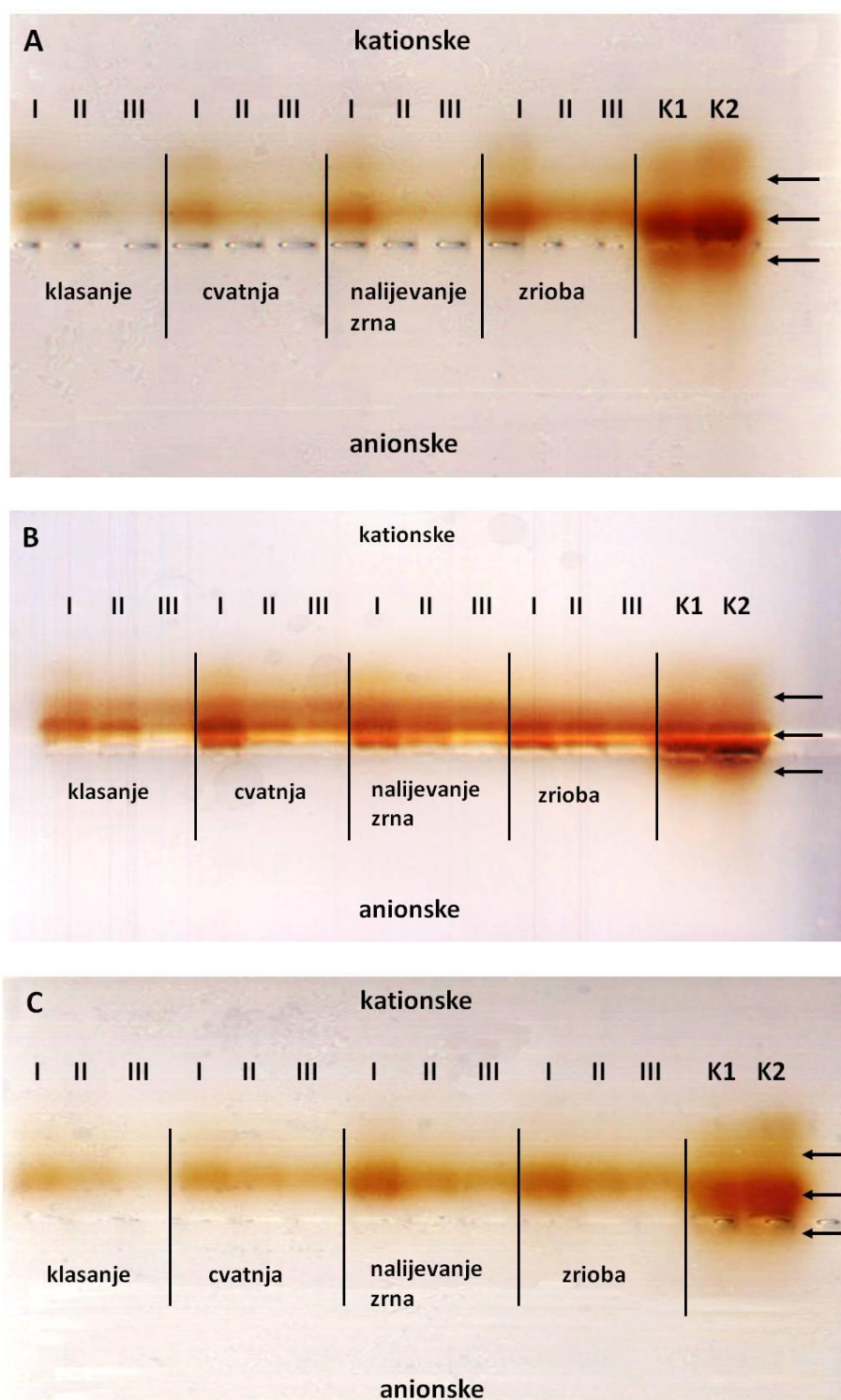
Slika 39. Ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2011. godini. Aktivnost je izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari ($\Delta A / \text{min g sv.t.}$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

3.6. Izoenzimske forme gvajakol peroksidaza

Peroksidaze su prisutne u brojnim izoformama u različitim biljnim organima i tkivima tijekom razvoja. Istraživanja su pokazala da u procesu lignifikacije sudjeluju anionske i kationske peroksidaze.

U internodijima stabljike tri sorte jarog ječma Astor (slika 40. A), Scarlett (slika 40. B) i Jaran (slika 40. C) uočila sam dvije kationske izoforme gvajakol peroksidaza u agaroznom gelu, za razliku od kontrolnog uzorka, list klijanca ječma, gdje sam uočila jednu anionsku izoformu.

Aktivnost gvajakol peroksidaza najveća je u prvim internodijima u svim sortama jarog ječma tijekom sve četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba što se može vidjeti po intenzivnijem obojenju vrpce u gelu. U drugom i trećem internodiju aktivnost se smanjuje što se uočava kao slabije obojenje vrpce u gelu. U sva tri internodija primjećuje se rast aktivnosti enzima sa razvojem stabljike, odnosno aktivnost se povećava sa starenjem biljke.



Slika 40. Anionske i kationske izoforme gvajakol peroksidaza, nakon elektroforeze u 0,8% agaroznom gelu, u internodijima tri sorte jarog ječma u četiri razvojne faze tijekom 2011. godine. A) sorta Astor, B) sorta Scarlett i C) sorta Jaran. I-prvi internodij, II-drugi internodij, III-treći internodij, K1-kontrola: list klijanca ječma star osam dana i K2-kontrola: list klijanca ječma star deset dana. Izoenzimi su vizualiziran reakcijskom smjesom koja je sadržavala 5mM gvajakol (pH=5,8) i 5mM H₂O₂. Strelicama su označene tri izoenzimske forme.

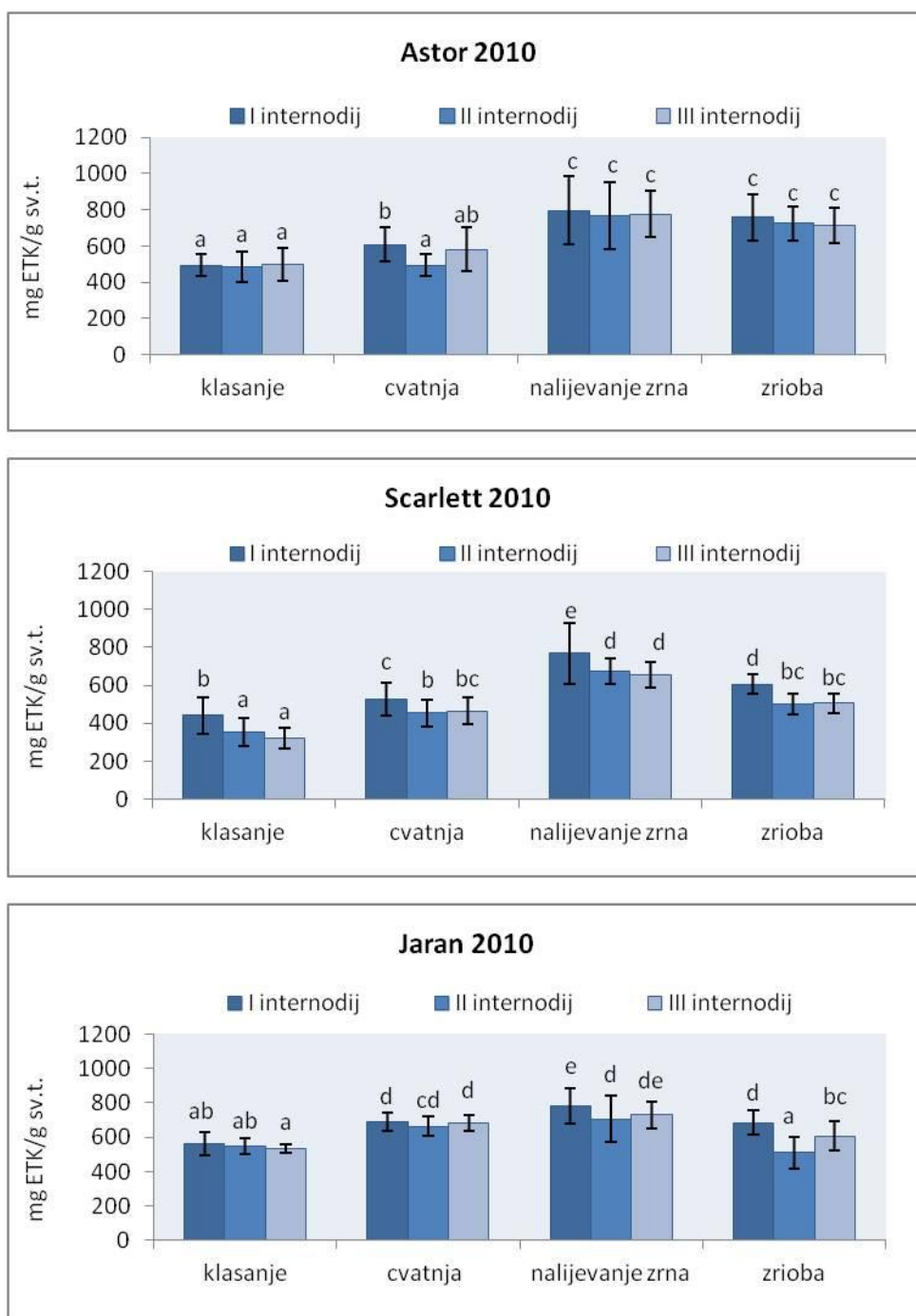
3.7. Sadržaj ukupnih topljivih fenola

Sadržaj ukupnih topljivih fenola mjerila sam u internodijima tri sorte jarog ječma, Astor, Scarlett i Jaran, tijekom dvije vegetacijske sezone (2010. i 2011. godina) kroz četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba. U svim sortama sadržaj polifenola se statistički značajno povećava ($p \leq 0,05$) tijekom razvoja stabljike odnosno od faze klasanja do faze zriobe.

Sadržaj ukupnih topljivih fenola u 2010. godini raste u fazi nalijevanja zrna u sorti Astor (slika 41). Najveći sadržaj (713-795 mg ETK/g sv.t.) izmjerila sam u fazi nalijevanja zrna i fazi zriobe, a najmanji (480-495 mg ETK/g sv.t.) u fazi klasanja u svim internodijima sorte Astor. Uspoređujući sva tri internodija međusobno tijekom klasanja, nalijevanja zrna i zriobe nisam uočila značajne razlike u sadržaju ukupnih fenola. U fazi cvatnje u prvom i drugom te u drugom i trećem internodiju izmjerila sam jednaki sadržaj fenola.

U prvom internodiju sadržaj ukupnih topljivih fenola bio je veći u usporedbi s drugim i trećim internodijem kroz sve četiri razvojne faze u 2010. godine u sorti Scarlett (slika 41) godini. Najveći sadržaj izmjerila sam u fazi nalijevanja zrna u prvom (767,5 mg ETK/g sv.t.), a najmanji u fazi klasanja u drugom (356,4 mg ETK/g sv.t.) i trećem (322,8 mg ETK/g sv.t.) internodiju. U svim internodijima sadržaj ukupnih topljivih fenola rastao je tijekom tri razvojne faze, a smanjio se u posljednjoj fazi zriobe.

U sorti Jaran (slika 41) u prvom internodiju, u odnosu na drugi i treći, izmjerila sam veći sadržaj ukupnih topljivih fenola u fazi zriobe u 2010. godini. U fazi klasanja sadržaj ukupnih topljivih fenola jednak je među internodijima kao i u fazi cvatnje. Također, sadržaj je jednak u drugom i trećem internodiju u fazi nalijevanja zrna, a u fazi zriobe sadržaj u drugom internodiju je značajno manji. Najveći sadržaj ukupnih topljivih fenola izmjerila sam u fazi zriobe u prvom (783,4 mg ETK/g sv.t.), a najmanji u fazi klasanja u sva tri internodija (535,9-563,7 mg ETK/g sv.t.) te u drugom internodiju u fazi zriobe (511,1 mg ETK/g sv.t.).

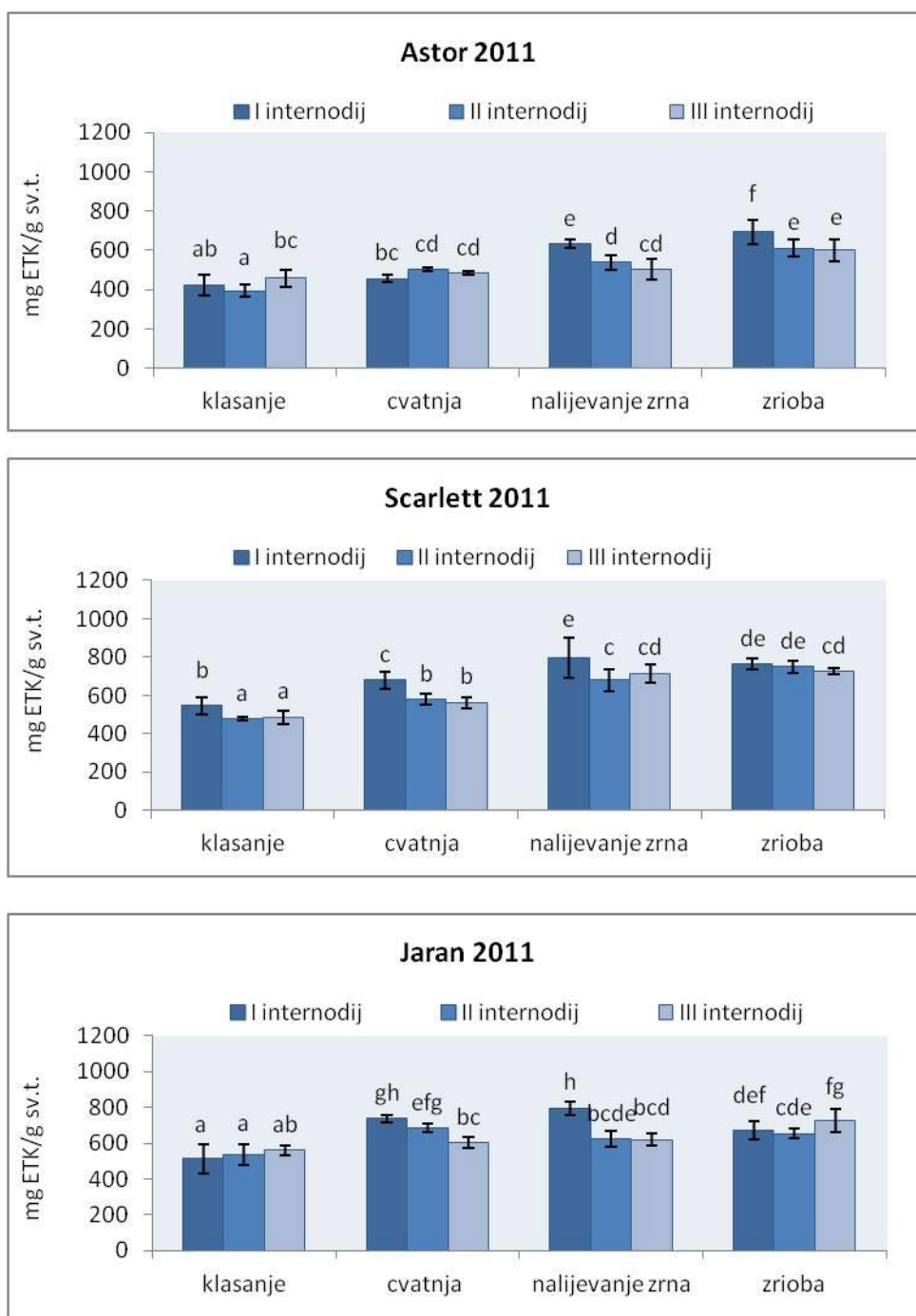


Slika 41. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini izražena kao miligram ekvivalenta taninske kiseline po gramu svježe tvari (mg ETK/g s.t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

U sorti Astor (slika 42) izmjerila sam manji sadržaj ukupnih topljivih fenola u fazi klasanja u usporedbi s fazom nalijevanja zrna i fazom zriobe u 2011. godini. Najveći sadržaj (694,4 mg ETK/g sv.t.) izmjerila sam u fazi zriobe u prvom internodiju, a najmanji (394,03 mg ETK/g sv.t.) u fazi klasanja u drugom internodiju. Uspoređujući sva tri internodija, u fazi klasanja i u fazi cvatnje nema značajne razlike u sadržaju ukupnih topljivih fenola kao ni između drugog i trećeg internodija u fazi nalijevanja zrna. Sadržaj ukupnih topljivih fenola značajno poraste u svim internodijima u fazi zriobe.

U prvom internodiju sorte Scarlett (slika 42) izmjerila sam veći sadržaj ukupnih topljivih fenola u 2011. godini u usporedbi s drugim i trećim internodijem u fazi klasanja, cvatnje i nalijevanja zrna. Najveći sadržaj izmjerila sam u fazi nalijevanja zrna u prvom (798,4 mg ETK/g sv.t.), a najmanji, u fazi klasanja u drugom (478,6 mg ETK/g sv.t.) i trećem internodiju (486,5 mg ETK/g sv.t.). U prvom internodiju sadržaj ukupnih topljivih fenola povećava se tijekom rasta stabljike sve do faze zriobe gdje ostaje isti u odnosu na prethodnu fazu. Sadržaj u drugom i trećem internodiju raste tijekom razvoja, ali jednako u oba internodija.

Najveći sadržaj ukupnih topljivih fenola izmjerila sam u fazi nalijevanja zrna (796,5 mg ETK/g sv.t.) i zriobe (738,7 mg ETK/g sv.t.) u prvom internodiju, a najmanji u fazi klasanja u sva tri internodija (512,6-562,3 mg ETK/g sv.t.) sorte Jaran (slika 41). U prvom internodiju izmjerila sam veći sadržaj ukupnih topljivih fenola u fazi zriobe u usporedbi s drugim i trećim u 2011. godini. U fazi klasanja sadržaj je jednak u sva tri internodija, a u fazi cvatnje sadržaj je jednak u prvom i drugom internodiju. U prvom internodiju sadržaj ukupnih topljivih fenola povećava se tijekom rasta stabljike sve do faze zriobe gdje ostaje isti u odnosu na prethodnu fazu. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u drugom internodiju naraste u fazi cvatnje i ostaje isti do faze zriobe, a u trećem internodiju značajan porast vidljiv je tek u posljednjoj fazi.



Slika 42. Sadržaj ukupnih topljivih fenola internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2011. godini izražena kao miligram ekvivalenta taninske kiseline po gramu svježe tvari (mg ETK/g s.t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

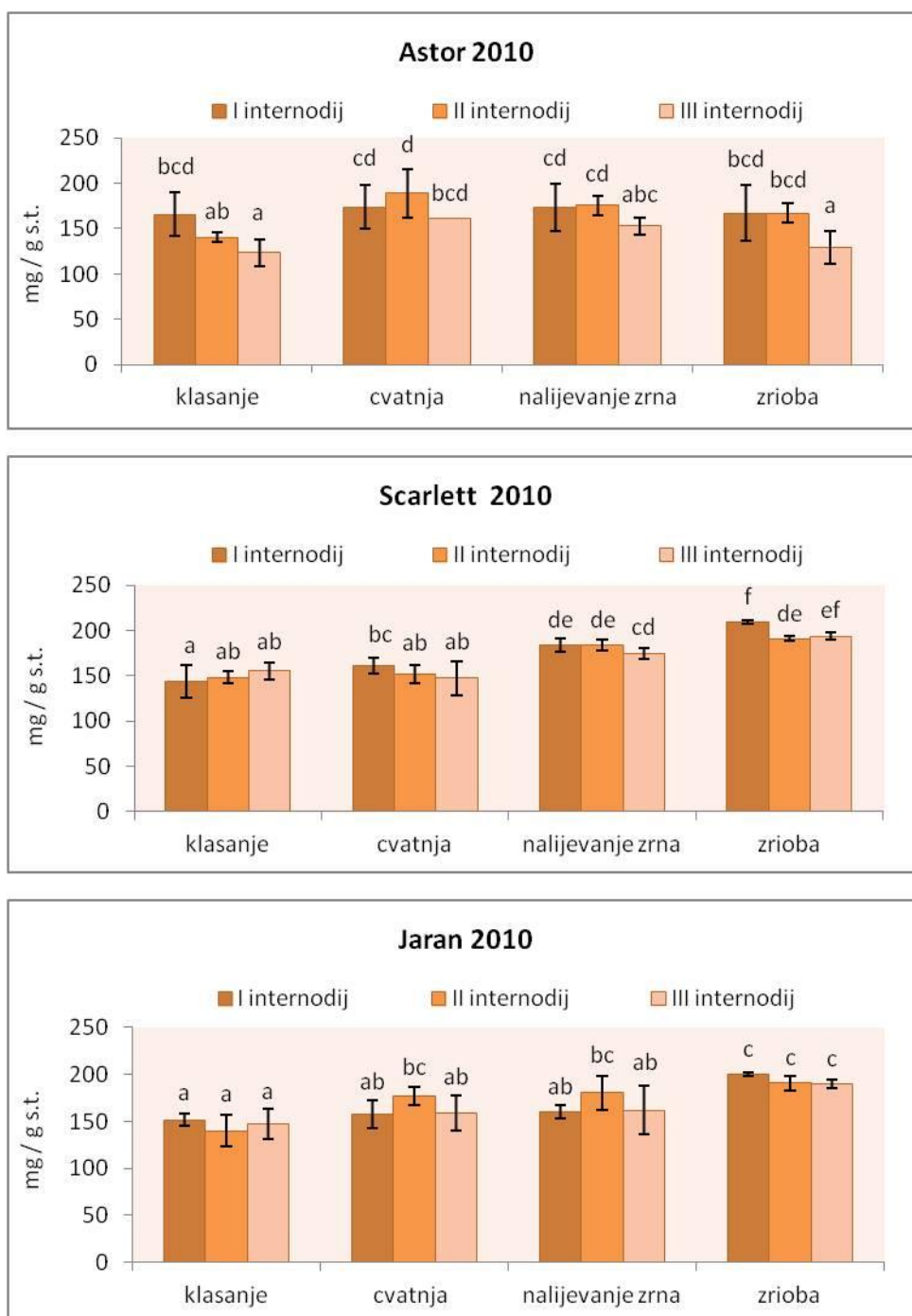
3.8. Sadržaj lignina

Najveći sadržaj lignina u biljkama nalazi se upravo u stabljici i povećava se njezinim razvojem. Sadržaj ukupnog lignina izražen je kao zbroj Klasonovog i lignina topljivog u kiselini u internodijima tri sorte jarog ječma, kroz četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba, u 2010. godini. U sortama Scarlett i Jaran sadržaj lignina značajno se povećava tijekom razvoja stabljike, odnosno od faze klasanja do faze zriobe.

U sorti Astor (slika 43) sadržaj ukupnog lignina u prvom internodiju značajno se ne mijenja tijekom četiri razvojne faze. U drugom i trećem internodiju sadržaj se poveća u fazi cvatnje i ostaje isti do faze zriobe. Uspoređujući tri internodija međusobno u fazi klasanja, cvatnje i nalijevanja zrna nema značajne razlike u sadržaju ukupnog lignina. U trećem internodiju u fazi zriobe sadržaj je manji u odnosu na prvi i drugi. Najveći sadržaj ukupnog lignina izmjerila sam u drugom internodiju u fazi cvatnje (188,7 mg/g s.t.), a najmanji (123,8 i mg/g s.t.) u fazi klasanja u trećem internodiju sorte Astor.

Najveći (209,6 mg/g s.t.) i najmanji (143,8 mg/g s.t.) sadržaj lignina izmjerila sam u fazi zriobe, odnosno fazi klasanja u prvom internodiju u sorti Scarlett (slika 43). Sadržaj ukupnog lignina u prvom internodiju raste tijekom razvoja, od faze klasanja do faze zriobe. U prvom internodiju porast je vidljiv već u drugoj fazi, a u drugom i trećem internodiju sadržaj raste u fazi nalijevanja zrna. U fazi klasanja, cvatnje i zriobe nema značajne razlike u sadržaju ukupnog lignina u sva tri internodije sorte Scarlett.

U prvom i drugom internodiju sorte Jaran (slika 43) sadržaj ukupnog lignina najveći je u fazi zriobe u odnosu na fazu klasanja, cvatnje i nalijevanja zrna. U fazi zriobe u svim internodijima jednak je sadržaj lignina i najviši u odnosu na prethodne razvojne faze. U prvom i trećem internodiju sadržaj lignina se poveća tek u fazi zriobe, a u drugom u fazi klasanja. Najveći sadržaj ukupnog lignina izmjerila sam u prvom internodiju (199,9 mg/g s.t.) u fazi zriobe, a najmanji u drugom (139,9 mg/g s.t.). Uspoređujući sva tri internodija u četiri razvojne faze, nema značajne razlike u sadržaju ukupnog lignina među njima.



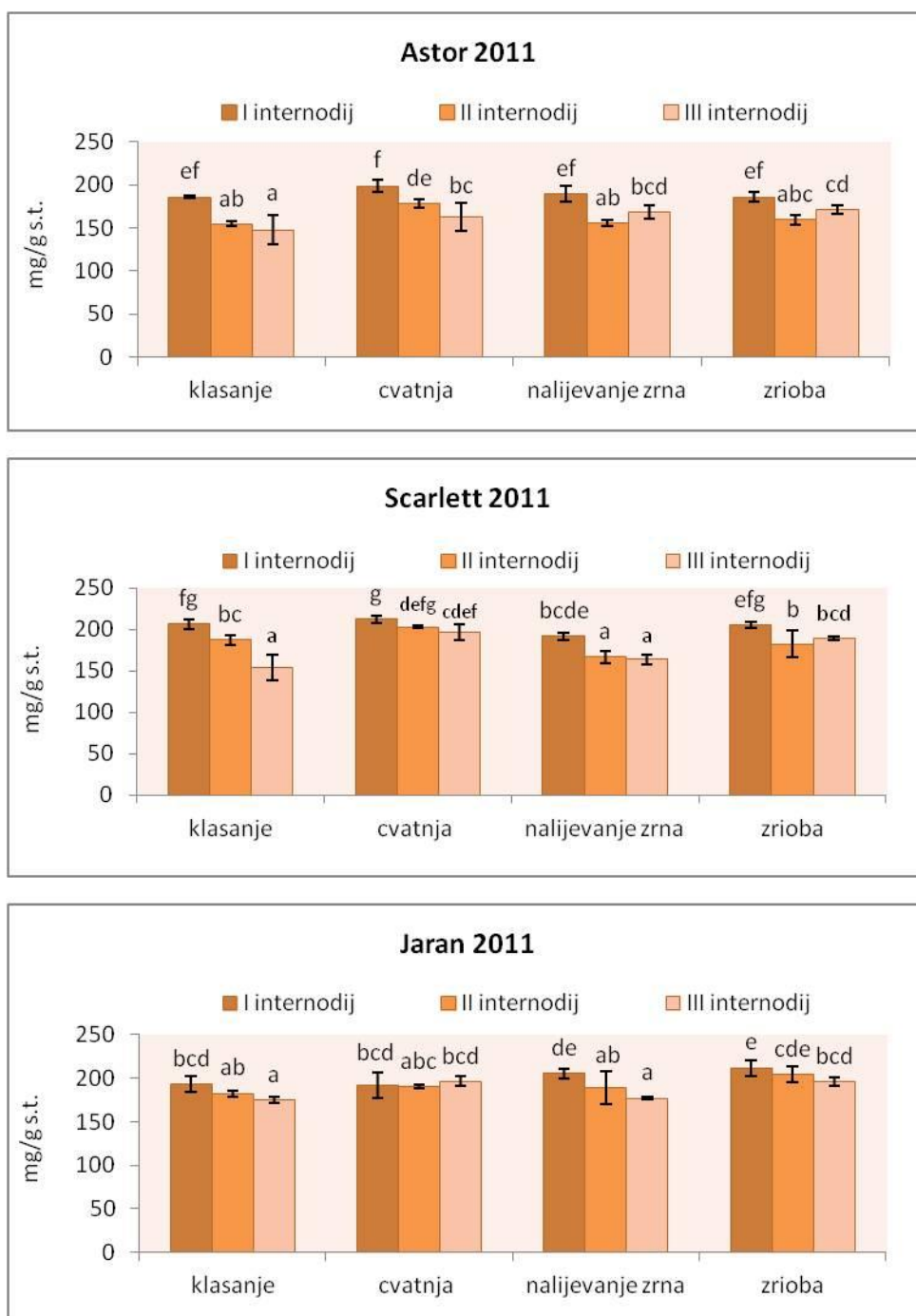
Slika 43. Sadržaj ukupnog lignina u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran, izražena u miligramima po gramu suhe tvari (mg/g s.t.), tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

Sadržaj ukupnog lignina u 2011. godini u svim sortama se značajno povećava tijekom razvoja stabljike, odnosno od faze klasanja do faze zriobe.

U sorti Astor (slika 44) u prvom internodiju najveći je sadržajni ukupnog lignina u usporedbi s drugim i trećim u svim razvojnim fazama i ne mijenja se tijekom razvoja. U drugom internodiju sadržaj se poveća u fazi cvatnje, a smanji u fazama nalijevanja zrna i zriobe. U fazi klasanja u trećem internodiju dolazi do porasta sadržaja ukupnog lignina te ona ostaje ista do faze zriobe. Najveći sadržaj ukupnog lignina u sorti Astor izmjerila sam u prvom internodiju u fazi cvatnje (198,3 mg/g s.t.), a najmanji (147,5 mg/g s.t.) u fazi klasanja u trećem internodiju.

U prvom internodiju sorte Scarlett (slika 44) sadržaj ukupnog lignina veći je u usporedbi s drugim internodijem u fazama nalijevanja zrna i zriobe, a trećim u fazama cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe. U prvom internodiju sadržaj ukupnog lignina značajno se ne mijenja u fazama klasanja, cvatnje i zriobe, a u fazi nalijevanja zrna je manji. U drugom i trećem internodiju sadržajni lignina je jednak i poveća se u fazi nalijevanja zrna, zatim se smanji u fazi cvatnje i opet poveća u fazi zriobe. Najveći sadržaj ukupnog lignina u sorti Scarlett izmjerila sam u prvom internodiju (205,2 – 211,9 mg/g s.t.), a najmanji u trećem internodiju u fazi klasanja (154,04 mg/g s.t.).

U 2011. godini najveći sadržaj ukupnog lignina izmjerila sam u prvom internodiju (212,0 mg/g s.t.) u fazi zriobe, a najmanji u trećem u fazi klasanja (175,07 mg/g s.t.) i fazi nalijevanja zrna (176,8 mg/g s.t.) u sorti Jaran (slika 44). U prvom internodiju sadržajni ukupnog lignina veći je obzirom na treći internodij u fazama klasanja, nalijevanja zrna i zriobe, a u fazi nalijevanja zrna obzirom na drugi internodij. U fazi klasanja i zriobe nema značajne razlike u sadržaju lignina između prvog i drugog internodija. Također, tijekom četiri razvojne faze nema značajne razlike u sadržajni ukupnog lignina između u drugog i trećeg internodija sorte Jaran.



Slika 44. Sadržaj ukupnog lignina u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran, izražena u miligramima gramu suhe tvari (mg/g s.t.), tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2011. godini. Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

3.9. Sadržaj celuloze

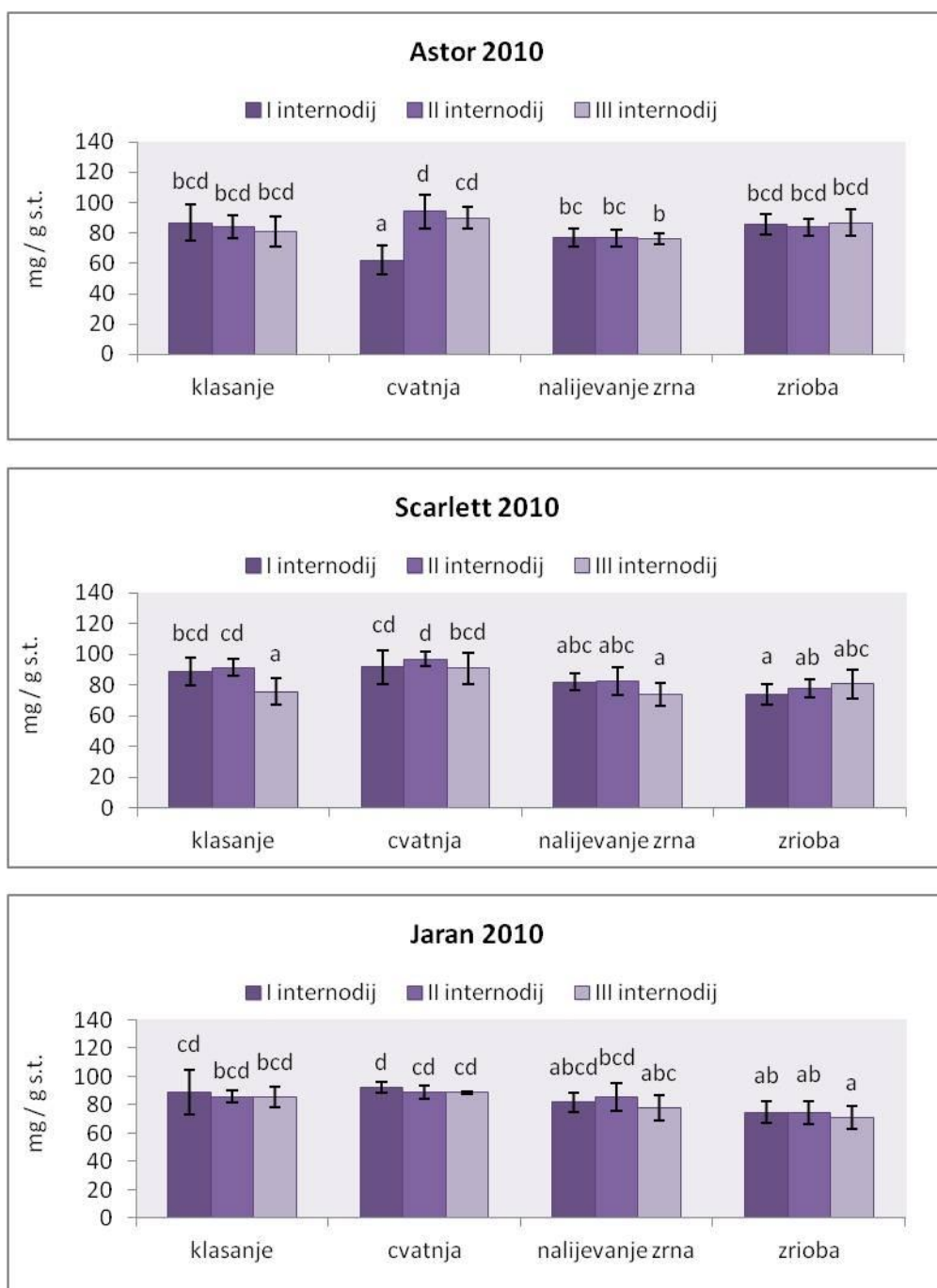
Stanična stijenka najvećim je dijelom izgrađena od celuloze. Molekule celuloze organizirane su u mikrofibrile koji čine temelj za ugradnju polimera koji također sudjeluju u izgradnji stanične stijenke. Sadržaj celuloze mjerila sam u internodijima tri sorte jarog ječma, Astor, Scarlett i Jaran, tijekom dvije vegetacijske sezone (2010. i 2011. godina) kroz četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba i izražen u miligramima celuloze po gramu suhe tvari (mg/g s.t.).

U sorti Astor (slika 45) sadržaj celuloze značajno se ne mijenja između internodija u fazama klasanja, nalijevanja zrna i zriobe u 2010. godini. U fazi cvatnje u drugom i trećem internodiju sadržaj celuloze je jednak, ali veći u usporedbi s prvim internodijem gdje sam ujedno izmjerila i najmanji sadržaj celuloze (61,9 mg/g s.t.).

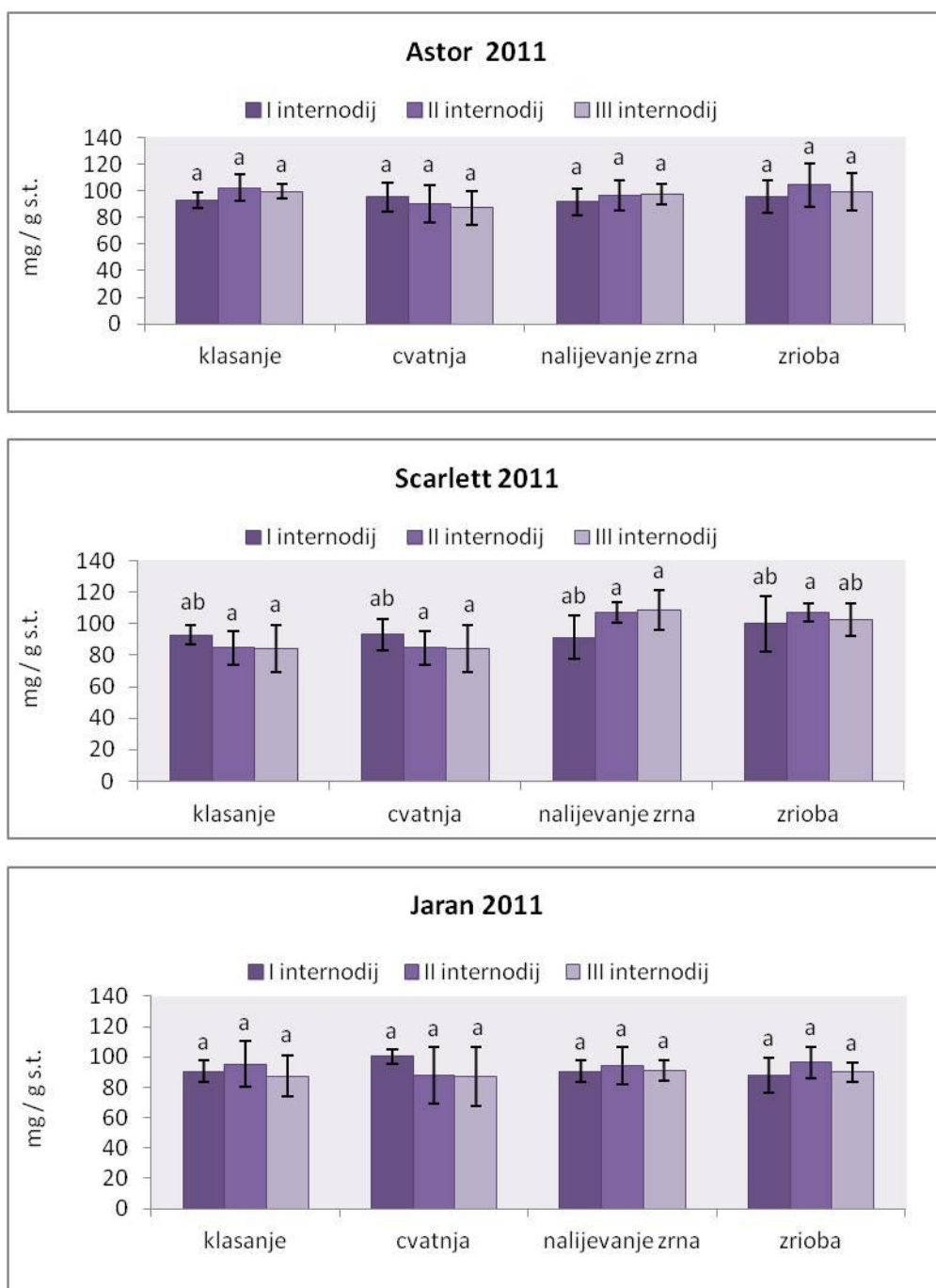
Sadržaj celuloze značajno se ne mijenja između prvog, drugog i trećeg internodija u fazi cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe u sorti Scarlett (slika 45). U fazi klasanja sadržaj celuloze jednak je u prvom i drugom internodiju, a veći u odnosu na treći internodij. Tijekom razvoja, u fazi zriobe dolazi do smanjenja sadržaja celuloze, u usporedbi s fazom klasanja, u prvom i drugom internodiju. U trećem internodiju sadržaj celuloze je promjenjiv tijekom četiri razvojne faze. Najveći sadržaj celuloze izmjerila sam u drugom internodiju (96,87 mg/g s.t.) u fazi cvatnje.

U svim internodijima sorte Jaran (slika 46) dolazi do postupnog smanjenja sadržaja celuloze od faze klasanja do faze zriobe, a unutar pojedine razvojne faze nema značajne razlike u sadržaju celuloze između prvog, drugog i trećeg internodija. Najveći sadržaj celuloze izmjerila sam u prvom internodiju (92,1 mg/g s.t.) u fazi cvatnje, a najmanji u fazi zriobe u trećem internodiju (71,05 mg/g s.t.) u 2010. godini.

U 2011. godini nema značajne razlike u sadržaju celuloze između prvog, drugog i trećeg internodija tijekom četiri razvojne faze u sortama jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran (slika 47).



Slika 45. Sadržaj celuloze u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran, izražena u miligramima gramu suhe tvari (mg/g s.t.), tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).



Slika 46. Sadržaj celuloze u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran, izražena u miligramima po gramu suhe tvari (mg/g s.t.), tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2011. godini. Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

3.10. Ekspresija gena *HvCCR* i *HvCAD* u stabljici ječma

Ulaganje lignina u staničnu stijenku složen je proces koji je pod utjecajem brojnih čimbenika u okolišu i u samoj stanici. Istraživanje ekspresije gena biosintetskog puta lignina ima važnu ulogu u razumijevanju procesa lignifikacije u biljkama. Za ovo istraživanje odabrala sam gene *CCR* i *CAD* koji sudjeluju u specifičnom putu sinteze monolignolskih podjedinica. Enzim *CCR* nalazi se na početku biosintetskog puta i pretvara hidroksicimetne estere CoA u aldehide, a *CAD* na kraju puta te omogućava pretvorbu cimetnih aldehida u alkohole, monolignole, koji sudjeluju u izgradnji lignina.

Ekspresiju gena *HvCCR* i *HvCAD* izmjerila sam u internodijima sorti Astor, Scarlett i Jaran tijekom razvojnih faza: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna, i zrioba. Normalizaciju sam izvršila u odnosu na gen *HvGAPDH*, a dobivene normalizirane vrijednosti usporedila u odnosu na kalibrator koji je za svaki internodij predstavljao uzorak u fazi klasanja (slika 47 i 48).

U prvom i trećem internodiju sorte Astor ekspresija gena *HvCCR* (slika 47) najveća je u fazi cvatnje dok je u drugom ekspresija pri cvatnji smanjena u odnosu na fazu klasanja. U fazi nalijevanja zrna ekspresija je pojačana u prvom i trećem internodiju za razliku od drugog gdje se ona bitno ne mijenja u odnosu na fazu klasanja. U fazi zriobe ekspresija gena *HvCCR* u prvom i trećem internodiju jednaka je kao i u fazi klasanja dok je u drugom internodiju smanjena. Ekspresija gena *HvCAD* značajno je veća u fazi cvatnje u svim internodijima. U fazi nalijevanja zrna ekspresija u prvom internodiju se ne mijenja u odnosu na fazu klasanja za razliku od trećeg internodija gdje je pojačana, a u drugom internodiju je smanjena. U posljednjoj razvojnoj fazi – zriobi ekspresija gena *HvCAD* u prvom internodiju je smanjena, u drugom jednaka, a u trećem povećana obzirom na klasanje.

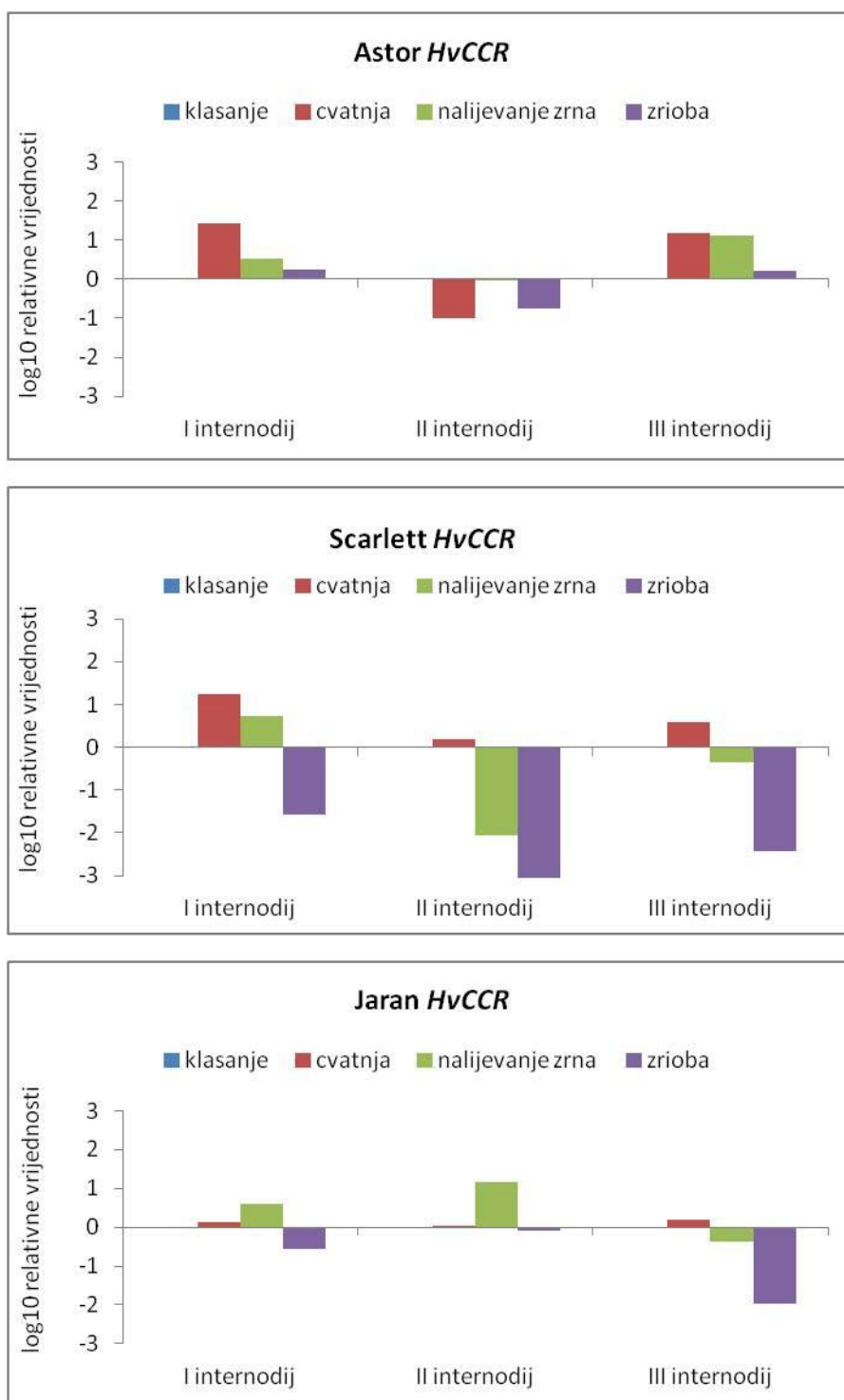
Rezultati ekspresije gena *HvCCR* u sorti Scarlett pokazuju da je ona, u odnosu na fazu klasanja, najmanja u svim internodijima u fazi zriobe, a značajno povećana tijekom cvatnje, ali samo u prvom i trećem internodiju. U drugom internodiju ekspresija u cvatnji je bila jednaka kao u fazi klasanja, a smanjivala se u fazi nalijevanja zrna. Gen *HvCAD* (slika 48) pokazuje sličnu ekspresiju u fazi cvatnje kao i gen *HvCCR* odnosno u

prvom i trećem internodiju ekspresija je povećana dok se u drugom ne mijenja u odnosu na fazu klasanja. U prvom internodiju u fazi nalijevanja zrna i zriobe ekspresija *HvCAD* je smanjena. U drugom internodiju ekspresija se smanjuje s razvojem, a u trećem internodiju sorte Scarlett najveća ekspresija *HvCAD* je u fazi cvatnje i nalijevanja zrna dok je u zriobi smanjena u usporedbi sa fazom klasanja.

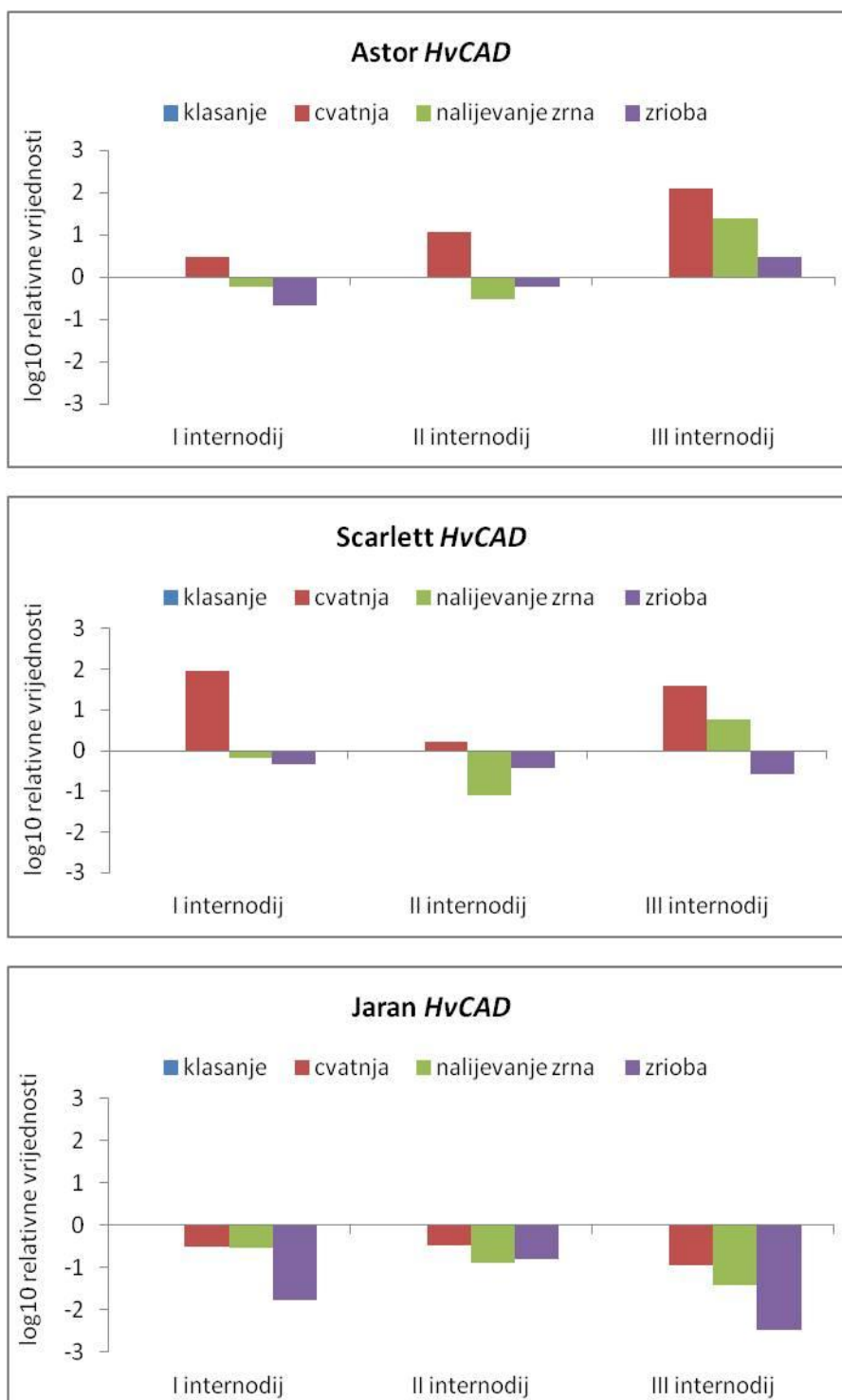
U sorti Jaran (slika 48) prvi internodij ima pojačanu ekspresiju *HvCCR* u fazi nalijevanja zrna, a u zriobi se smanjuje. U drugom internodiju nema značajnih promjena u fazi cvatnje i zriobe za razliku od faze nalijevanja zrna gdje je ekspresija pojačana. *HvCCR* u trećem internodiju ima istu ekspresiju u fazi cvatnje, zatim se ona značajno smanjuje s razvojem. U svim internodijima sorte Jaran ekspresija *HvCAD* značajno je smanjena u fazi cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe u odnosu na fazu klasanja.

Na slici 49. prikazana je ekspresija gena *HvCCR*, a na slici 50. gena *HvCAD* izražena prema uzorku s najvećom izmjerenom ekspresijom unutar pojedine sorte kao kalibratorom. Rezultati pokazuju da je najveća ekspresija gena *HvCCR* u trećem internodiju svih sorti u fazi cvatnje. Ukupno najmanja ekspresija gena *HvCCR* je u fazi zriobe u svim internodijima.

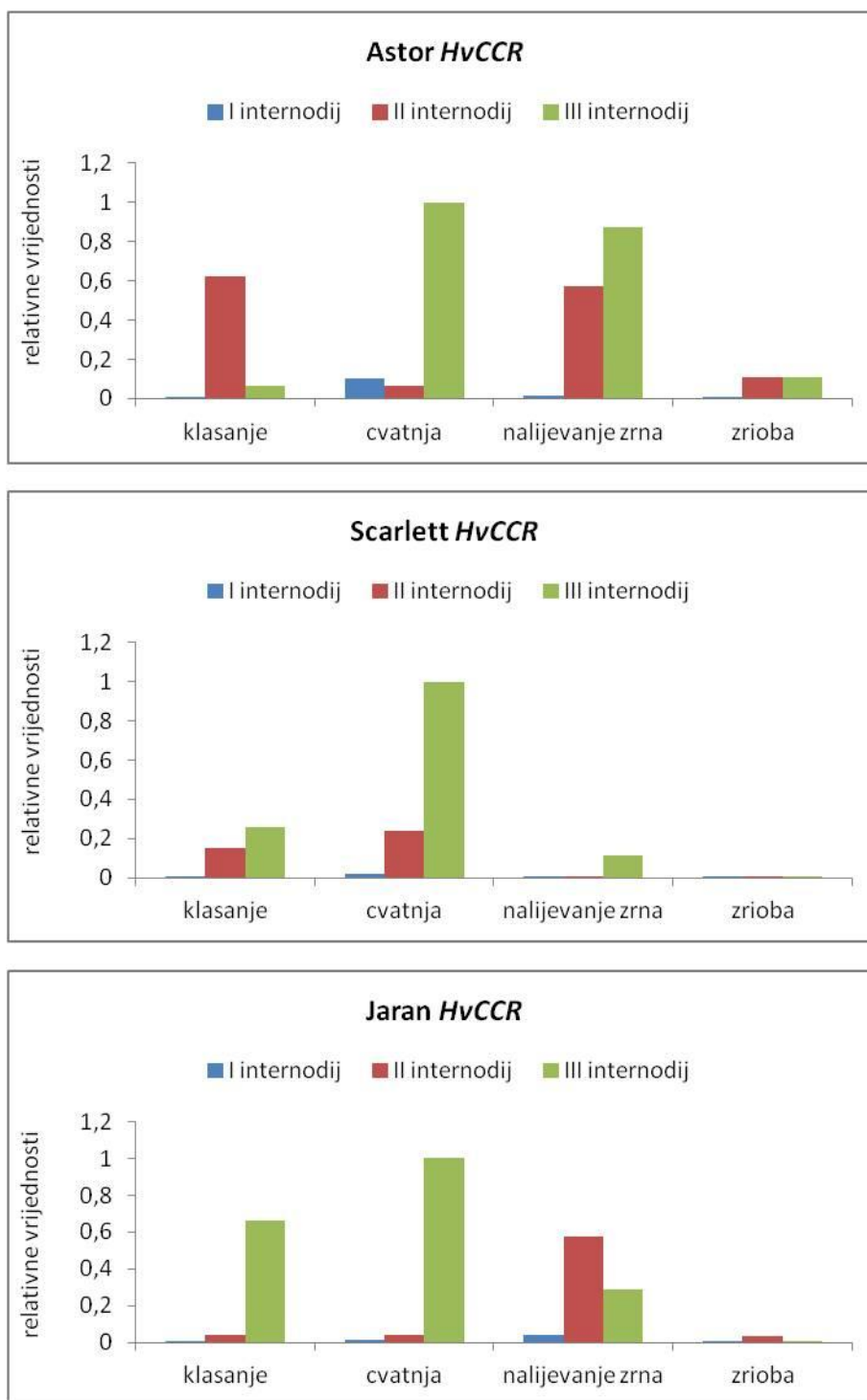
Ekspresija gena *HvCAD* mijenja se ovisno o sorti ječma i razvojnoj fazi pa je tako u najveća ekspresija ovog gena u fazi cvatnje u drugom i trećem internodiju sorte Astor te trećem internodiju sorte Scarlett. U sorti Jaran najveća je ekspresija gena *HvCAD* u fazi klasanja u trećem internodiju (slika 50).



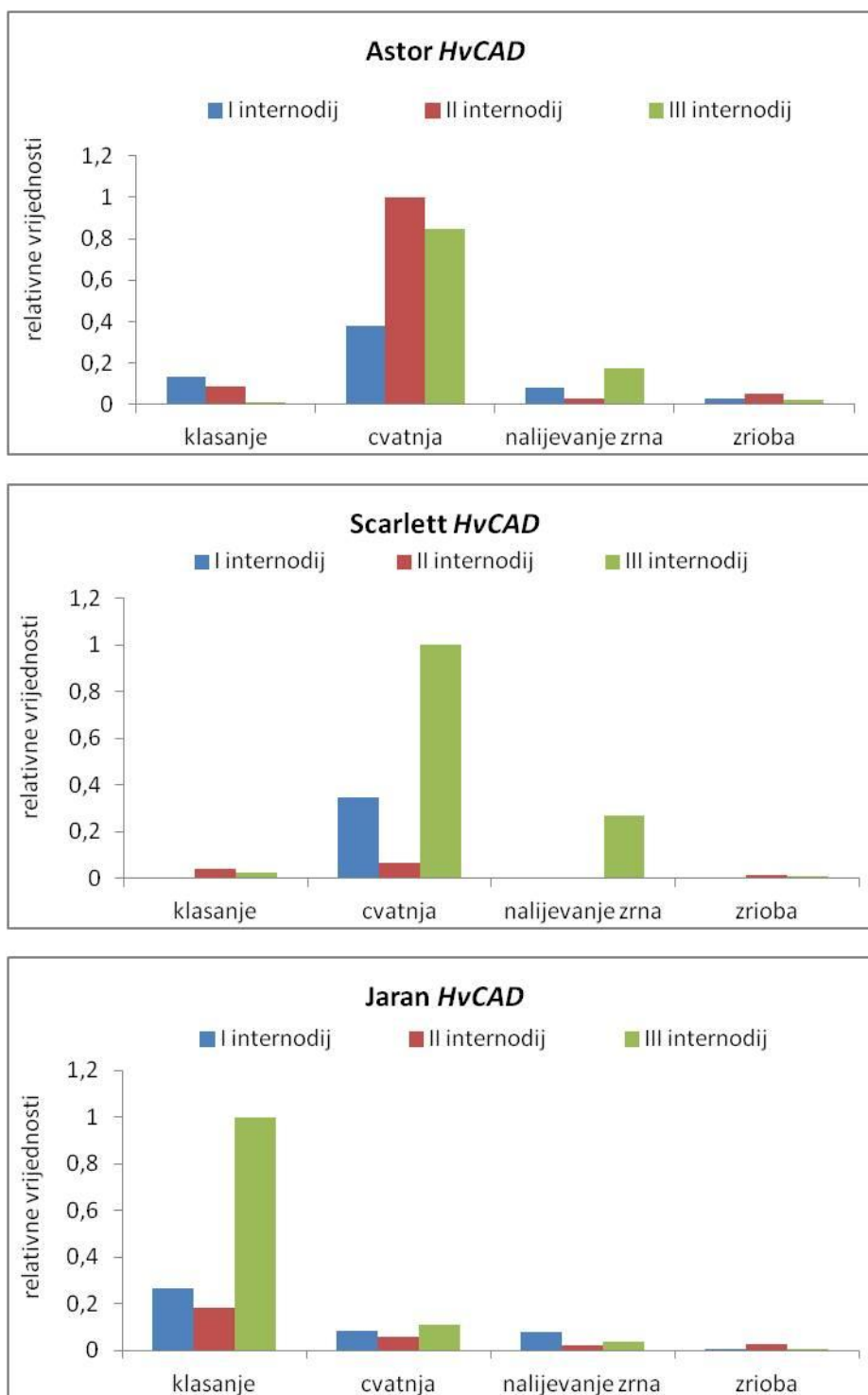
Slika 47. Ekspresija gena *HvCCR* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Rezultati su prikazani kao log₁₀ relativne vrijednosti, a ekspresija je izražena u odnosu na pojedini internodij u fazi klasanja za svaku sortu (kalibrator ima vrijednost 0).



Slika 48. Ekspresija gena *HvCAD* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Rezultati su prikazani kao log₁₀ relativne vrijednosti, a ekspresija je izražena u odnosu na pojedini internodij u fazi klasanja za svaku sortu (kalibrator ima vrijednost 0).

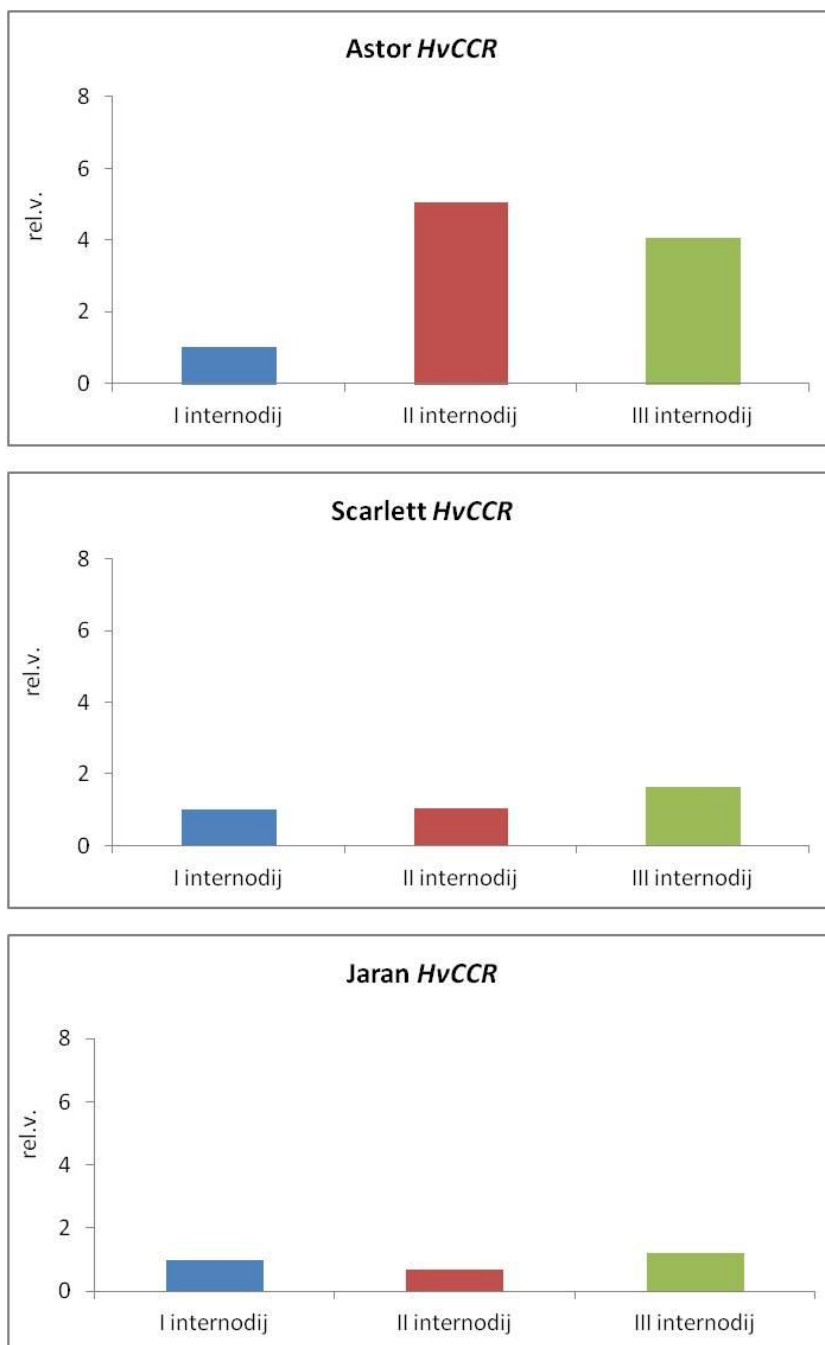


Slika 49. Ekspresija gena *HvCCR* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Rezultati su prikazani kako relativne vrijednosti, a ekspresija je izražena u odnosu na uzorak s najvećom ekspresijom tijekom sve četiri razvoje faze za pojedinu sortu (kalibrator ima vrijednost 1).



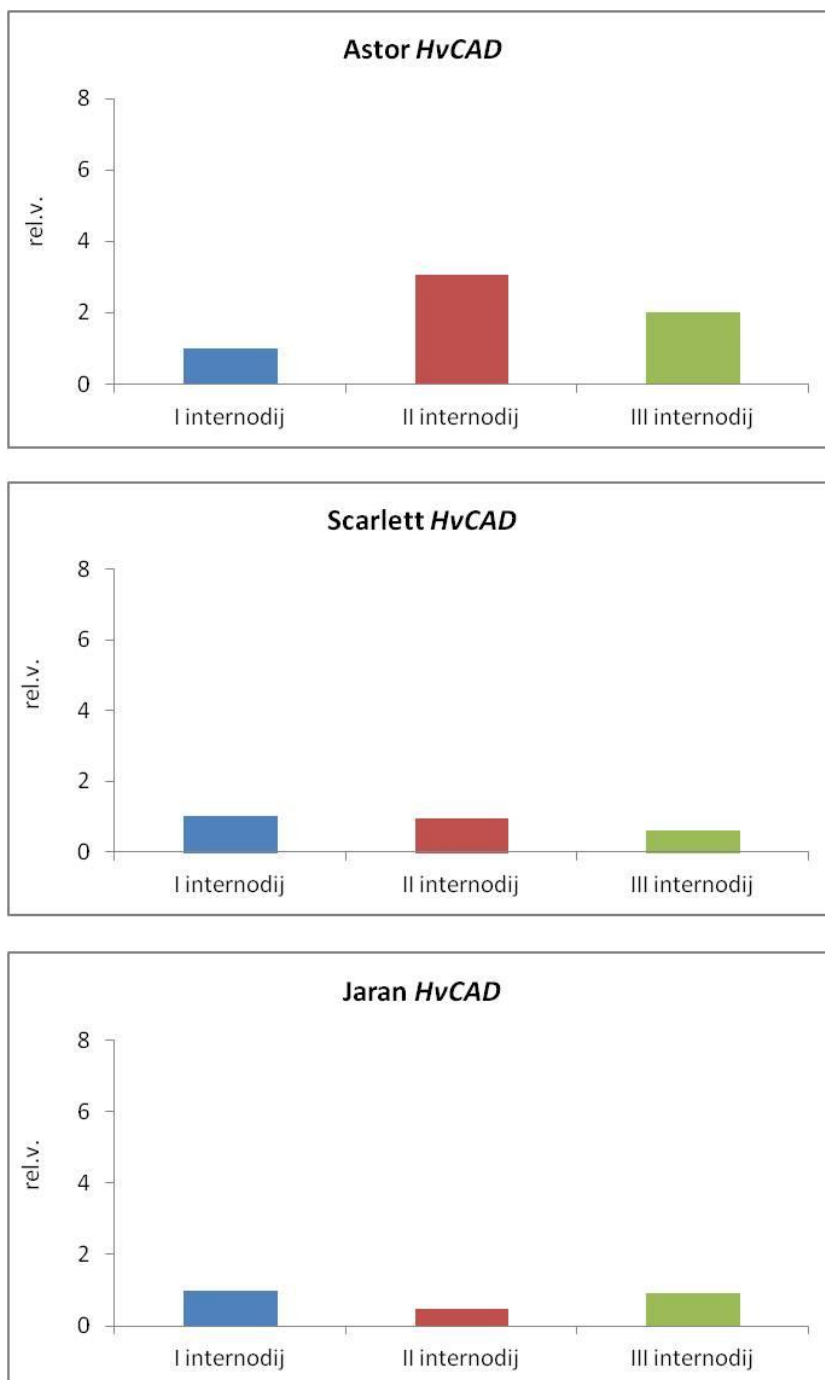
Slika 50. Ekspresija gena *HvCAD* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasiranje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini. Rezultati su prikazani kako relativne vrijednosti, a ekspresija je izražena u odnosu na uzorak s najvećom ekspresijom tijekom sve četiri razvojne faze za pojedinu sortu (kalibrator ima vrijednost 1).

U 2011. godini ekspresija gena izmjerena je u fazi nalijevanja zrna u tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran (slika 50). Rezultate sam prikazala u odnosu na prvi internodij (kalibrator) unutar svake pojedine sorte. Ekspresija gena *HvCCR* u sorti Astor pet puta je veća u drugom, a četiri puta u trećem internodiju u usporedbi s prvim. U sortama Scarlett i Jaran ekspresija gena *HvCCR* je podjednaka u svim internodijima.



Slika 51. Ekspresija gena *HvCCR* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom faze nalijevanja zrna u 2011. godini. Rezultati su prikazani kako relativne vrijednosti, a ekspresija je izražena u odnosu na prvi internodij (kalibrator ima vrijednost 1) unutar pojedine sorte.

Ekspresija gena *HvCAD* (slika 51) u internodijima tri sorte jarog ječma slična je kao i ekspresija gena *HvCCR*. Naime, u sorti Astor najveća je u drugom internodiju (tri puta), a u trećem dva puta veća u usporedbi s prvim internodijem. U sortama Scarlett i Jaran također ekspresija gena *HvCAD* jednaka je u sva tri internodija.



Slika 52. Ekspresija gena *HvCAD* u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom faze nalijevanja zrna u 2011. godini. Rezultati su prikazani kako relativne vrijednosti, a ekspresija je izražena u odnosu na prvi internodij (kalibrator ima vrijednost 1) unutar pojedine sorte.

4. RASPRAVA

Proces lignifikacije jedan je od važnih segmenata biljnog razvoja te diferencijacije stanica i tkiva i kao takav ovisi o brojnim čimbenicima. Zbog svoje složenosti, proces lignifikacije još uvijek je neistražen u brojnim segmentima. Istraživanja biosinteze lignina te njegovog ulaganja u staničnu stijenku rađena su u većini na golosjemenjačama radi njihove važnosti za drvnu i prerađivačku industriju te u dvosupnicama kao što je duhan i posebno uročnjaku (*Arabidopsis thaliana* L.) kao modelnom organizmu u istraživanjima biljne biologije (Boerjan i sur., 2003). Istraživanja lignifikacije u ječmu za sada su oskudna u usporedbi s ostalim pripadnicima porodice trava kao što su riža, pšenica, kukuruz, a u novije vrijeme u sirku i šećernoj trski.

Čvrstoća stabljike važno je agronomsko svojstvo koje ima direktan utjecaj na prinos pojedine poljoprivredne kulture. U cilju povećanja čvrstoće stabljike procesi oplemenjivanja doveli su do značajnog smanjenja visine stabljike i nastanka polupatuljastog i patuljastog fenotipa što je utjecalo na prinos (Bonawitz i Chapple, 2012; Lalić i sur., 2005; Pedersen i sur., 2005).

Cilj ovog rada je bio istražiti proces lignifikacije na tri razine: anatomskoj, fiziološkoj i molekularnoj u svrhu boljeg razumijevanja ovog procesa u stabljici ječma. Za istraživanje sam izabrala tri sorte jarog ječma, od toga dvije hrvatske Astor i Jaran i njemačka sorta Scarlett.

Anatomska istraživanja, kojima sam obuhvatila lokalizaciju lignina u stanicama i tkivima, primjenom različitih tehnika bojanja, te mjerenje debljine stijenke stanica u internodijima stabljike ječma, imala su za cilj pobliže utvrditi gdje i kojom dinamikom se lignin ulaže u staničnu stijenku tijekom četiri razvojne faze: klanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba. Određivanjem ekspresije gena odgovornih za sintezu i mjerenjem fizioloških parametara, koji sudjeluju u sintezi, te količine samog lignina kao krajnjeg produkta, nastojala sam utvrditi na koji način se odvija i kako je regulirana sinteza lignina u stabljici ječma.

Jare sorte ječma siju se krajem veljače i početkom ožujka, a žanju u srpnju. Brzina rasta i razvoja biljke uvelike ovisi o vremenskim uvjetima, što je ujedno u ovom istraživanju određivalo vrijeme i dinamiku uzorkovanja. Visoke temperature i optimalna vlaga

omogućavaju optimalan rast i prinos. Astor je rana sorta i počinje klasati prva, a iza nje slijede Jaran (srednje rana sorta) i Scarlett (sjeverni tip ječma) koje klasaju sedam do deset dana kasnije (Lalić i sur., 2009). Tijekom istraživanja u 2010. godini, u razdoblju uzorkovanja od svibnja do lipnja, vladali su vrlo nepovoljni vremenski uvjeti s obilnom kišom (tablica 4) što je u konačnici utjecalo i na prinos te godine (podaci nisu prikazani).

4.1. Anatomske promjene povezane s lignifikacijom

Stabljika ječma člankovite je građe sastavljena od nodija u kojima se odvija rast u području interkalarnog meristema i internodija. Za potrebe istraživanja u ovom radu koristila sam tri internodija stabljike ječma označivši najstariji kao prvi internodij. Nadalje, radi lokalizacije lignina i celuloze u tkivu pojedinog internodija svaki sam izrezala na tri manja dijela i označila ih kao bazalni, koji graniči s donjim nodijem prethodnog internodija, a u slučaju prvog internodija predstavlja dio baze stabljike iz kojeg rastu ogranci korijena, središnji i gornji dio koji se nalazi na granici s nodijem višeg internodija.

U svrhu lokalizacije lignina i njegovog rasporeda unutar pojedinog internodija prereze sam obojala floroglucinolom (Wiesnerova reakcija) koji je reagirao s hidroksicimetnim aldehidima i dao crveno obojenje što je ujedno bio i dokaz prisutnosti lignina u području epiderme, kore, provodnim snopićima i djelomično parenhimu (slike 19-21). Najintenzivnije obojenje zamijetila sam u sklerenhimskom prstenu smještenom u području kore u svim sortama što se ne mijenja od klasanja do zriobe. Prstenasti sloj sastoji se od gusto zbijenih stanica manjih dimenzija u odnosu na ostale stanice i s izrazito lignificiranim stijenkama u kojem se nalaze manji provodni snopići (slika 19). U prvim internodijima sklerenhimski prsten smješten je nekoliko slojeva stanica ispod epiderme, a u drugom i trećem internodiju smješten je tik uz epidermu. Obzirom na smještaj i ulogu prvog internodija u građi stabljike ječma, jer upravo on predstavlja

bazu iz kojeg se razvija bočno korijenje tvoreći mrežu s ciljem poboljšanja stabilnosti cijele stabljike, pretpostavljam da i ovakva struktura unutar internodija doprinosi povećanju njegove čvrstoće, a time i stabilnosti cijele biljke. Područje kore razlikuje se među sortama i internodijima u broju slojeva stanica koje ga izgrađuju. U prvom internodiju čini ga 2-3 sloja stanica u sortama Astor i Scarlett, a 3-4 u sorti Jaran. Drugi internodij ima 4-5 slojeva stanica u svim sortama, a treći 3-4 sloja stanica. U području parenhima debljinu stijenki sam izmjerila u sloju koji se proteže od kore do provodnih elemenata i oko njih, a najveći broj slojeva stanica izmjerila sam u prvom internodiju sorte Jaran, a u ostalim internodijima i sortama 2-3 sloja stanica. Značajno je naglasiti da se broj slojeva u kori i parenhimu nije mijenjao tijekom razvojnih faza. Epiderma je građena od jednog sloja stanica različite debljine stijenke ovisno o sorti.

Uspoređujući lignificiranost sklerenhimskog prstena u drugom internodiju sorte Scarlett uočavaju se stanice nešto većeg lumena obzirom na druge dvije sorte (slika 19, žute strelice) međutim, usporedbom ukupne debljine sloja kore u sve tri sorte može se uočiti da je u sorti Scarlett on nešto deblji u odnosu na sorte Astor i Scarlett.

U gornjim dijelovima trećeg internodija u području kore, bliže epidermi, u sorti Scarlett i Jaran stanice s manje lignificiranim stijenkama u fazi cvatnje podudaraju se s mjestima u kojima je ujedno lokalizirana i celuloza u fazi cvatnje (slika 19 i 30), a u fazi nalijevanja zrna u sortama Astor i Scarlett (slika 20 i 31). U fazi zriobe mjesta slabije lignificiranosti stijenki stanica podudaraju se s lokalizacijom celuloze u gornjim dijelovima trećeg internodija sorti Scarlett i Jaran (slika 21 i 32).

U provodnim snopićima lignin se uočava u području ksilema koje čine mrtve stanice (traheje i traheide) zadebljelih stijenki čija uloga je provođenje vode u biljci, a celuloza u floemu. Parenhim sa stanicama različitog volumena i debljine stijenke izgledom je najmanje homogeno područje. Lumen stanica je veći, a stijenke tanje što su one bliže središnjoj šupljini stabljike za razliku od stijenki stanica koje se nalaze bliže području kore (slike 19-21). Također, u parenhimskim stanicama koje se nalaze bliže šupljini stabljike stijenke su manje lignificirane odnosno sadrže više celuloze tijekom razvoja u svim sortama jarog ječma (slika 29).

Istražujući lignifikaciju u internodijima divljeg prosa (*Panicum virgatum* L. cv. Alamo) tijekom faze elongacije i u tri stadija reproduktivne faze Shen i sur. (2009) uočili su jaču lignificiranost stijenki u starijim internodijima. Stanice u području kore i oko provodnih elemenata imaju jače lignificirane stijenke kao i stanice parenhima koje graniče s ovim područjem. Tijekom razvoja internodija na početku faze elongacije područje parenhima i dijelovi oko provodnih elementa slabo su lignificirani, za razliku od provodnih snopića, a s približavanjem reproduktivnoj fazi jače se lignificiraju. Do sličnih saznanja došli su i Sarath i sur. (2007) uočivši tanje stijenke u stanicama mlađih internodija, a jače lignificirane u starijim, osobito u području sklerenhimskog prstena, u divljem prosu, a Lepeduš i sur (2010) u stabljici ječma. Rezultati istraživanja na raznim sortama ječma također pokazuju sličnosti U kukuruзу (*Zea mays* L.) nakon završene elongacije internodija sklerenhim oko provodnih snopića jače zadeblja, a parenhimske stanice u središtu stabljike jače se lignificiraju (Jung i Casler, 2006b).

Ligninske polimere izgrađuju siringilne (S), gvajacilne (G) i *p*-hidroksifenilne (H) podjedinice koje nastaju povezivanjem monolignola, *p*-kumarilnog, koniferilnog i sinapilnog alkohola. Sastav lignina u biljkama određen je upravo kombinacijom ovih podjedinica (Vanholme i sur., 2010). Lignin pripadnika porodice trava (*Poaceae*) pa tako i ječma, sastoji se većinom od podjedinica S i G u podjednakom omjeru, a nešto manje podjedinica H, ali značajno više nego u dvosupnicama i golosjemenjačama (Grabber i sur., 2004). U cilju vizualnog razlikovanja podjedinica S i G u dijelovima pojedinog internodija primijenila sam bojanje po Maüleu pri čemu se podjedinice S boje crveno, a G žuto. Promatrajući poprečne prereze internodija tijekom razvoja u svim dijelovima internodija uočila sam podjedinice S, za razliku od podjedinica G koje sam uočila u bazalnim dijelovima internodija (slike 22-25). Budući da su navedeni dijelovi najbliži nodijima u kojima se odvija produžni rast, ulaganje podjedinica G odvija se ranije tijekom razvoja stabljike, a njihovo ulaganje prati i ulaganje podjedinica S.

Dobiveni rezultati u suglasnosti su sa istraživanjem Chen i sur. (2002) u kojem su usporedbom anatomskih i biokemijskih analiza sastava lignina u internodijima tijekom razvoja stabljike trstikaste vlasulje (*Festuca arudinacea* L.) zaključili da promjena boje

od žute prema crvenoj, od reproduktivne faze do pune zriobe, ukazuje na pojačanu sintezu podjedinica S što rezultira povećanjem omjera S/G i ukupnog sadržaja lignina.

U cjelini, ulaganje podjedinica G odvija se s istovremenim povećanjem ulaganja podjedinica S tijekom lignifikacije primarne stijenke parenhimskih stanica kao i u primarnim i sekundarnim stijenkama stanica ksilema i sklerenhima. Ksilem i sklerenhim se lignificiraju prije parenhimskog tkiva i imaju veći omjer S/G kao i sadržaj lignina u zrelosti biljke (Chesson i sur., 1997). Lignin u parenhimu sastoji se od podjedinica G i S s time da su podjedinice S brojnije, za razliku od traheida u protoksilemu i metaksilemu gdje se uz G i S nalaze i podjedinice H (Barrière i sur., 2007).

Ulaganje lignina slijedi nakon ulaganja celuloze i hemiceluloze u staničnu stijenku (Bidlack i Buxton, 1992; Morrison i Buxton, 1993), a unakrsno povezivanje polisaharidnih komponenti s monolignolima putem hidroksicmetnih kiselina (pCA i FA) označava početak lignifikacije i određuje njegovu dinamiku ovisno o vrsti i funkciji tkiva. Istraživanja su pokazala da lignifikacija započinje u kutovima stanice u području središnje lamele bogate pektinom i nastavlja se prema središtu stanice smanjujući njezin lumen (Morrison i sur., 1998).

Zadebljanje stanične stijenke direktna je posljedica ulaganja lignina. U cilju određivanja debljine stijenke mjerenja sam provela u središnjem dijelu svakog internodija zbog anatomskih različitosti u građi bazalnog i gornjeg dijela internodija koje sam utvrdila prilikom histokemijskog dokazivanja lignina. Mjereći duljinu i širinu vanjskog dijela te lumena stanice iz dobivenih omjera izračunala sam koeficijent lignifikacije, odnosno debljinu stijenke u području epiderme, kore i parenhima internodija tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran.

Rezultati dobiveni mjerenjem pokazuju da je ulaganje lignina ovisno o sorti i razvojnoj fazi. U stanicama epiderme ulaganje lignina povećava se od prvog prema drugom i trećem internodiju u sortama Astor i Jaran dok se u sorti Scarlett smanjuje (slika 26). U sortama Scarlett i Jaran intenzivno ulaganje lignina, vidljivo kao porast debljine stijenke, započinje u fazi cvatnje u području kore u prvom i drugom internodiju te u parenhimu u trećem internodiju (slika 27). U sorti Scarlett u ovoj fazi je i ukupno najdeblja stijenka u prvom i drugom internodiju za razliku od sorte Jaran koja ima

najdeblje stijenke stanica kore u fazi zriobe u svim internodijima. Za razliku od sorti Scarlett i Jaran, u sorti Astor najveći porast ulaganja lignina u svim internodijima, što je i ujedno najveća izmjerena debljina stijenke, vidljiv je u fazi nalijevanja zrna u stanicama kore (slika 27). Parenhim se u pravilu lignificira kasnije nego potporno tkivo, sklerenhim. Debljina stijenke parenhima najveća je u fazi zriobe u sorti Astor, u fazi cvatnje u sorti Scarlett i u fazi nalijevanja zrna u sorti Jaran (slika 28).

Uspoređujući dinamiku ulaganja lignina u područje epiderme i kore rezultati pokazuju da se u području kore pojačano ulaganje lignina odvija istovremeno u sva tri internodija sorte Astor u fazi nalijevanja zrna te sorte Jaran u fazi cvatnje. U sorti Scarlett većina lignina u prvom i drugom internodiju uloži se u fazi cvatnje kao i u sorti Jaran, a u trećem u fazi nalijevanja zrna kao u sorti Astor. U području epiderme ulaganje lignina u pojedini internodij mijenja se ovisno o razvojnoj fazi pa tako u sortama Astor i Scarlett ulaganje lignina u prvi internodij odvija se u fazi klasanja, a u sorti Jaran u fazi cvatnje. U drugom internodiju ulaganje lignina u sorti Scarlett i Jaran odvija se u fazi cvatnje, a u fazi nalijevanja zrna u sorti Astor. U sortama Scarlett i Jaranu području epiderme u trećem internodiju najviše lignina se uloži u fazi nalijevanja zrna, a u sorti Astor u fazi cvatnje. Ulaganje lignina u područje parenhima u sortama Scarlett i Jaran prati dinamiku ulaganja lignina u područje kore što se razlikuje od sorte Astor gdje se većina lignina uloži u fazi zriobe.

Dobiveni rezultati pokazuju dinamiku ulaganja lignina u staničnu stijenku istraživanih sorti jarog ječma obzirom na fazu klasanja kada sam započela uzorkovanje. Kada usporedimo ulaganje lignina među sortama u pojedinom internodiju rezultati pokazuju da u području epiderme, ako se promatra ulaganje lignina u duljinu stanice (dv/dl) debljina stijenke prvog i drugog internodija u fazi klasanja i cvatnje najmanja je u sorti Astor, a najveća u sorti Jaran dok sorta Scarlett ima manju debljinu stijenki u prvom i drugom internodiju u fazi nalijevanja zrna i zriobi, a u trećem internodiju samo u zriobi obzirom na sorte Astor i Jaran (u prilogu slika 53). U području kore sorta Scarlett ima najtanje stijenke u trećem internodiju u svim fazama, a u drugom u fazi nalijevanja zrna i zriobe (u prilogu slika 54). Najdeblje stijenke drugom internodiju izmjerene su u sorti Jaran u fazi cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe. Ulaganje lignina u širinu stanice u trećem internodiju (omjer $šv/šl$) najveće je u sorti Astor u svim razvojnim fazama (u prilogu

slika 53). Područje parenhima najmanje je lignificirano u odnosu na ostale dijelove internodija. Uspoređujući lignificiranost stijenki stanica parenhima u svim internodijima u fazi zriobe (dv/dl) najdeblje stijenke ima sorta Astor, a najtanje sorta Scarlett (u prilogu slika 55). U ostalim razvojnim fazama debljina stijenki parenhima u pojedinim internodijima, a time i ulaganje lignina, ne pokazuje nikakvu pravilnost već se mijenja unutar svake sorte i razvojne faze (u prilogu slika 55).

Istraživanja ukazuju da pojačana lignificiranost, a time i deblja stijenka stanica u području kore značajno utječe na čvrstoću stabljike (Dunn i Briggs, 1989). Cenci i sur. (1984) su u svojim istraživanjima stabljike ječma, analizirajući anatomske promjene vezane uz lignifikaciju u pojedinim internodijima nekoliko sorti u fazi zriobe, zaključili da postoji velika raznolikost u debljini sklerenhima. Rezultati mjerenja visine biljke, duljine internodija, debljine stabljike, duljine i širine epidermalnih stanica te debljine stijenki stanica sklerenhima u četiri sorte, koje se međusobno razlikuju u visini stabljike, pokazali su da više sorte imaju deblje stijenke, a niže sorte tanje stijenke. Također ukupna debljina sklerenhimskog prstena u području kore smanjuje se od najstarijeg prema višim, mlađim internodijima i veća je u višim sortama. Navedeni rezultati podudaraju se s rezultatima dobivenim mjerenjem debljine stanične stijenke u istraživanim sortama jarog ječma. Naime, najdeblje stijenke u pojedinim razvojnim fazama i internodijima ima sorta Jaran koja je ujedno i najviša sorta dok su sorte Astor i Scarlett nižeg habitusa i imaju tanje stijenke.

Slični rezultati dobiveni su prilikom istraživanja morfoloških i anatomskih karakteristika stabljike 17 genotipova pripadnika roda *Miscanthus sp.* (Kaack i sur., 2003). Jače lignificirano područje sklerenhima bliže epidermi i oko provodnih elemenata povezano je s većom čvrstoćom stabljike. Područje parenhima ovom svojstvu ne doprinosi debljinom stijenki stanica već svojom ukupnom debljinom u stabljici na način da ispunjava središte stabljike i time sprječava njezino savijanje i pucanje.

4.2. Fiziološki pokazatelji lignifikacije

Peroksidaze skupine III sudjeluju u brojnim procesima u stanici uključujući i lignifikaciju gdje u posljednjem koraku sinteze lignina oksidiraju monolignole (*p*-kumarilni, koniferilni i sinapilni alkohol), pri čemu nastaju radikali čijim međusobnim povezivanjem nastaje ligninski polimer. Brojna istraživanja bave se ulogom peroksidaza u procesima lignifikacije posebno golosjemenjača i dvosupnica (Barceló i sur., 2004; Lepeduš i sur., 2004; Marjamaa i sur., 2006; Marjamaa i sur., 2009; Mustapić-Karličić i sur., 2010; Sato i sur., 1993), ali istraživanja na jednosupnicama vrlo je malo.

Kako bih istražila povezanost peroksidaza sa procesom lignifikacije u stabljici jarog ječma analizirala sam njihovu aktivnost *in situ*, izmjerila enzimsku aktivnost i odredila izoenzimske forme elektroforezom u agaroznom gelu.

Aktivnost peroksidaza *in situ* odredila sam koristeći smjesu gvajakola i vodikovog peroksida u kojoj sam inkubirala poprečne prereze internodija. Rezultati pokazuju da aktivnost peroksidaza kolokalizira s ligninom u internodijima stabljike jarog ječma (slika 33). Peroksidaze su najaktivnije u prvom internodiju u području sklerenhimskog prstena kojeg čini sloj jače lignificiranih stanica, a u drugom i trećem aktivnost je najveća u području kore kojeg čini sklerenhimsko tkivo kao i u provodnim snopićima u području ksilema svih sorti jarog ječma (slike 34-37). Parenhim pokazuje najmanju aktivnost gvajakol peroksidaza što se slaže s obzirom da stijenke stanica koje čine parenhim imaju i najmanje lignina. Uspoređujući internodije međusobno aktivnost se smanjuje od prvog prema drugom odnosno trećem internodiju tj. od najstarijeg prema najmlađem internodiju.

Do sličnih saznanja došli su Cesarino i sur. (2012) istražujući aktivnost peroksidaza u internodijima šećerne trske. Naime, utvrđena aktivnost peroksidaza povezana je sa starošću internodija pa je tako najveća u najstarijem, prvom internodiju i smanjuje se prema mlađim internodijima. Također najveću aktivnost zabilježili su u području sklerenhima bliže epidermi odnosno perifernom dijelu stanice. Iako su autori koristili nekoliko supstrata za dokazivanje aktivnosti peroksidaza, među njima i gvajakol, svi su

dali jednake rezultate. Iz svega navedenog može se zaključiti da je aktivnost peroksidaza *in situ* pojačana u tkivima s jače lignificiranim stijenkama.

Enzimsku aktivnost peroksidaza izmjerila sam u ekstraktima tkiva internodija koristeći gvajakol kao supstrat. Dobiveni rezultati pokazali su da je ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza, izražena po masi svježe tvari, u 2010. godini (slika 38) i 2011. godini (slika 39) bila najveća u prvim, a najmanja u trećim internodijima svih sorti jarog ječma tijekom četiri razvojne faze: klasanja, cvatnje, nalijevanja zrna i zriobe. U 2010. godini uspoređujući sve sorte i sve internodije tijekom razvoja, u sorti Scarlett izmjerila sam ujedno i najmanju i najveću aktivnost gvajakol peroksidaza. Najmanja aktivnost bila je u drugom i trećem internodiju na početku uzorkovanja u fazi klasanja, a 15 puta veća u prvom internodiju u fazi nalijevanja zrna. Tijekom 2011. godine izmjerena aktivnost peroksidaza bila je niža u odnosu na ukupne vrijednosti izmjerene u 2010. godini. Najveću aktivnost izmjerila sam u sorti Astor u prvom internodiju u fazi zriobe, a najmanju u trećem internodiju sorte Scarlett u fazi zriobe.

Specifična aktivnost gvajakol peroksidaza, izražena po mg ukupnih proteina (rezultati mjerenja proteina nisu prikazani) u 2011. godini (u prilogu slika 56) podudaraju se s mjerenjima ukupne aktivnosti u stanci. U 2010. godini mjerenja su nešto drugačija u sorti Scarlett dok se u sortama Astor i Jaran dobivene vrijednosti podudaraju s ukupnom aktivnosti gvajakol peroksidaza (u prilogu slika 56). Naime, poznato je da su peroksidaze skupine III uključene u brojne procese u stanci pa tako i u mehanizam obrane od stresa koji nastaje pod utjecajem raznih biotičkih i abiotičkih čimbenika. Budući da je gvajakol sintetički supstrat za sve peroksidaze skupine III, moguće je da povećana specifična aktivnost peroksidaza nije samo rezultat aktivnosti peroksidaza koje sudjeluju u lignifikaciji već i rezultat utjecaja nepovoljnih i promjenjivih vremenskih uvjeta koji su vladali u razdoblju uzorkovanja. Istraživanja na pokusnim poljima uvijek su ovisna o klimatskim uvjetima koji onda mogu imati i značajan utjecaj na ishode mjerenja. U vrijeme uzorkovanja biljnog materijala u 2010. godini palo je izrazito puno oborina (tablica 4). U svibnju je palo 1,5 puta više, a lipnju gotovo 4,5 puta više oborina u odnosu na isto vremensko razdoblje u 2011. godini. Također, temperatura je bila znatno viša, 24°C između faze cvatnje i faze nalijevanja zrna zatim se spustila na 15°C između faze nalijevanja zrna i zriobe. S obzirom da je sorta Scarlett

podrijetlom iz Njemačke, gdje je klima hladnija u odnosu na naše podneblje za razliku od sorti Astor i Jaran koje su bolje prilagođene, pretpostavljam da je to jedan od razloga što rezultati mjerenja specifične aktivnosti gvajakol peroksidaza u 2010. godini odstupaju od mjerenja dobivenih u 2011. godini.

Usporedbom ukupne aktivnosti gvajakol peroksidaza među sortama i internodijima pojedinačno, rezultati pokazuju da prvi internodiji sorte Scarlett i Jaran imaju veću aktivnost u odnosu na sortu Astor razdoblju od faze cvatnje do faze zriobe u 2010. godini (u prilogu slika 57). U drugom internodiju sorta Scarlett se ističe s najvećom aktivnosti u fazi nalijevanja zrna i zriobe, a u trećem internodiju u sorti Scarlett najveći ukupni porast vidljiv je za vrijeme nalijevanja zrna, a u fazi zriobe u sorti Jara. Najveću ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaza u 2011. godini (u prilogu slika 57) izmjerila sam u sorti Scarlett u svim internodijima u fazi klasanja, cvatnje i nalijevanja zrna. U fazi zriobe najveću ukupnu aktivnost izmjerila sam u sorti Astor u svim internodijima u 2011. za razliku od 2010. godine kada ova sorta ima najmanju aktivnost.

Uspoređujući ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaza u 2010. i 2011. godini u sorti Astor najveći porast aktivnosti u 2010. godini. uočava se u fazi nalijevanja zrna, a u 2011.g. u fazi nalijevanja zrna u prvom internodiju, a u fazi zriobe vidljiv je značajan porast u sva tri internodija. U sorti Scarlett u 2010. godini ukupna aktivnost raste u fazi cvatnje u svim internodijima, a u 2011. samo u prvom internodiju dok se u trećem internodiju značajniji porast vidi tek u fazi zriobe. Sorta Jaran ima jednaki porast ukupne aktivnosti u 2010. i 2011. godini u fazi cvatnje.

Porast ukupne aktivnosti peroksidaza u 2011. godini podudara se s povećanim ulaganjem lignina u internodije. Naime, u sorti Astor u fazi nalijevanja zrna povećana ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza prati i pojačano ulaganje lignina u stijenke prvog internodija u području kore, a u fazi zriobe aktivnost peroksidaza značajno poraste kao i ulaganje lignina u stijenke stanica parenhima. U sorti Scarlett najveće ulaganje lignina u prvom internodiju u području kore i parenhimu je u fazi cvatnje i podudara se s pojačanom aktivnosti peroksidaza. U sorti Jaran povećana ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza u fazi cvatnje prati pojačano ulaganje lignina u stijenke stanica sva tri internodija u području kore i parenhima.

U istraživanjima aktivnost peroksidaza u ksilogenezi biljke *Zinnia elegans* (Gabaldón i sur., 2006; López-Serrano i sur., 2004) karakterizirane su i izolirane brojne izoforme peroksidaza koje su imale povećanu aktivnost u tkivima koja se lignificiraju. Istraživanje na pripadnicima golosjemenjača uz korištenje različitih supstrata potvrdilo je sudjelovanje kationskih i anionskih izoformi peroksidaza u procesu lignifikacije (Fagerstedt i sur., 2010; Koutaniemi i sur., 2005).

S ciljem utvrđivanja izoformi skupine III peroksidaza u internodijima stabljike ječma, proteinske ekstrakte razdvojila sam na agaroznom gelu. Iako ovakav način određivanja aktivnosti izoenzima i njihovih izoformi nije uobičajen, poslužio je za razdvajanje anionskih i kationskih izoformi peroksidaza skupine III u internodijima stabljike ječma tijekom četiri razvojne faze. Kao kontrolu koristila sam uzorke klijanaca ječma starih osam i deset dana. Analizom zimograma utvrdila sam prisutnost dviju kationskih izoformi u internodijima svih sorti jarog ječma, za razliku od klijanaca ječma u kojima se nalazila anionska peroksidaza u jednoj izoformi. Prema jačini vrpce u gelu uočila sam da se aktivnost peroksidaza smanjuje od najstarijeg – prvog internodija, u kojem je najveća aktivnost, do najmlađeg – trećeg internodija u kojem je najmanja aktivnost.

Slične rezultate dobili su Cesarino i sur. (2012) istražujući izoforme peroksidaza skupine III u različito starim internodijima stabljike šećerne trske podijelivši svaki internodij na dva dijela, vanjski i unutarnji dio. Vanjski dio (prsten) čine stanice sklerenhima, a unutarnji dio je srčika slabije lignificirana. Razdvojivši izoenzimske forme u gelu uočili su kationske i anionske izoforme peroksidaza. Anionske izoforme ukupno su bile više zastupljene dok su kationske izoforme uočili samo u starijim i lignificiranijim internodijima. Također aktivnost peroksidaza u području sklerenhimskog prstena, odnosno dijela internodija koji ima više lignificirane stijenke bila je veća u odnosu na unutrašnji dio.

Za razliku od istraživanja na internodijima, u istraživanjima provedenim koristeći suspenziju stanica šećerne trske autori (Cesarino i sur., 2013) su uočili da većina peroksidaza koje se izlučuju u medij, a time pretpostavljaju i u apoplast, imaju kationske izoforme. Martínez-Cortés (2011) zaključuje da nije bitno da li su u proces lignifikacije više uključene anionske ili kationske izoforme peroksidaza već je njihova

uloga u tom procesu vjerojatno različita. U prilog tome govore rezultati antisense supresije kationskih peroksidaza koja je dovela je do smanjenja S i G podjedinica u duhanu (Blee i sur., 2003), a supresija anionskih peroksidaza u hibridu *Populus sieboldii* x *P. grandidentata* smanjila je samo sadržaj G podjedinica (Li i sur., 2003).

U biljkama polifenoli su brojna skupina molekula nazvana još i sekundarni metaboliti. Imaju važnu ulogu u obrambenim mehanizmima, provođenju signala kao i u izgradnji mehaničkog i zaštitnog tkiva posebno lignina i suberina, polimera koji sadrže fenole (Boudet, 2007). Upotrebom Folin–Ciocalteuovog reagensa izmjerila sam sadržaj ukupnih topljivih fenola u internodijima tri sorte jarog ječma.

Najmanji sadržaj ukupnih topljivih fenola izmjerila sam u drugom i trećem internodiju sorte Scarlett u fazi klasanja, a najveći u fazi nalijevanja zrna u prvim internodijima svih sorti u 2010. godini (u prilogu slika 58). Usporedbom pojedinog internodija među sortama tijekom 2011. godine ukupni sadržaj topljivih fenola u prvom internodiju najmanji je u fazi klasanja i cvatnji u sorti Astor, za razliku od 2010. godine kada ova sorta ima jednak sadržaj kao i sorte Scarlett i Jaran. Najveći sadržaj topljivih fenola u 2010. godini izmjerila sam u fazi nalijevanja zrna u sortama Scarlett i Jaran. U drugom internodiju u 2010. godini sorta Scarlett ima najmanji sadržaj ukupnih topljivih fenola u fazi klasanja, nalijevanja zrna i zriobe u usporedbi sa sortom Astor. Sorta Astor pak ima najmanji sadržaj ukupnih topljivih fenola u odnosu na Scarlett i Jaran tijekom sve četiri razvojne faze u 2011. godini, a najveću vrijednost ima sorta Scarlett u fazi nalijevanja zrna. U 2010. godini usporedbom trećih internodija među sortama u sorti Scarlett uočava se najmanji sadržaj ukupnih topljivih fenola u svim razvojnim fazama, a najveći sadržaj sam izmjerila u sorti Astor u fazi nalijevanja zrna i zriobe. U trećem internodiju sorta Astor ima najmanji sadržaj tijekom razvoja dok je u sortama Scarlett i Jaran u fazi zriobe najveći sadržaj ukupnih topljivih fenola u 2011. godini (u prilogu slika 58).

U sorti Astor sadržaj ukupnih topljivih fenola značajnije poraste u nalijevanja zrna u svim internodijima, a u sortama Scarlett i Jaran, ukupni porast vidljiv je u fazi cvatnje u svim internodijima u 2010. godini (slika 41). Uspoređujući dobivene rezultate s mjerenjima u 2011. godini uočava se isti trend porasta sadržaja ukupnih topljivih

fenola u sortama Scarlett i Jaran, za razliku od sorte Astor gdje je porast vidljiv u prvom i drugom internodiju u fazi nalijevanja zrna, a u trećem u fazi zriobe u odnosu na fazu klasanja. U fazi zriobe sorta Astor ima najveći sadržaj ukupnih topljivih fenola u svim internodijima (slika 41).

Sarath i sur. (2007) u svojim istraživanjima lignifikacije internodija divljeg prosa (*Panicum virgatum* L.) ukazuju na povećani sadržaj slobodnih fenola u relativno nesignificiranim staničnim stijenkama za razliku od jače lignificiranih dijelova gdje su fenoli vezani u stijenci pa ih je manje. Stanične stijenske pripadnika porodice trava karakterizira veća količina fenolnih kiselina *p*-kumarinske (pCA) i ferulične (FA). Njihova je uloga važna pri ulaganju lignina u staničnu stijenu (Grabber i sur., 2004). Pretpostavlja se da vezanje estera ferulične kiseline predstavlja mjesto inicijacije za ulaganje lignina (Ralph i sur., 1995). Naime, obzirom da povezuju lignin s arabinoksilanima putem esterskih veza, pretpostavka je da se stvaranjem ovakvih veza zaustavlja elongacija stanice što ujedno predstavlja i početak stvaranja sekundarne stanične stijenske (MacAdam i sur., 1992a; MacAdam i sur., 1992b). Do sličnih rezultata došao je i Jung (2003) ukazujući da je stvaranje veza između lignina i ugljikohidrata u stabljici kukuruza potpomognuto esterima ferulične kiseline. Količina pCA u izravnoj je korelaciji s ukupnom količinom S podjedinica uloženi u staničnu stijenu (Barrière i sur., 2007). Dobiveni rezultati govore u prilog važnosti hidroksicimetnih kiselina u ulaganju lignina u staničnu stijenu kao i o njihovoj karakterističnosti za porodicu trava.

Dobiveni rezultati mjerenja sadržaja ukupnih topljivih fenola ne smanjuju se u prvom, najstarijem internodiju već rastu tijekom razvoja što nije u suglasnosti s gore navedenim rezultatima. Međutim, obzirom da su autori analizirali isključivo fenolne kiseline koje sudjeluju u biosintetskom putu lignina, a Folin-Ciocalteuov reagens mjeri ukupne topljive fenole u tkivu smatram da je to jedan od razloga povećanih vrijednosti fenola dobivenih mjerenjem u internodijima ječma tijekom razvoja.

Sinteza celuloze važan je proces za biljke obzirom na važnu ulogu koju celuloza ima u izgradnji staničnih struktura, rastu i diferencijaciji stanica i tkiva. Celuloza je u staničnoj stijenci organizirana u mikrofibrile koje čine osnovicu za ugradnju ostalih komponenti koje sudjeluju u izgradnji stanične stijenske (slika 10). Razvoj i rast biljke ovisi o

koordinaciji citoskeleta u prostoru ispod plazmaleme i ulaganja celuloznih mikrofibrila u staničnu stijenu (Guerriero i sur., 2010).

Sadržaj celuloze u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze odredila sam koristeći Updegraffov reagens. Rezultati analize u 2010. godini pokazuju da u sortama Scarlett i Jaran dolazi do smanjenja sadržaja celuloze u svim internodijima fazi zriobe, a u sorti Astor manji sadržaj zabilježen je u fazi cvatnje u prvom internodiju (slika 45). Mjerenja sadržaja celuloze u 2011. godini nisu pokazala značajnije promjene tijekom razvoja u sva tri internodija sorti jarog ječma (slika 46). Također međusobnom usporedbom sorti po internodiju nije bilo značajne razlike u sadržaju celuloze izmjenom u 2010. i 2011. godini (podaci nisu prikazani).

Celuloza čini 20-30% sadržaja u primarnoj i 34-45% sadržaja u sekundarnoj staničnoj stijenci u porodici trava (Vogel, 2008). Tijekom izgradnje primarne i sekundarne stanične stijene nakon ulaganja molekula celuloze organiziranih u mikrofibrile, koji su međusobno povezani Van der Waalsovima i čine kristalnu rešetku, i polisaharida slijedi i ulaganje lignina koje doprinosi zadebljanju stijenke stanice čime se postiže čvrstoća. Također važno je naglasiti da sinteza celuloze i njezina depozicija u staničnu stijenu još uvijek nije u potpunosti istražena. Za sada je poznato da u sintezi celuloze sudjeluje enzimski kompleks celuloza sintetaza (CesA) koji ima oblik rozete građene od globularnih kompleksa, koje predstavljaju katalitičke podjedinice i vezan je uz plazma membranu (Somerville, 2006). Jedine za sada poznate komponente ovoga kompleksa su CESA proteini čiji broj je različit u različitim biljnim vrstama, a njihova se uloga u sintezi celuloze istražuje (Gardiner i sur., 2003; Taylor i sur., 2003). Istraživanja na području transkripcije i ekspresije gena iz porodice celuloza sintetaza (*HvCesA*) u ječmu (Burton i sur., 2004; Burton i sur., 2006) kao i u drugim biljnim vrstama trebala bi doprinijeti boljem razumijevanju ovog procesa (Bessueille i Bulone, 2008; Guerriero i sur., 2010).

Izmjerene vrijednosti sadržaja celuloze tijekom četiri razvojne faze stabljike jarog ječma ukazuju da se većina celuloze uložila prije faze klasanja, odnosno u fazi elongacije stabljike kada se odvija rast stanica i izgrađuje se primarna, a kasnije i sekundarna stanična stijena. Uspoređujući dobivene vrijednosti sadržaja celuloze

(slika 45 i 46) s vrijednostima ukupnog sadržaja lignina u internodijima tri sorte ječma tijekom sve četiri razvojne faze (slika 43 i 44) u 2010. i 2011. godini može se zamijetiti da sadržaj lignina raste u internodijima tijekom razvoja za razliku od celuloze, što upućuje na zaključak da ulaganje celuloze prestaje, a ulaganje lignina u staničnu stijenku se nastavlja sve do faze zriobe.

Sadržaj lignina u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran izmjerila sam u četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba. Mjerenja u 2010. godini ukazuju na povećanje sadržaja ukupnog lignina u svim internodijima sorte Scarlett u fazi nalijevanja zrna, a u sorti Jaran u fazi zriobe. Za razliku od navedenih sorti, u sorti Astor nema značajnijeg povećanja sadržaja ukupnog lignina u prvom internodiju tijekom sve četiri razvojne faze, a do povećanja u drugom i trećem internodiju dolazi u fazi cvatnje (slika 43).

U 2011. godini najveći sadržaj ukupnog lignina izmjerila sam u prvim internodijima sorti Astor i Scarlett obzirom na drugi i treći u kojima je on podjednak za razliku od sorte Jaran gdje se sadržaj ukupnog lignina značajnije ne mijenja između internodija i tijekom razvoja (slika 44). Uspoređujući sadržaj ukupnog lignina u sorti Astor do povećanja sadržaja dolazi u fazi cvatnje, a u sorti Jaran u fazi zriobe u 2010. i 2011. godini. U sorti Scarlett u 2010. i 2011. godini do povećanja sadržaja lignina dolazi u različitim razvojnim fazama (slika 43 i 44).

Tijekom određivanja lignina metodom po Klasonu dio lignina se otopi u sulfatnoj kiselini. Usporedbom sadržaja topljivog lignina u pojedinim sortama rezultati ukazuju na povećani sadržaj u prvom internodiju sorte Jaran u fazi klasanja i u prvom internodiju sorte Astor u fazi nalijevanja zrna u 2010. godini (u prilogu slika 59). U 2011. g. najveći sadržaj topljivog lignina u sorti Scarlett izmjerila sam u prvom internodiju u fazi klasanja dok u drugim sortama nije bilo značajnih promjena u internodijima tijekom razvoja (u prilogu slika 60).

Uspoređujući sorte međusobno po sadržaju ukupnog lignina u pojedinom internodiju (u prilogu slika 61) uočava se promjenjivost odnosa tijekom razvoja. Sadržaj ukupnog lignina sva tri internodija veći je u sortama Scarlett i Jaran, u usporedbi sa sortom Astor, u fazi zriobe u 2010. i 2011. godini. U prvim internodijima sadržaj je jednak u fazi

klasanja, cvatnje i nalijevanja zrna u svim sortama u 2010. godini, a u 2011. sorta Scarlett ima veći sadržaj u odnosu na sorte Astor i Jaran u fazi klasanja i cvatnji. U trećim internodijima u 2010. godini sadržaj lignina jednak je u fazi cvatnje u nalijevanja zrna u svim sortama, a u 2011. godini samo u fazi nalijevanja zrna.

Slične rezultate sadržaja ukupnog lignina dobili su Chen i sur. (2002) u svojim istraživanjima lignifikacije internodija stabljike trstikaste vlasulje (*Festuca arudinacea* Schreb.) tijekom razvoja. Naime, zapazili su da Klasonov lignin raste tijekom razvoja, a najveći porast vidljiv je kada biljka ulazi u reproduktivnu fazu. Također, ukupni sadržaj lignina smanjuje se od prvog, najstarijeg prema višim internodijima. Ma (2007) u svojim istraživanjima procesa lignifikacije u fazi elongacije, klasanja i nalijevanja zrna u stabljici ozime pšenice također se zapaža povećanje sadržaja ukupnog lignina s razvojem.

Povećanje sadržaja ukupnog lignina prati povećanje ukupne aktivnosti gvajakol peroksidaza u pojedinim internodijima istraživanih sorti jarog ječma. U 2010. godini aktivnosti gvajakol peroksidaza prati smanjenje sadržaja ukupnog lignina od prvog do trećeg internodija sorte Astor u fazi klasanja. U sorti Scarlett sadržaj lignina unutar pojedine razvojne faze ne mijenja se za razliku od aktivnosti peroksidaza. U fazi zriobe sorta Jaran ima najveći sadržaj ukupnog lignina i ujedno najveću ukupnu aktivnost peroksidaza (slika 38 i 43). U 2011. godini povećana ukupna aktivnost peroksidaza zamjećuje se u prvim internodijima sorte Astor gdje je i povećan ukupni sadržaj lignina također, aktivnost je manja u drugom i trećem internodiju koji imaju i manji sadržaj lignina obzirom na prvi. Slični su rezultati dobiveni i u sorti Scarlett za razliku od aktivnosti u sorti Jaran koja se podudara sa sadržajem ukupnog lignina u fazi nalijevanja zrna i zriobe u sva tri internodija (slika 39 i 44). Dobiveni rezultati govore u prilog povećanoj aktivnosti peroksidaza u tkivima koja se lignificiraju posebno u prvim internodijima koji sadrže i najviše lignina, ali ne jednako u svim sortama jarog ječma.

4.3. Uloga gena *HvCCR* i *HvCAD* u sintezi lignina stabljike ječma

Reduktaza cinamoil CoA (CCR) katalizira pretvorbu cinamoil-CoA u aldehide. Također, pretpostavka je da ovaj enzim predstavlja kontrolnu točku u fenilpropanoidnom putu budući da se nalazi na samom početku specifične sinteze lignina i na taj način regulira ulazak i protok komponenti koje sudjeluju u sintezi kao i količinu fenola (Harrington i sur., 2012). Dehidrogenaza cinamilnog alkohol (CAD) nalazi se na kraju sinteze i katalizira reakciju pretvorbe aldehida u alkohole.

Ekspresija gena *HvCCR* tijekom 2010. godine najveća je u fazi cvatnje u trećem, najmlađem, internodiju svih sorti jarog ječma u odnosu na prvi i drugi. U fazi zriobe, koja ujedno predstavlja i kraj razvoja biljke, ekspresija je najmanja (slika 49). Sorta Astor i Jaran imaju također pojačanu ekspresiju ovoga gena u fazi klasanja i nalijevanja zrna, ali u različitim internodijima. Gen *HvCAD* ima najveću ekspresiju u fazi cvatnje kao i gen *HvCCR* u sorti Scarlett za razliku od sorte Jaran gdje je ekspresija ovoga gena najveća u trećem internodiju u fazi klasanja. U sorti Astor u 2010. godini najveća ekspresija gena *HvCAD* uočava se u drugom i trećem internodiju u fazi cvatnje kao i u sorti Scarlett (slika 50).

U 2011. godini ekspresiju ova dva gena izmjerila sam samo u fazi nalijevanja zrna, a rezultati pokazuju da je ekspresija gena *HvCCR* i *HvCAD* u sorti Astor veća u drugom i trećem internodiju u odnosu na prvi internodij. U sortama Scarlett i Jaran nema razlike između ekspresije oba gena u pojedinim internodijima (slika 51 i 52).

Ekspresija gena *HvCCR* u fazi nalijevanja zrna u 2010. i 2011. godini u sorti Astor značajno je povećana drugom i trećem internodiju u odnosu prvi. U sorti Scarlett različita je ekspresija u 2010. i 2011. godini. Naime, u 2010. godini u drugom internodiju ekspresija je smanjena, u trećem pojačana obzirom na prvi dok u 2011. godini nema razlike u ekspresiji između internodija. Gen *HvCCR* u sorti Jaran u 2010. godini ima povećanu ekspresiju u drugom i trećem internodiju, a u 2011. godini nema razlike između ekspresije u internodijima jednako kao i u sorti Scarlett.

Gen *HvCAD* u fazi nalijevanja zrna u 2010. godini u sorti Astor ima jednaku ekspresiju u prvom i trećem internodiju, a smanjenu ekspresiju u drugom, za razliku od 2011. godini gdje ima jednaku. U 2010. godini u sorti Scarlett ekspresija je pojačana samo u trećem internodiju, a u 2011. godini nema razlike u ekspresiji među internodijima jednako kao i u sorti Jaran u kojoj nema ni u 2010. godini razlike u ekspresiji gena *HvCAD* među internodijima.

Usporedbom ekspresije gena *HvCCR* i *HvCAD* unutar pojedine sorte u 2011. godini tijekom nalijevanja zrna ukazuje da povećanu ekspresiju gena *HvCCR* prati i povećanje ekspresije gena *HvCAD* u sorti Astor odnosno jednaku ekspresiju gena *HvCCR* u svim internodijima sorte Scarlett i Jaran prati i jednaka ekspresija gena *HvCAD* (slika 51 i 52).

Istraživanje ekspresije gena biosintetskog puta u pšenici tijekom razvoja stabljike i nakon indukcije patogenima pokazala je povezanost sadržaja ukupnog lignina s genima biosinteze lignina (Bi i sur., 2011). Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost povezanosti 21 gena s pojačanom ekspresijom u stabljici za koje autori pretpostavljaju da sudjeluju u lignifikaciji, a među njima su geni *CCR* i *CAD* čija povećana ekspresija prati i povećanje ukupnog sadržaja lignina tijekom razvoja. Istraživanja pojačane ekspresije gena *CCR* u stabljici ukazuje na njegovu ulogu u razvoju stabljike i povezanost s lignifikacijom u pšenici (Ma, 2007) i divljem prosu (Escamilla-Treviño i sur., 2009).

Uspoređujući ukupan sadržaj lignina u internodijima sorte Astor i ekspresiju gena u 2010. godini može se uočiti pozitivna korelacija. U fazi cvatnje najveća je ekspresija gena *HvCCR*, a sadržaj ukupnog lignina raste u drugom i trećem internodiju. U sorti Scarlett povećanje ekspresije gena nije dovelo i do povećanja sadržaja lignina u fazi cvatnje već je taj porast vidljiv u fazi nalijevanja zrna. U sorti Jaran značajni porast sadržaja lignina vidljiv je u fazi nalijevanja zrna u drugom internodiju što se može povezati s pojačanom ekspresijom gena *HvCCR*.

U *Brachypodium sp.* istraživanje *CCR* ukazalo je na postojanje devet gena od kojih tek jedan pokazuje sličnost s drugim *CCR* genima za koje se smatra da su uključeni u lignifikaciju dok su u kukuruзу za sada utvrđena dva gena, od kojih se također jedan (*CCR1*) povezuje s ulaganjem lignina tijekom razvoja internodija kukuruza (Riboulet i

sur., 2009). Ekspresija gena *CCR* koji je identificiran i karakteriziran u ječmu 2004. godine (Larsen), a čiju sekvencu sam koristila u ovom radu, također pokazuje povezanost s procesom lignifikacije u stabljici tri sorte jarog ječma.

Halpin i sur. (1994) među prvima su istraživali ulogu *CAD* gena u lignifikaciji, a u raznim biljnim vrstama izolirano nekoliko izoformi *CAD* proteina i karakterizirano nekoliko gena (Dixon i sur., 2001; Guo i sur., 2010).

S ciljem povećanja razgradivosti, a time i iskoristivosti stabljike trstikaste vlasulje Chen i sur. (2003) su utišavanjem ekspresije gena *CAD* smanjili sadržaj lignina bez značajnog utjecaja na fenotip. Slične rezultate pokazala su istraživanja na divljem prosu gdje su identificirane dvije izoforme gena *CAD* povezane s procesom lignifikacije (Saathoff i sur., 2011b). Istraživanja ekspresije gena *TaCAD1* primjenom polu-kvantitativne lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) tijekom razvoja stabljike pšenice (Ma, 2010) ukazala su na povezanost ekspresije ovog gena sa sadržajem lignina. S razvojem stabljike povećavao se i sadržaj lignina i ekspresija gena.

U istraživanim sortama jarog ječma Astor i Scarlett također se zamjećuje povezanost ekspresije ovog gena s povećanjem ukupnog sadržaja lignina. Najveća je ekspresija gena *HvCAD* je u fazi cvatnje u kojoj dolazi i do povećanja sadržaja lignina u pojedinim internodijima za razliku od sorte Jaran u kojoj nisam uočila takvu povezanost. Istraživanja povezanosti gena *CAD* i lignina pokazala su da ovaj gen najviše utječe na sastav lignina, a ne toliko na njegov ukupni sadržaj kao geni koji se nalaze iznad gena *CAD* u biosintezi lignina (Kim i sur., 2002; Li i sur., 2008).

U prvim internodijima svih sorti najmanja je ekspresija oba gena, a sadržaj ukupnog lignina ne raste intenzivno kao u drugom i trećem internodiju tijekom razvoja što potvrđuje činjenicu da se ovi dijelovi stabljike, koji su i najstariji, lignificiraju ranije tijekom razvoja.

Signali i transkripcijski faktori koji reguliraju, koordiniraju i aktiviraju gene uključene u biosintezu lignina do danas nisu u potpunosti poznati (Handakumbura i Hazen, 2012; Zhong i Ye, 2009). Stoga je važno istražiti i identificirati molekularne mehanizme koji upravljaju ovim procesima s ciljem modifikacije ekspresije gena biosintetskog puta i

nastanka genetski modificiranih biljnih vrsta sa smanjenim ukupnim sadržajem lignina bez posljedica na rast i razvoj biljnog organizma. Daljnja istraživanja lignifikacije u kojima bi se modificirala ekspresija gena *HvCCR* i *HvCAD*, istraživanih u ovom radu, kao i ostalih gena koji sudjeluju u sintezi lignina omogućila bi bolje razumijevanje procesa sinteze lignina u stabljici ječma odnosno njihove uloge.

Istraživanja utjecaja modifikacije ekspresije gena za sintezu lignina na ukupni sadržaj lignina u različitim vrstama porodice trava imaju za cilj stvoriti jedinke s optimalnim sastavom stanične stijenke koje će u budućnosti omogućiti bolju iskoristivost stabljike, a pritom zadržati agronomske kvalitete - prinos, masa zrna, otpornost na bolesti, razgradivost (Boudet i sur., 2003; Sticklen, 2006; Sticklen, 2007).

Smanjena ekspresija gena *CAD* primjermom metode RNA interferencije u dva kultivara Alamo izazvala je smanjenje lignina i kutina te omogućila lakše oslobađanje glukoze iz prethodno tretiranih stabljika kao jedan od preduvjeta za proizvodnju bioetanola (Saathoff i sur., 2011a). Glukoza je pohranjena u staničnoj stijenci u obliku celuloze, hemiceluloze i polisaharida, a njezina dostupnost smanjena je prisutnošću lignina zbog čega njegovo uklanjanje predstavlja veliki ekonomski trošak jer se za razgradnju stanične stijenke primjenjuju enzimi (Jung i sur., 2012) što je ujedno i najveći problem u proizvodnji bioetanola kao alternativnog izvora energije (Abramson i sur., 2010).

Proces ulaganja lignina u staničnu stijenku stabljike ječma je kumulativni efekt međudjelovanja svih čimbenika koji sudjeluju u procesu lignifikacije i njihove povezanosti s razvojnim stadijima biljke. Također, ulaganje lignina u staničnu stijenku regulirano je sintezom monolignola kao i transportom prekursora potrebnih za sintezu iz citoplazme do stanične stijenke. U cjelini, dobiveni rezultati ovog istraživanja ukazuju da je faza cvatnje, odnosno reproduktivni stadij biljke razdoblje u kojem je sinteza lignina i njegovo ulaganje stijenke stanica najintenzivnije u sortama Scarlett i Jaran, a u sorti Astor nastavlja se i u fazi nalijevanja zrna. U fazi zriobe uočava se pad ekspresije oba gena, a sadržaj ukupnog lignina ima maksimalnu vrijednost. Međutim, iako je ekspresija gena smanjena, aktivnost peroksidaza koje sudjeluju u polimerizaciji je povećana što ukazuje da se sinteza lignina na fiziološkoj razini nastavlja do kraja razvoja biljke. Važno je naglasiti i utjecaj genotipa te klimatskih uvjeta koji utječu na

proces, a u konačnici i na prinos ječma. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je proces lignifikacije najviše razjašnjen na biokemijskoj razini za razliku od ostalih čimbenika sinteze koji su još uvijek nepoznanica u mnogim svojim segmentima.

Istraživanja fundamentalnih bioloških procesa koji nalaze svoju primjenu u različitim područjima ljudskog života i djelovanja predstavljaju važan doprinos u razvoju znanosti i tehnologije.

5. ZAKLJUČCI

Istraživanje povezanosti anatomskih, fizioloških i molekularnih čimbenika, koji sudjeluju u sintezi lignina i reguliraju njegovo ulaganje u staničnu stijenku doprinosi boljem razumijevanju procesa lignifikacije u stabljici ječma.

Iz dobivenih rezultata izvela sam sljedeće zaključke:

1. Lignin je prisutan u sloju epiderme, kore i djelomično parenhimu sva tri internodija ječma tijekom četiri razvojne faze. Najviše lignina uočava se u području kore u sklerenhimskom prstenu u sva tri internodija. Lignin u epidermi, kori i parenhimu, te u provodnim elementima čine većinom siringilne i gvajacilne podjedinice u podjednakom omjeru. Gvajacilne podjedinice većinom se zamjećuju u baznim i gornjim dijelovima internodija bliže interkalarnim meristemima, a siringilne u ostalim dijelovima internodija.
2. Aktivnost peroksidaza *in situ* podudara se s prisutnošću lignina u internodijima istraživanih sorti jarog ječma.
3. Debljina stanične stijenke povećava se tijekom razvoja kao posljedica ulaganja lignina i razlikuje se u istraživanim sortama jarog ječma. Većina lignina se ulaže u stijenku u fazi cvatnje u sortama Scarlett i Jaran, a u sorti Astor u fazi nalijevanja zrna.
4. Ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza najveća je u prvim internodijima, a najmanja u trećim internodijima. Aktivnost raste s razvojem stabljike u svim sortama.
5. Sadržaj ukupnih topljivih fenola pokazuje najveći porast u fazi nalijevanja zrna u sorti Astor, a u sortama Scarlett i Jaran u fazi cvatnje.
6. Sadržaj celuloze uglavnom se ne mijenja tijekom četiri razvojne faze.
7. Ekspresija gena *HvCCR* u svim sortama bila je najveća u trećem internodiju u fazi cvatnje u svim sortama, a najmanja u fazi zriobe što ujedno predstavlja i kraj razvoja biljke. Gen *HvCAD* ima pojačanu ekspresiju u fazi cvatnje u sortama

Astor i Scarlett, a u fazi klasanja u sorti Jaran. Ekspresija se smanjuje u fazi nalijevanja zrna i zriobi u svim sortama i internodijima.

8. Tijekom 2010. godine sadržaj ukupnog lignina raste tijekom razvoja i najveći je u fazi zriobe u sortama Scarlett i Jaran, dok se u sorti Astor značajno ne mijenja tijekom razvoja. U 2011. godini u fazi cvatnje dolazi do porasta sadržaja lignina u sortama Astor i Scarlett u drugom i tećem internodiju, a u sorti Jaran u fazi zriobe.

Sadržaj ukupnog lignina u stabljikama tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran posljedica je kumulativnog efekta međudjelovanja fizioloških i biokemijskih čimbenika koji su uključeni u njegovu sintezu, a ulaganje lignina u staničnu stijenku s ciljem povećanja čvrstoće stabljike, njihova direktna posljedica. Sama sinteza lignina pod utjecajem je više čimbenika uključujući genotip i okolišne čimbenike koji određuju dinamiku sinteze i ulaganja lignina u staničnu stijenku.

6. LITERATURA

- Abbott, J. C., Barakate, A., Pinçon, G., Legrand, M., Lapierre, C., Mila, I., Schuch, W., Halpin, C., 2002. Simultaneous suppression of multiple genes by single transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco. *Plant Physiology*. 128, 844-853.
- Abramson, M., Shoseyov, O., Shani, Z., 2010. Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. *Plant Science*. 178, 61-72.
- Adler, E., Björkqvist, K., Häggroth, S., 1949. Über die Ursache der farbreaktionen des holzes. Svenska Träforskningsinstitutet.
- Ali, F., Scott, P., Bakht, J., Chen, Y., Lübberstedt, T., 2010. Identification of novel brown midrib genes in maize by tests of allelism. *Plant Breeding*. 129, 724-726.
- Amthor, J. S., 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Annals of Botany*. 91, 673-695.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M. T., Monties, B., Fritig, B., Legrand, M., 2003. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *The Plant Journal*. 8, 465-477.
- Badr, A., Sch, R., Rabey, H. E., Effgen, S., Ibrahim, H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F., 2000. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Biology and Evolution*. 17, 499-510.
- Bao, W., O'malley, D. M., Whetten, R., Sederoff, R. R., 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science (New York, NY)*. 260, 672.
- Barceló, A. R., 1997. Lignification in plant cell walls. *International review of cytology*. 176, 87-132.
- Barceló, A. R., Gómez Ros, L., Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Carrión, J., Pedreño, M., 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Reviews*. 3, 61-78.
- Barceló, A. R., Morales, M., Pedreño, M., 1998. Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. *American Chemical Society Symposium Series*. 697, 84-95.
- Barrière, Y., Riboulet, C., Méchin, V., Maltese, S., Pichon, M., Cardinal, A., Lapierre, C., Lübberstedt, T., Martinant, J.-P., 2007. Genetics and genomics of lignification in

- grass cell walls based on maize as model species. *Genes Genomes Genomics*. 1, 133-156.
- Battle, M., Bender, M., Tans, P. P., White, J., Ellis, J., Conway, T., Francey, R., 2000. Global carbon sinks and their variability inferred from atmospheric O₂ and δ¹³C. *Science*. 287, 2467-2470.
- Baucher, M., Bernard-Vailhé, M. A., Chabbert, B., Besle, J. M., Opsomer, C., Van Montagu, M., Botterman, J., 1999. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant molecular biology*. 39, 437-447.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 17, 125-197.
- Bessueille, L., Bulone, V., 2008. A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. *Plant Biotechnology*. 25, 315-322.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., King, J., 2009. Role of lignification in plant defense. *Plant signaling & behavior*. 4, 158-159.
- Bi, C., Chen, F., Jackson, L., Gill, B. S., Li, W., 2011. Expression of lignin biosynthetic genes in wheat during development and upon infection by fungal pathogens. *Plant Molecular Biology Reporter*. 29, 149-161.
- Bidlack, J., Buxton, D., 1992. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. *Canadian Journal of Plant Science*. 72, 809-818.
- Bidlack, J., Malone, M., Benson, R., 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 72, 51-56.
- Blee, K. A., Choi, J. W., O'Connell, A. P., Schuch, W., Lewis, N. G., Bolwell, G. P., 2003. A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry*. 64, 163-176.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 54, 519-546.
- Bonawitz, N. D., Chapple, C., 2012. Can genetic engineering of lignin deposition be accomplished without an unacceptable yield penalty? *Current Opinion in Biotechnology*.

- Boudet, A.-M., 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 68, 2722-2735.
- Boudet, A. M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., Goffner, D., 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science*. 8, 576-581.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brownleader, M. D., Ahmed, N., Trevan, M., Chaplin, M. F., Dey, P. M., 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiology*. 109, 1115-1123.
- Bukh, C., Nord-Larsen, P. H., Rasmussen, S. K., 2012. Phylogeny and structure of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany*. 63, 6223-6236.
- Burton, R. A., Shirley, N. J., King, B. J., Harvey, A. J., Fincher, G. B., 2004. The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiology*. 134, 224-236.
- Burton, R. A., Wilson, S. M., Hrmova, M., Harvey, A. J., Shirley, N. J., Medhurst, A., Stone, B. A., Newbigin, E. J., Bacic, A., Fincher, G. B., 2006. Cellulose synthase-like CsLF genes mediate the synthesis of cell wall (1, 3; 1, 4)- β -D-glucans. *Science*. 311, 1940-1942.
- Bustin, S. A., 2004. AZ of quantitative PCR. International University Line.
- Carpita, N. C., Gibeaut, D. M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3, 1-30.
- Carpita, N. C., McCann, M., 2000. *The Cell Wall*. American Society of Plant Biologists, Rockville
- Cenci, C., Grando, S., Ceccarelli, S., 1984. Culm anatomy in barley (*Hordeum vulgare*). *Canadian journal of botany*. 62, 2023-2027.

- Cesarino, I., Araújo, P., Paes Leme, A. F., Creste, S., Mazzafera, P., 2013. Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*. 62.
- 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.
- Chabannes, M., Barakate, A., Lapierre, C., Marita, J. M., Ralph, J., Pean, M., Danoun, S., Halpin, C., Grima-Pettenati, J., Boudet, A. M., 2001. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant Journal*. 28, 257-270.
- Chen, L., Auh, C., Chen, F., Cheng, X., Aljoe, H., Dixon, R. A., Wang, Z., 2002. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50, 5558-5565.
- Chen, L., Auh, C. K., Dowling, P., Bell, J., Chen, F., Hopkins, A., Dixon, R. A., Wang, Z. Y., 2003. Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Biotechnology Journal*. 1, 437-449.
- Cherney, J., Axtell, J., Hassen, M., Anliker, K., 1988. Forage quality characterization of a chemically induced brown-midrib mutant in pearl millet. *Crop Science*. 28, 783-787.
- Cherney, J., Cherney, D., Akin, D., Axtell, J., 1991. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advances in Agronomy*. 46, 157-198.
- Chesson, A., Provan, G. J., Russell, W., Scobbie, L., Chabbert, B., Monties, B., 1997. Characterisation of lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls of the maize internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 73, 10-16.
- Chojecki, A., Blaschek, H. P., 1986. Effect of Carbohydrate Source on Alpha-Amylase and Glucoamylase Formation by *Clostridium-Acetobutylicum* Sa-1. *Journal of Industrial Microbiology*. 1, 63-67.

- Cosgrove, D. J., 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38, 109-124.
- Cosgrove, D. J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6, 850-61.
- Cosio, C., Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*. 60, 391-408.
- Dean Jeffrey, F. D., LaFayette Peter, R., Rugh, C., Tristram Alexandria, H., Hoopes, J. T., Eriksson Karl-Erik, L., Merkle Scott, A., *Laccases Associated with Lignifying Vascular Tissues*. 1998, *Lignin and Lignan Biosynthesis*, Vol. 697. pp. 96-108, American Chemical Society.
- Dence, C., Lin, S., 1992. The determination of lignin. *Methods in lignin chemistry*. 33-61.
- Denffer, D., Ziegler, H., 1982. *Morfologija i fiziologija*. Školska knjiga, Zagreb.
- Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E., Carlson, J. E., 1995. A β -Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin. *Plant Physiology*. 331-339.
- Dixon, R. A., Chen, F., Guo, D., Parvathi, K., 2001. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry*. 57, 1069-1084.
- Driouich, A., Lainé, A. C., Vian, B., Faye, L., 1992. Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *The Plant Journal*. 2, 13-24.
- Dunn, G., Briggs, K., 1989. Variation in culm anatomy among barley cultivars differing in lodging resistance. *Canadian journal of botany*. 67, 1838-1843.
- Duroux, L., Welinder, K. G., 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *Journal of molecular evolution*. 57, 397-407.
- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Santiago-Dómenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V., Quesada, M. A., 2002. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum*. 106, 355-362.
- Elfstrand, M., Sitbon, F., Lapierre, C., Bottin, A., von Arnold, S., 2002. Altered lignin structure and resistance to pathogens in spi 2-expressing tobacco plants. *Planta*. 214, 708-716.

- Esau, K., 1953. Plant anatomy. Soil Science. 75, 407.
- Escamilla-Treviño, L. L., Shen, H., Uppalapati, S. R., Ray, T., Tang, Y., Hernandez, T., Yin, Y., Xu, Y., Dixon, R. A., 2009. Switchgrass (*Panicum virgatum*) possesses a divergent family of cinnamoyl CoA reductases with distinct biochemical properties. New Phytologist. 185, 143-155.
- Eurostat, <http://ec.europa.eu/eurostat>. 2012.
- Fagerstedt, K. V., Kukkola, E. M., Koistinen, V. V. T., Takahashi, J., Marjamaa, K., 2010. Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce. Journal of integrative plant biology. 52, 186-194.
- Fahn, A., 1982. Plant anatomy. Pergamon Press.
- FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>. 2012.
- Fawal, N., Li, Q., Savelli, B., Brette, M., Passaia, G., Fabre, M., Mathé, C., Dunand, C., 2012. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. Nucleic Acids Research.
- Foster, C. E., Martin, T. M., Pauly, M., 2010. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part II: carbohydrates. Journal of Visualized Experiments: JoVE. 37.
- Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Merino, F., Cuello, J., Pedreño, M., Barceló, A. R., 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. FEBS letters. 580, 4311-4316.
- Gardiner, J. C., Taylor, N. G., Turner, S. R., 2003. Control of Cellulose Synthase Complex Localization in Developing Xylem. The Plant Cell. 1740-1748.
- Goffner, D., Joffroy, I., Grima-Pettenati, J., Halpin, C., Knight, M., Schuch, W., Boudet, A., 1992. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Eucalyptus xylem. Planta. 188, 48-53.
- Goujon, T., Ferret, V., Mila, I., Pollet, B., Ruel, K., Burlat, V., Joseleau, J. P., Barrière, Y., Lapierre, C., Jouanin, L., 2003. Down-regulation of the AtCCR1 gene in Arabidopsis thaliana: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. Planta. 217, 218-228.
- Grabber, J. H., Ralph, J., Lapierre, C., Barrière, Y., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. Comptes rendus biologiques. 327, 455-465.

- Guerriero, G., Fugelstad, J., Bulone, V., 2010. What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? *Journal of integrative plant biology*. 52, 161-175.
- Guo, D.-M., Ran, J.-H., Wang, X.-Q., 2010. Evolution of the cinnamyl/sinapyl alcohol dehydrogenase (CAD/SAD) gene family: The emergence of real lignin is associated with the origin of bona fide CAD. *Journal of molecular evolution*. 71, 202-218.
- Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blount, J. W., Dixon, R. A., 2001. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *The Plant Cell* 13, 73-88.
- Halpin, C., Holt, K., Chojecki, J., Oliver, D., Chabbert, B., Monties, B., Edwards, K., Barakate, A., Foxon, G. A., 1998. Brown-midrib maize (bm1)—a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *The Plant Journal*. 14, 545-553.
- Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A. M., Boon, J. J., Chabbert, B., Tollier, M. T., Schuch, W., 1994. Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Journal*. 6, 339-350.
- Handakumbura, P. P., Hazen, S. P., 2012. Transcriptional regulation of grass secondary cell wall biosynthesis: playing catch-up with *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 3.
- Harrington, M. J., Mutwil, M., Barrière, Y., Sibout, R., Jouanin, L., Lapierre, C., 2012. Molecular biology of lignification in grasses. *Advances in Botanical Research*. 61, 77-112.
- Hatfield, R., Vermerris, W., 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*. 126, 1351-1357.
- Hawkins, S. W., Boudet, A. M., 1994. Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* Hook. *Plant Physiology*. 104, 75-84.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*. 11, 1026-1030.

- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*. 42, 462-468.
- Holst Christensen, J., Overney, S., Rohde, A., Ardiles Diaz, W., Bauw, G., Simon, P., Van Montagu, M., Boerjan, W., 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant molecular biology*. 47, 581-593.
- Hu, W. J., Harding, S., Lung, J., Popko, J., Ralph, J., Stokke, D., Tsai, C. J., Chiang, V., 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature biotechnology*. 17, 808-812.
- Humphreys, J. M., Chapple, C., 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Current opinion in plant biology*. 5, 224-229.
- Jacobs, B. F., Kingston, J. D., Jacobs, L. L., 1999. The origin of grass-dominated ecosystems. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 590-643.
- Jayamohan, N., Kumudini, B., 2011. Host Pathogen Interaction at the Plant Cell Wall. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1(10), 242-249.
- Jones, L., Ennos, A. R., Turner, S. R., 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 26, 205-216.
- Jorgenson, L. R., 1931. Brown midrib in maize and its linkage relations. *Agronomy Journal*. 23, 549-557.
- Jouanin, L., Goujon, T., de Nadaï, V., Martin, M. T., Mila, I., Vallet, C., Pollet, B., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Petit-Conil, M., 2000. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiology*. 123, 1363-1374.
- Jouanin, L., Goujon, T., Sibout, R., Pollet, B., Mila, I., Leple, J. C., Pilate, G., Petit-Conil, M., Ralph, J., Lapierre, C., 2004. Comparison of the consequences on lignin content and structure of COMT and CAD downregulation in poplar and *Arabidopsis thaliana*. *Plantation forest biotechnology for the 21st century*. 219-229.
- Jung, H.-J. G., 2003. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochemistry*. 63, 543-549.
- Jung, H., Casler, M., 2006a. Maize Stem Tissues. *Crop Science*. 46, 1793-1800.

- Jung, H., Casler, M., 2006b. Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Science*. 46, 1793-1800.
- Jung, S. K., Parisutham, V., Jeong, S. H., Lee, S. K., 2012. Heterologous expression of plant cell wall degrading enzymes for effective production of cellulosic biofuels. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.
- Kaack, K., Schwarz, K.-U., Brander, P. E., 2003. Variation in morphology, anatomy and chemistry of stems of *Miscanthus* genotypes differing in mechanical properties. *Industrial Crops and Products*. 17, 131-142.
- Kajita, S., Hishiyama, S., Tomimura, Y., Katayama, Y., Omori, S., 1997. Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate: coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiology*. 114, 871-879.
- Kajita, S., Katayama, Y., Omori, S., 1996. Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase. *Plant and Cell Physiology*. 37, 957-965.
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W., Albersheim, P., 1973. The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*. 51, 188-197.
- Kim, H., Ralph, J., Lu, F., Pilate, G., Leplé, J.-C., Pollet, B., Lapierre, C., 2002. Identification of the structure and origin of thioacidolysis marker compounds for cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in angiosperms. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 47412-47419.
- Koutaniemi, S., Toikka, M. M., Kärkönen, A., Mustonen, M., Lundell, T., Simola, L. K., Kilpeläinen, I. A., Teeri, T. H., 2005. Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. *Plant molecular biology*. 58, 141-157.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, A., Grima-Pettenati, J., 1997. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *The Plant journal*. 11, 429-441.

- Lalić, A., Kovačević, J., Novoselović, D., Drezner, G., Babić, D., Dvojković, K., 2005. Effects of selection for short stem on yield and yield components in barley. *Poljoprivreda*. 11, 5-11.
- Lalić, A., Kovačević, J., Šimić, G., Abičić, I., Lenart, L., 2009 The quality parameters of barley malt and grain considering genotype and environment synergy, 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.
- Lalić, A. K., Josip; Gordana, Šimić, Gordana; Novoselović, Dario; Abičić, Ivan; Lenart, Lidija; Guberac, Vlado, 2009. Sadržaj bjelančevina i urod zrna jarog ječma obzirom na sinergiju genotipa i okoliša u Republici Hrvatskoj. *Sjemenarstvo*. 1-2; 5-16.
- Lamport, D. T., Kieliszewski, M. J., Chen, Y., Cannon, M. C., 2011. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiology*. 156, 11-19.
- Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leplé, J. C., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadai, V., 1999. Structural Alterations of Lignins in Transgenic Poplars with Depressed Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase or Caffeic Acid O-Methyltransferase Activity Have an Opposite Impact on the Efficiency of Industrial Kraft Pulping. *Plant Physiology*. 119, 153-164.
- Larsen, K., 2004. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding cinnamoyl CoA reductase (CCR) from barley (*Hordeum vulgare*) and potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of plant physiology*. 161, 105-12.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C., Douglas, C. J., 1997. Antisense suppression of 4-coumarate: coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition. *The Plant Cell* 9, 1985-1998.
- Leljak-Levanić, D., *Transgenične ili genetski modificirane biljke 2009*, u: S. Ravlić, (ur.), *Hrvatske enciklopedije*. pp. 13-13, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.
- Lepeduš, H., Cesar, V., 2010. *Osnove biljne histologije i anatomije vegetativnih organa. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek*.
- Lepeduš, H., Cesar, V., Krsnik-Rasol, M., 2004. Guaiacol peroxidases in carrot (*Daucus carota* L.) root. *Food Technology and Biotechnology*. 42, 33-36.

- Lepeduš, H., Lalić, A., Jurković, Z., Kovačević, J., Antunović, J., Štolfa, I., Cesar, V., 2010. Lodging related stem anatomy and guaiacol peroxidases in two barley cultivars, u: J. Dolenc Koce, D. Vodnik, P. Pongrac, ur., 5th Slovenian Symposium on Plant Biology. Slovenian Society of Plant Biology. Ljubljana.
- Lepié, J., Dauwe, R., Morreel, K., Storme, V., Lapierre, C., Pollet, B., Naumann, A., Kang, K., Kim, H., Ruel, K., 2007. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *The Plant Cell*. 19, 3669-3691.
- Li, X., Weng, J. K., Chapple, C., 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *The Plant Journal*. 54, 569-581.
- Li, Y., Kajita, S., Kawai, S., Katayama, Y., Morohoshi, N., 2003. Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *Journal of Plant Research*. 116, 175-182.
- López-Serrano, M., Fernández, M. D., Pomar, F., Pedreño, M. A., Ros Barceló, A., 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *Journal of Experimental Botany*. 55, 423-431.
- Ma, Q.-H., 2010. Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 61, 2735-2744.
- Ma, Q. H., 2007. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 58, 2011-2021.
- Ma, Q. H., Tian, B., 2005. Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat. *Biological chemistry*. 386, 553-560.
- MacAdam, J. W., Nelson, C. J., Sharp, R. E., 1992a. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology*. 99, 872-878.
- MacAdam, J. W., Sharp, R. E., Nelson, C. J., 1992b. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology*. 99, 879-885.

- MacKay, J. J., O'Malley, D. M., Presnell, T., Booker, F. L., Campbell, M. M., Whetten, R. W., Sederoff, R. R., 1997. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94, 8255-8260.
- Marita, J. M., Ralph, J., Hatfield, R. D., Guo, D., Chen, F., Dixon, R. A., 2003. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase. *Phytochemistry*. 62, 53-65.
- Marjamaa, K., Kukkola, E., Lundell, T., Karhunen, P., Saranpää, P., Fagerstedt, K. V., 2006. Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). *Tree Physiology*. 26, 605-611.
- Marjamaa, K., Kukkola, E. M., Fagerstedt, K. V., 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*. 60, 367-376.
- Marjamaa, K., Lehtonen, M., Lundell, T., Toikka, M., Saranpää, P., Fagerstedt, K. V., 2003. Developmental lignification and seasonal variation in beta-glucosidase and peroxidase activities in xylem of Scots pine, Norway spruce and silver birch. *Tree Physiology*. 23, 977-86.
- Martínez-Cortés, T., Pomar, F., Espiñeira, J. M., Merino, F., Novo-Uzal, E., 2011. Purification and kinetic characterization of two peroxidases of *Selaginella martensii* Spring. involved in lignification. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., Fujii, N., Hori, K., Itoh, T., Sato, K., 2011. Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiology* 156, 20-8.
- Mellerowicz, E. J., Sundberg, B., 2008. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current opinion in plant biology*. 11, 293-300.
- Meshitsuka, G., Nakano, J., 1979. Studies on the mechanism of lignin color reaction. XIII. Maule color reaction (9). *Journal of the Japan Wood Research Society*. 25, 588-94.
- Moore, R., Clark, W. D., Stern, K. R., 1995. *Botany*. Wm.C. Brown Publishers Inc., Dubuque, IA.

- Morrison, T., Buxton, D., 1993. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase in the maize stalk. *Crop Science*. 33, 1264-1268.
- Morrison, T. A., Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D., 1998. Cell-Wall Composition of Maize Internodes of Varying Maturity. *Crop Science*. 38, 455-460.
- Müse, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V., Schopfer, P., 1997. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*. 201, 146-159.
- Mustapić-Karlić, J., Štolfa, I., Vinković, T., Parađiković, N., Teklić, T., Tkalec, M., Cesar, V., Lepeduš, H., 2010 Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma u: S. Marić, Z. Lončarić, ur., 45. hrvatski i 5. međunarodni simpozij agronoma Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, pp. 172-176.
- Oliver, A. L., Pedersen, J. F., Grant, R. J., Klopfenstein, T. J., 2005. Comparative Effects of the Sorghum bmr-6 and bmr-12 Genes Mention of trade names or commercial products in this article is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the University of Nebraska or the U.S. Department of Agriculture. Joint contribution of the USDA-ARS and the University of Nebraska Agric. Exp. Stn. as Paper no. 171224, Journal Series, Nebraska Agric. Exp. Stn. *Crop Science*. 45, 2234-2239.
- Østergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K. G., Mundy, J., Gajhede, M., Henriksen, A., 2000. Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant molecular biology*. 44, 231-243.
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., Dunand, C., 2004a. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*. 65, 1879-1893.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C., 2004b. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*. 9, 534-540.
- Pedersen, J. F., Vogel, K. P., Funnell, D. L., 2005. Impact of reduced lignin on plant fitness. *Crop Science*. 45, 812-819.

- Pfaffl, M. W., 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*. 1, 89-113.
- Pfaffl, M. W., 2006. Relative quantification. *Real-time PCR*. 63-82.
- Pichon, M., Courbou, I., Beckert, M., Boudet, A. M., Grima-Pettenati, J., 1998. Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. *Plant molecular biology*. 38, 671-676.
- Pillonel, C., Mulder, M. M., Boon, J. J., Forster, B., Binder, A., 1991. Involvement of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in the control of lignin formation in *Sorghum bicolor* L. Moench. *Planta*. 185, 538-544.
- Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M., 2001. Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry*. 57, 1167-1176.
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J., Boudet, A., 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant Journal*. 13, 71-83.
- Pomar, F., Merino, F., Barceló, A. R., 2002. *O*-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*. 220, 17-28.
- Porter, K., Axtell, J., Lechtenberg, V., Colenbrander, V., 1978. Phenotype, fiber composition, and in vitro dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (bmr) mutants of sorghum. *Crop Science*. 18, 205-208.
- Prashant, S., Srilakshmi Sunita, M., Pramod, S., Gupta, R. K., Anil Kumar, S., Rao Karumanchi, S., Rawal, S., Kavi Kishor, P., 2011. Down-regulation of *Leucaena leucocephala* cinnamoyl CoA reductase (LICCR) gene induces significant changes in phenotype, soluble phenolic pools and lignin in transgenic tobacco. *Plant cell reports*. 30, 2215-2231.
- Ralph, J., Brunow, G., Boerjan, W., Lignins. 2007a, *Encyclopedia of Life Sciences*. pp., John Wiley & Sons, Ltd.

- Ralph, J., Grabber, J. H., Hatfield, R. D., 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research*. 275, 167-178.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C., Boudet, A. M., 1998. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 12803-8.
- Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Grabber, J. H., Leplé, J. C., Berrio-Sierra, J., Derikvand, M. M., Jouanin, L., Boerjan, W., Lapierre, C., 2007b. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl CoA reductase deficiency). *The Plant Journal*. 53, 368-379.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Christensen, J. H., 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*. 3, 29-60.
- Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A. M., Goffner, D., 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiology*. 129, 145-155.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M., Goffner, D., 2001. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *European Journal of Biochemistry*. 259, 485-495.
- Rasmussen, R., 2001. Quantification on the LightCycler. *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications*. Springer Press, Heidelberg. 21-34.
- Riboulet, C., Guillaumie, S., Méchin, V., Bosio, M., Pichon, M., Goffner, D., Lapierre, C., Pollet, B., Lefevre, B., Martinant, J., 2009. Kinetics of phenylpropanoid gene expression in maize growing internodes: Relationships with cell wall deposition. *Crop Science*. 49, 211-223.

- Saathoff, A. J., Sarath, G., Chow, E. K., Dien, B. S., Tobias, C. M., 2011a. Downregulation of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in switchgrass by RNA silencing results in enhanced glucose release after cellulase treatment. *PloS one*. 6, e16416.
- Saathoff, A. J., Tobias, C. M., Sattler, S. E., Haas, E. J., Twigg, P., Sarath, G., 2011b. Switchgrass contains two cinnamyl alcohol dehydrogenases involved in lignin formation. *BioEnergy Research*. 4, 120-133.
- Sarath, G., Baird, L. M., Vogel, K. P., Mitchell, R. B., 2007. Internode structure and cell wall composition in maturing tillers of switchgrass (*Panicum virgatum* L). *Bioresource Technology*. 98, 2985-2992.
- Sato, Y., Sugiyama, M., Górecki, R. J., Fukuda, H., Komamine, A., 1993. Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of Zinnia. *Planta*. 189, 584-589.
- Sattler, S. E., Saathoff, A. J., Haas, E. J., Palmer, N. A., Funnell-Harris, D. L., Sarath, G., Pedersen, J. F., 2009. A nonsense mutation in a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the sorghum brown midrib6 phenotype. *Plant Physiology*. 150, 584-595.
- Schlindwein, B., A Hypermedia glossary of genetic terms. Technische Universität München-Weihenstephan. Library Weihenstephan, 2002.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C., Dixon, R. A., 1997. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology*. 115, 41-50.
- Shen, H., Fu, C., Xiao, X., Ray, T., Tang, Y., Wang, Z., Chen, F., 2009. Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency. *BioEnergy Research*. 2, 233-245.
- Siegel, B. Z., Galston, A., 1967. The isoperoxidases of *Pisum sativum*. *Plant Physiology*. 42, 221-226.
- Singleton, V., Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
- Somerville, C., 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell Developmental Biology*. 22, 53-78.

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science Signalling*. 306, 2206.
- Steeves, V., Förster, H., Pommer, U., Savidge, R., 2001. Coniferyl alcohol metabolism in conifers—I. Glucosidic turnover of cinnamyl aldehydes by UDPG: coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium. *Phytochemistry*. 57, 1085-1093.
- Sterjiades, R., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L., 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology*. 99, 1162-1168.
- Sticklen, M., 2006. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 17, 315-319.
- Sticklen, M. B., 2007. Feedstock crop genetic engineering for alcohol fuels. *Crop Science*. 47, 2238-2248.
- Šeruga, M., Škorić, D., Botti, S., Paltrinieri, S., Juretić, N., Bertaccini, A., 2003. Molecular characterization of a phytoplasma from the Aster Yellow (16Srl) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. *Forest Pathology*. 33, 113-125.
- Tamasloukht, B., Wong Quai Lam, M. S., Martinez, Y., Tozo, K., Barbier, O., Jourda, C., Jauneau, A., Borderies, G., Balzergue, S., Renou, J. P., Huguet, S., Martinant, J. P., Tatout, C., Lapierre, C., Barriere, Y., Goffner, D., Pichon, M., 2011. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *Journal of Experimental Botany*. 62, 3837-48.
- TAPPI, Acid-soluble lignin in wood and pulp. Useful method 246 TAPPI. Atlanta, 1985.
- Taylor, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K., Turner, S. R., 2003. Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 1450-1455.
- Terashima, N., Fukushima, K., 1988. Heterogeneity in formation of lignin—XI: An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood science and technology*. 22, 259-270.

- Thévenin, J., Pollet, B., Letarnec, B., Saulnier, L., Gissot, L., Maia-Grondard, A., Lapierre, C., Jouanin, L., 2011. The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*. 4, 70-82.
- Tu, Y., Rochfort, S., Liu, Z., Ran, Y., Griffith, M., Badenhorst, P., Louie, G., Bowman, M., Smith, K., Noel, J., 2010. Functional analyses of caffeic acid O-Methyltransferase and Cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant Cell*. 22, 3357-3373.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*. 35, W71-W74.
- Updegraff, D. M., 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*. 32, 420-424.
- Vailhe, B., Andrée, M., Besle, J. M., Maillot, M. P., Cornu, A., Halpin, C., Knight, M., 1999. Effect of down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on cell wall composition and on degradability of tobacco stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76, 505-514.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*. 153, 895-905.
- Vogel, J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current opinion in plant biology*. 11, 301-307.
- Welinder, K. G., 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*. 2, 388-393.
- Yahiaoui, N., Marque, C., Myton, K. E., Negrel, J., Boudet, A. M., 1997. Impact of different levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants. *Planta*. 204, 8-15.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*. 14, 415-421.
- Zhang, J., 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*. 18, 292-298.
- Zhong, R., Morrison, W. H., Negrel, J., Ye, Z. H., 1998. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *The Plant Cell Online*. 10, 2033-2045.

Zhong, R., Ye, Z.-H., 2009. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant signaling & behavior*. 4, 1028-1034.

7. SAŽETAK

Proces lignifikacije u jednosupnicama, posebno porodici trava (*Poaceae*) neistražen je u mnogim svojim segmentima. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da je ulaganje lignina u staničnu stijenu vremenski, tkivno i vrsno specifičan proces. Proučavanje ovog procesa u stabljici ječma na anatomskom, fiziološkom i molekularnom nivou značajno će doprinijeti njegovom boljem razumijevanju te pomoći u procesima oplemenjivanja i selekcije sorti ječma.

Tri sorte jarog ječma Astor i Jaran (Hrvatska) i Scarlett (Njemačka) zasijane su na pokusnim poljima Poljoprivrednog instituta Osijek u Osijeku na parcelama raspoređenim prema slučajnom blok rasporedu. Biljni materijal uzorkovala sam od svibnja do lipnja u 2010. i 2011. godini i obuhvatila četiri razvojne faze: klanje, cvatnju, nalijevanje zrna i zriobu. Za potrebe analiza koristila sam tri donja internodija: prvi najstariji, drugi i treći najmlađi internodij. Mjerenje debljine stanične stijene provela sam na fiksiranim i uklopljenim uzorcima izrezanim na mikrotomu, a prezeze sam obojala toluidin plavom bojom. Histokemijske dokaze lignina, Wiesnerov test za lignin i Maüleova reakcija, napravila sam na poprečnim prerezima internodija izrađenih rukom te odredila aktivnosti peroksidaza *in situ*. Za određivanje ukupne aktivnosti peroksidaza koristila sam gvajakol kao supstrat, a aktivnost sam izmjerila spektrofotometrijski. Također, odredila sam izoenzimske forme gvajakol peroksidaza u gelu. Lignin sam odredila metodom po Klasonu, a izrazila sam ga kao ukupni lignin zajedno s ligninom topljivim u kiselini. Sadržaj celuloze u internodijima stabljike ječma odredila sam Updegraffovim reagensom. Pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa odredila sam sadržaj ukupnih topljivih fenola. Kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) primijenila sam za određivanje ekspresije gena biosintetskog puta sinteze lignina u ječmu. Iz uzoraka sam izolirala ukupnu RNA i DNA. Sintezu cDNA provela sam uz pomoć reverzne transkriptaze i oligo dT₁₆ početnica. Početnice za kontrolni gen *HvGAPDH* i gene *HvCCR* i *HvCAD* izradila sam uz pomoć programa PrimerPlus3.

Na poprečnim prerezima internodija lignin se uočava u epidermi, području kore, parenhimu i provodnim elementima, a najveći sadržaj lignina uočava se u području sklerenhimskog prstena. Ulaganje ligninskih podjedinica prati razvoj tkiva internodija. Gvajacilne podjedinice se uočavaju u baznim i gornjim dijelovima internodija koji se

nalaze blizu nodija u kojima se odvija produžni rast stabljike, a siringilne podjedinice prate ulaganje gvajacilnih podjedinica i karakteristične su za starije dijelove tkiva. Debljina stijenki stanica povećava se tijekom razvoja u svim internodijima kao posljedica ulaganja lignina i razlikuje se u istraživanim sortama jarog ječma. Ulaganje lignina najveće je u fazi cvatnje u sortama Scarlett i Jaran, a u sorti Astor u fazi nalijevanja zrna. Aktivnost peroksidaza *in situ* podudara se s lokalizacijom lignina u internodijima kao i njihova enzimski aktivnost i aktivnost u gelu, koja je veća u prvim internodijima. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u sorti Astor povećava se u fazi nalijevanja zrna, a u sortama Jaran i Scarlett u fazi cvatnje. Sadržaj celuloze uglavnom se ne mijenja u 2010. i 2011. godini. Ukupni sadržaj lignina povećava se s razvojem i starenjem biljke, ali ne jednako u svim sortama i svim razvojnim fazama, pa je tako najveći u fazi zriobe kada biljka završava svoj razvoj. Ekspresija gena biosinteze lignina *HvCCR* najveća je u fazi cvatnje u trećem internodiju svih sorti, a gena *HvCAD* u sortama Astor i Scarlett u fazi cvatnje te u sorti Jaran u fazi klasanja.

Lignifikacija u stabljici tri sorte jarog ječma pod značajnim je utjecajem genotipa i okolišnih čimbenika koji određuju dinamiku sinteze i ulaganja lignina u staničnu stijenku.

8. SUMMARY

In monocotyledons, especially grasses (*Poaceae*), lignification is still unexplored in many of its aspects. Results of previous studies showed that lignin deposition in cell wall is temporally and spatially specific. It can vary between species and individual cell lines in plant tissues. In the course of studying lignification process in barley stem by using anatomical, physiological and molecular approach will provide us useful data for breeding and selection processes.

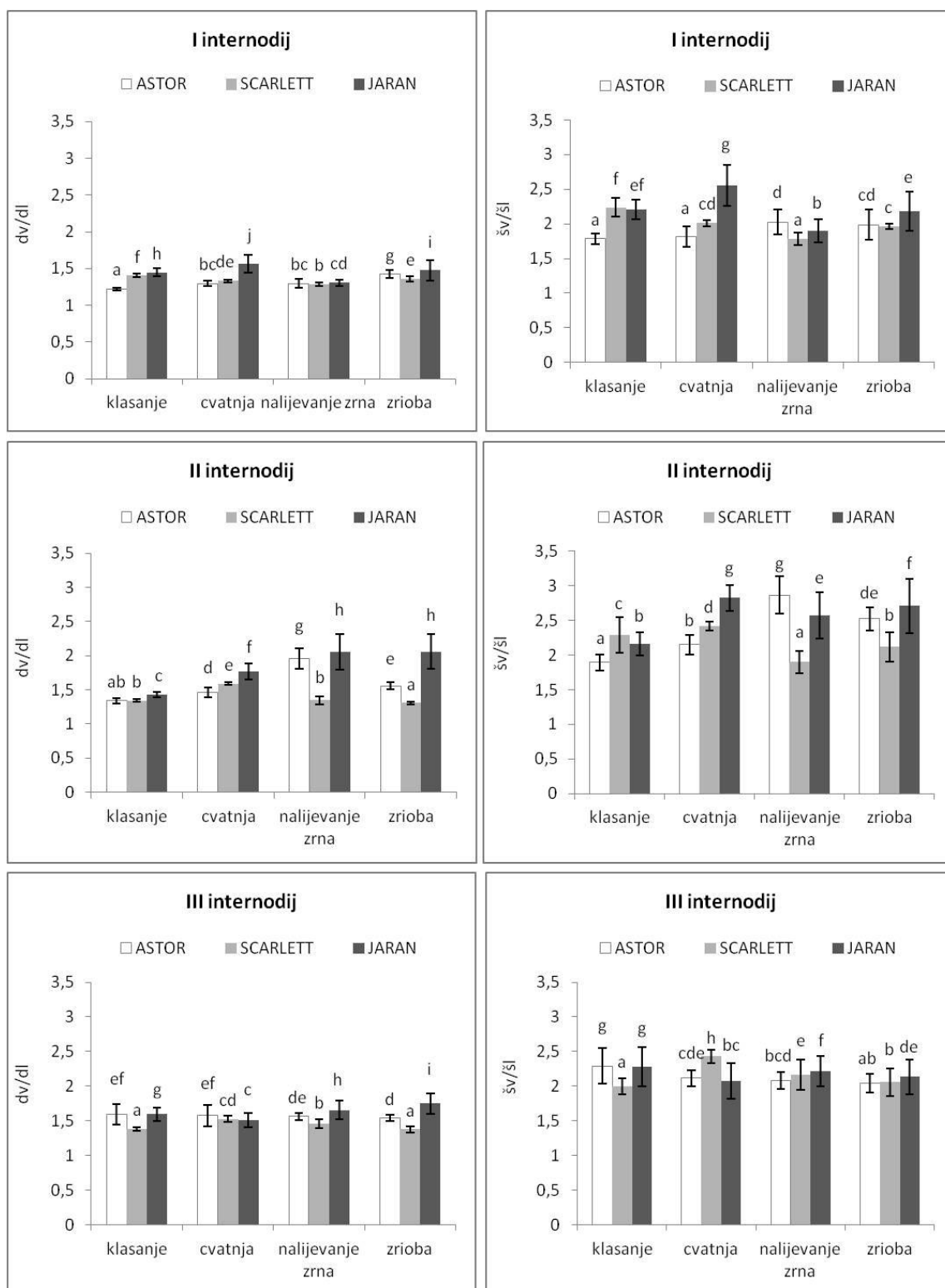
In this study three spring barley cultivars Astor and Jaran from Croatia and Scarlett from Germany were grown under field conditions. Plants were grown at the experimental field of the Agricultural Institute Osijek in a random block design. Sampling was done from May till June in the years 2010 and 2011 including four developmental stages: heading, anthesis, grain filling and ripening. Analyses were done on three stem internodes starting with basal, also the oldest, as the first one and proceeding to the top with the second and the third as the youngest internode. Measurement of the cell wall thickness was done on previously fixed and embedded samples which were cut on the microtome and stained using toluidine blue dye. Handmade sections were used for histochemical staining of lignin by two methods, Wiesner reaction and Maüle test, as well as for determination of guaiacol peroxidase activity *in situ*. Enzymatic activity of guaiacol peroxidases were assayed in gel and spectrophotometrically. Lignin content was determined according to Klason method and together with acid soluble lignin estimated as a total lignin whereas cellulose content was determined by using Updegraff reagent. Folin-Ciocalteu reagent was used for determination of total soluble phenolics in the internodes of spring barley stems. A gene expression analysis of the lignin biosynthetic pathways was done by using Real-Time PCR. Total RNA and DNA were isolated from internode samples. RNA was reversely transcribed into cDNA using oligo dT₁₆ primers. Primers for housekeeping gene *HvGAPDH* and target genes *HvCCR* and *HvCAD* were created by using PrimerPlus3 program.

In transverse sections of barley stem internodes lignin was found to be predominate in the sclerenchyma ring of the cortex. Also, lignin was found in the epidermis, parenchyma and vascular bundles. Deposition of lignin subunits is developmentally controlled. Guaiacyl subunits are found in basal and upper parts of the internode

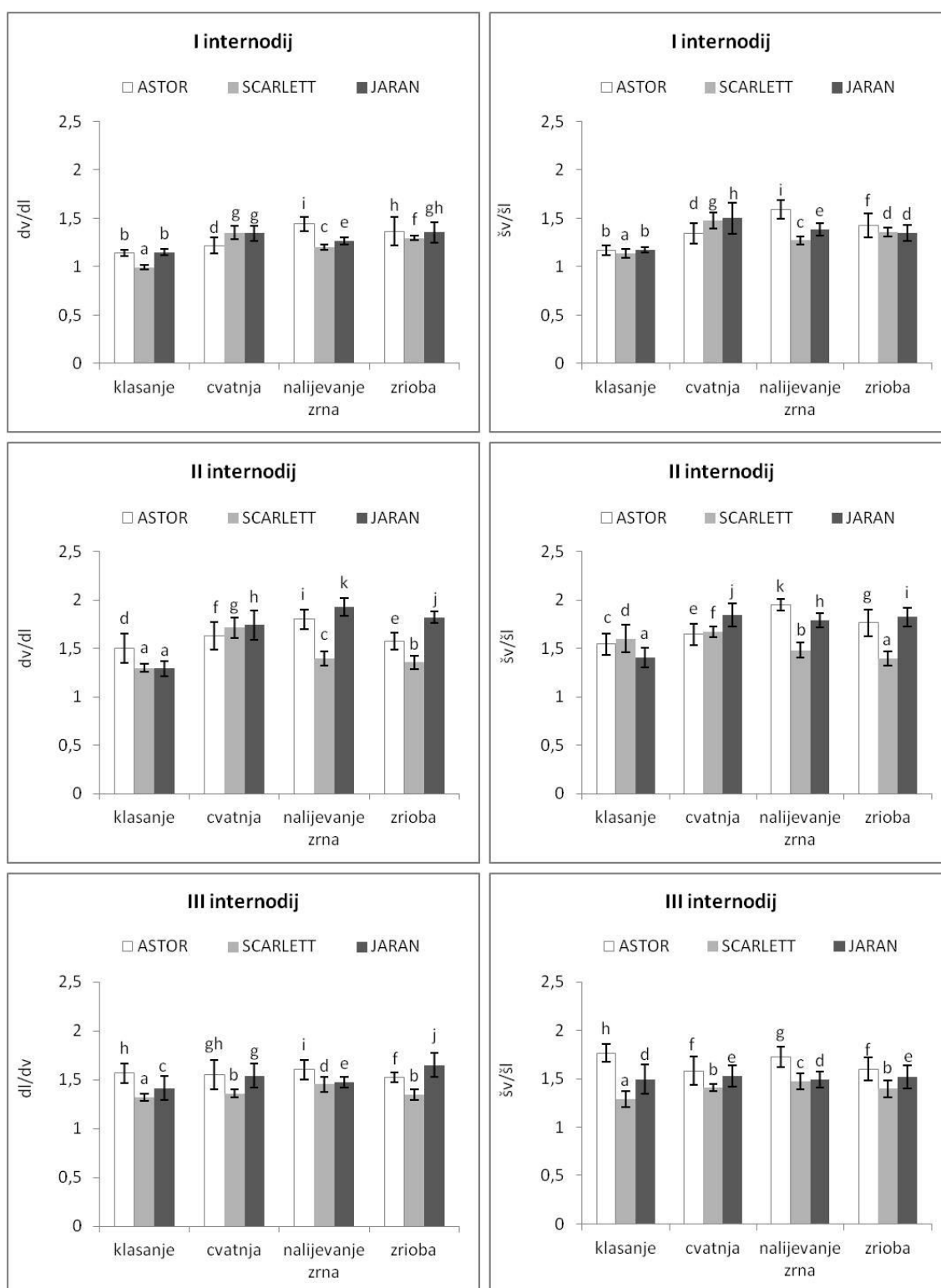
closest to the node's intercalary meristems and the deposition of syringyl subunits follows guaiacyl and can be found in older and more lignified tissue. Cell wall thickness increases throughout stem development in all internodes as a result of lignin deposition and it is cultivar dependent. Most of the lignin is deposited during anthesis in cultivars Scarlett and Jaran and in the cultivar Astor during grain filling. Activity of guaiacol peroxidases *in situ* is colocalized with lignin deposition. Enzymatic activity together with in gel activity is found to be highest in the first internodes. Total soluble phenolics increase during grain filling and anthesis in cultivar Astor and cultivars Scarlett and Jaran, respectively. Cellulose content is relatively constant during developmental stages in years 2010 and 2011. Total lignin content is increasing with stem development especially in the first internodes and is highest in the ripening stage, but it is also relative to cultivar and developmental stage. Genes of the lignin biosynthetic pathways *HvCCR* showed highest expression in the anthesis in the third internode of all three cultivars whereas gene *HvCAD* in cultivars Astor and Scarlett showed highest expression in the anthesis and in cultivar Jaran in the heading stage.

Lignification process is under a strong influence of genotype and environmental factors which determine lignin synthesis dynamics and deposition of lignin in the cell walls of three spring barley cultivar.

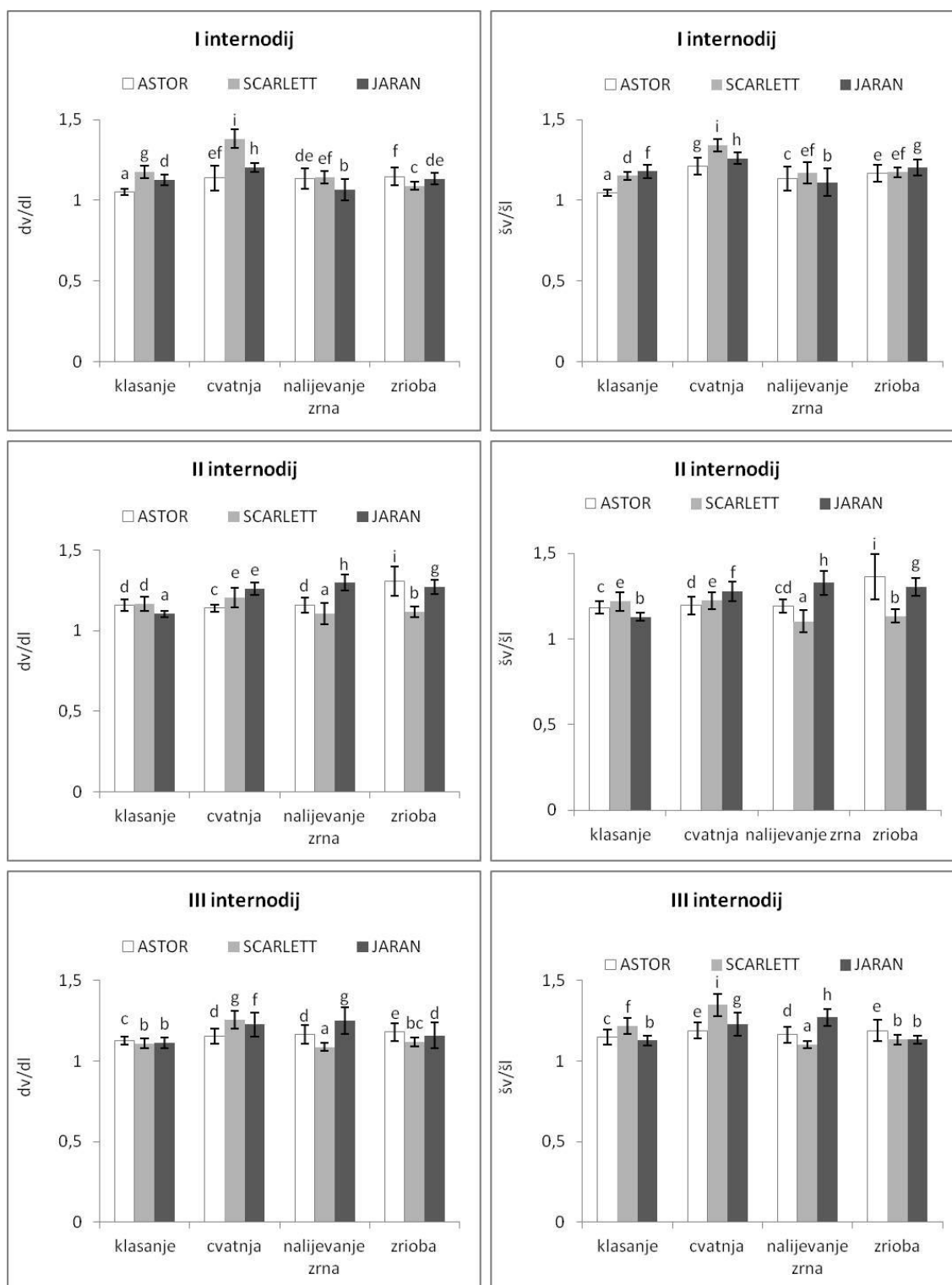
9. PRILOZI



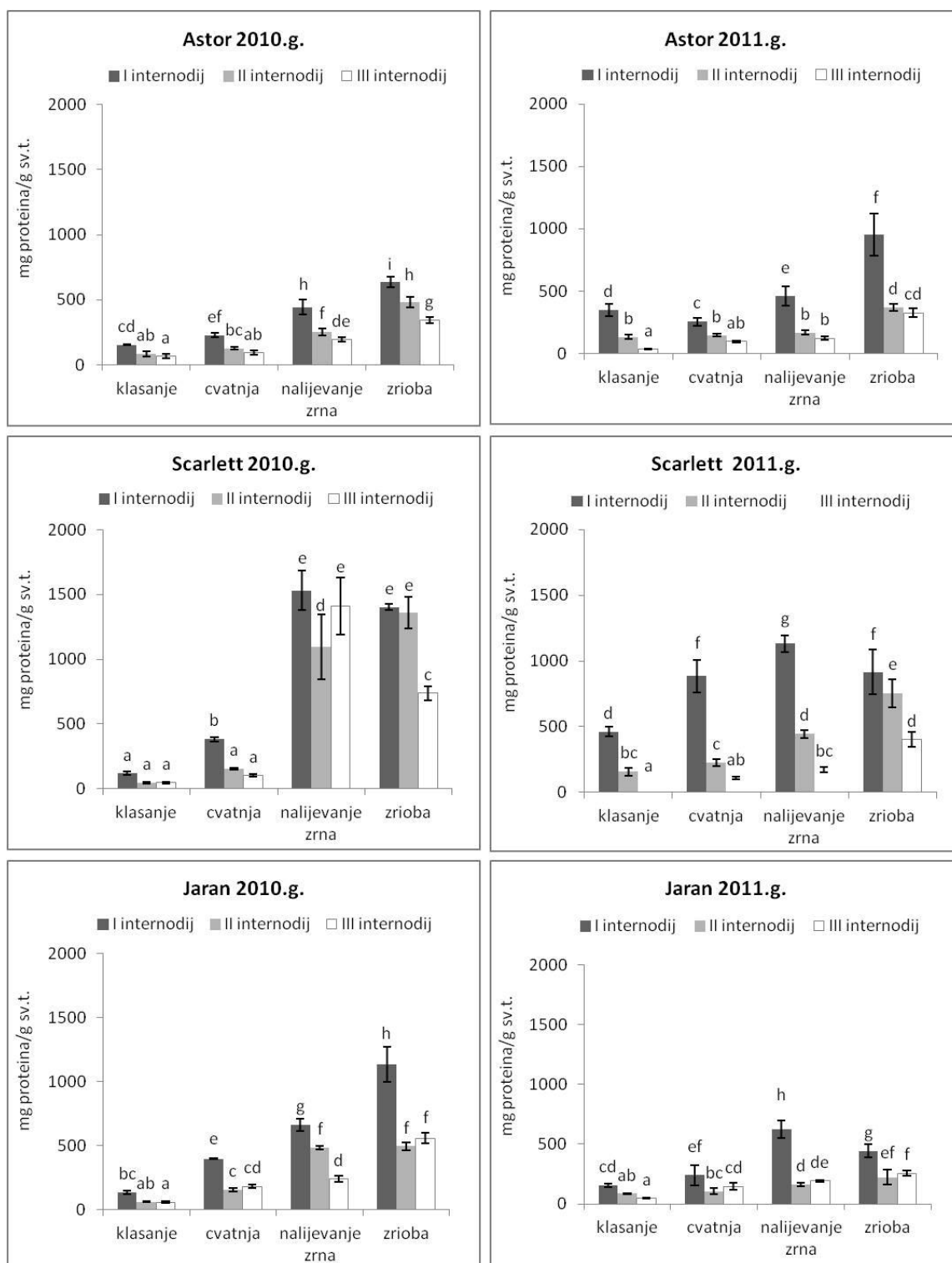
Slika 53. Debljina stijenki stanica epiderme u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze. Vrijednosti su izražene kao omjer duljine vanjskog ruba i lumena (dv/dl) te širine vanjskog ruba i lumena (šv/šl). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost 100 mjerenja, $n=100$).



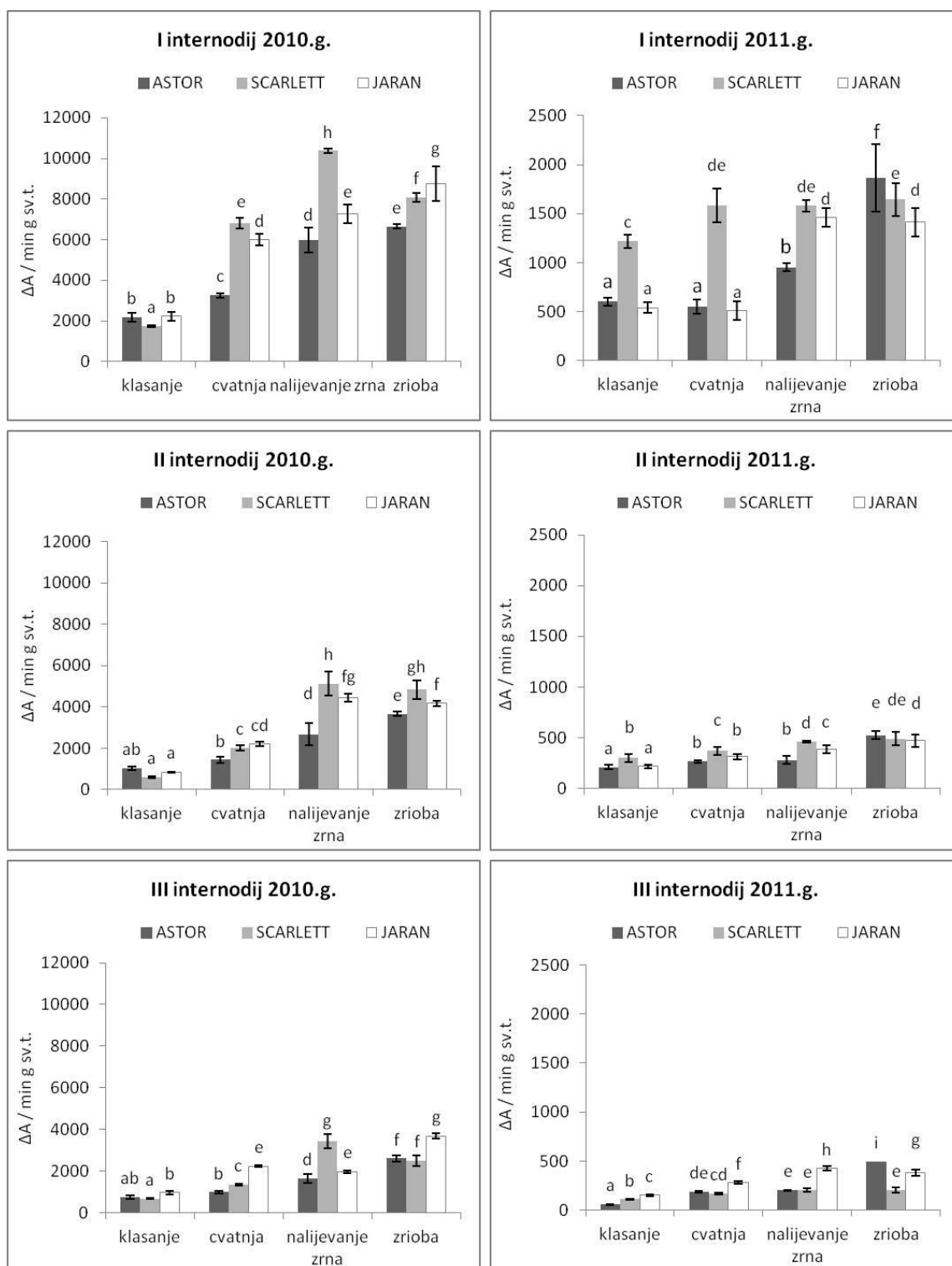
Slika 54. Debljina stijenke stanica kore u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze. Vrijednosti su izražene kao omjer duljine vanjskog ruba i lumena (dv/dl) te širine vanjskog ruba i lumena (šv/šl). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost 100 mjerenja, $n=100$).



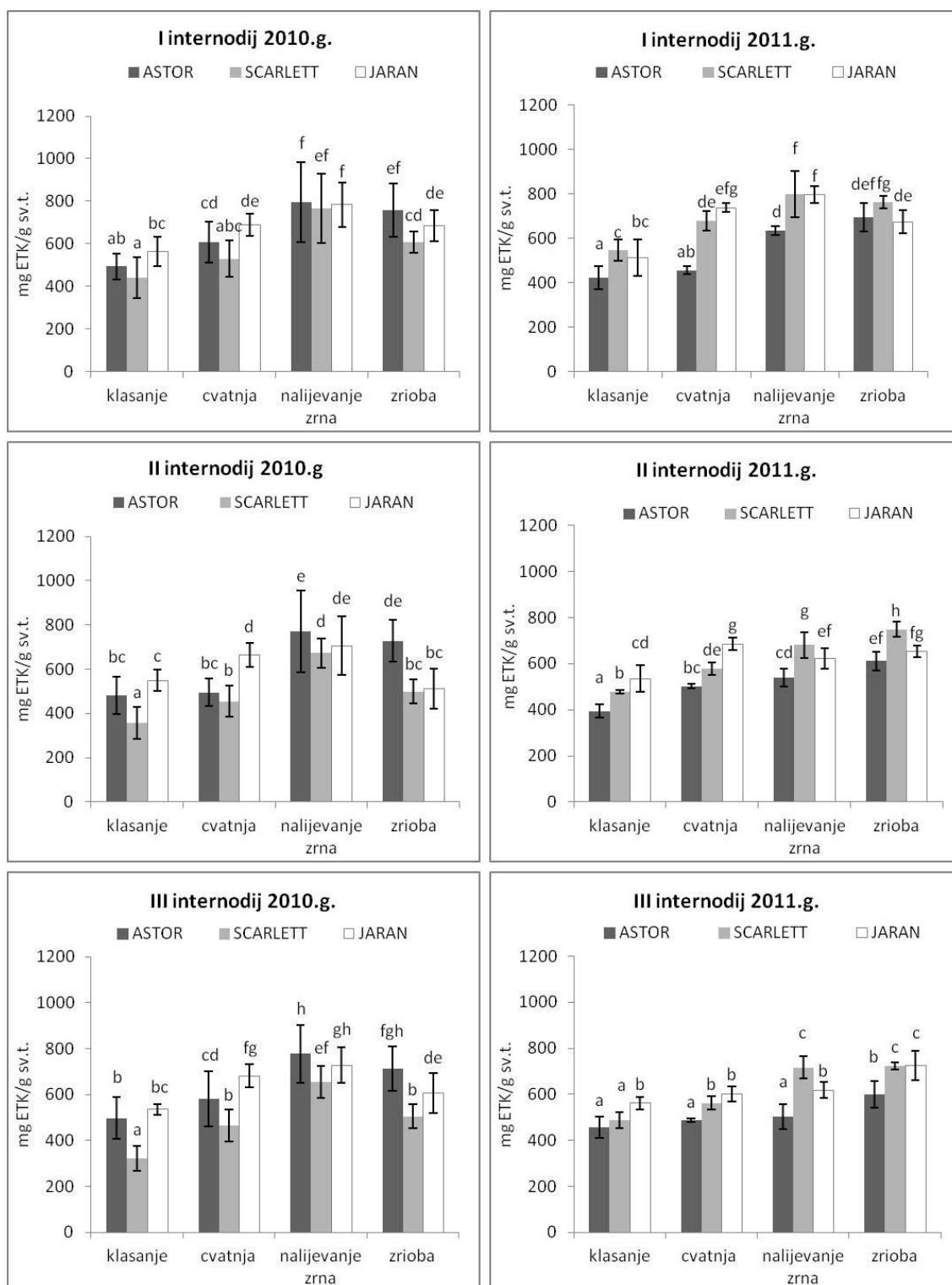
Slika 55. Debljina stijenki stanica parenhima u internodijima tri sorte jarog ječma tijekom četiri razvojne faze. Vrijednosti su izražene kao omjer duljine vanjskog ruba i lumena (dv/dl) te širine vanjskog ruba i lumena ($šv/šl$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost 100 mjerenja, $n=100$).



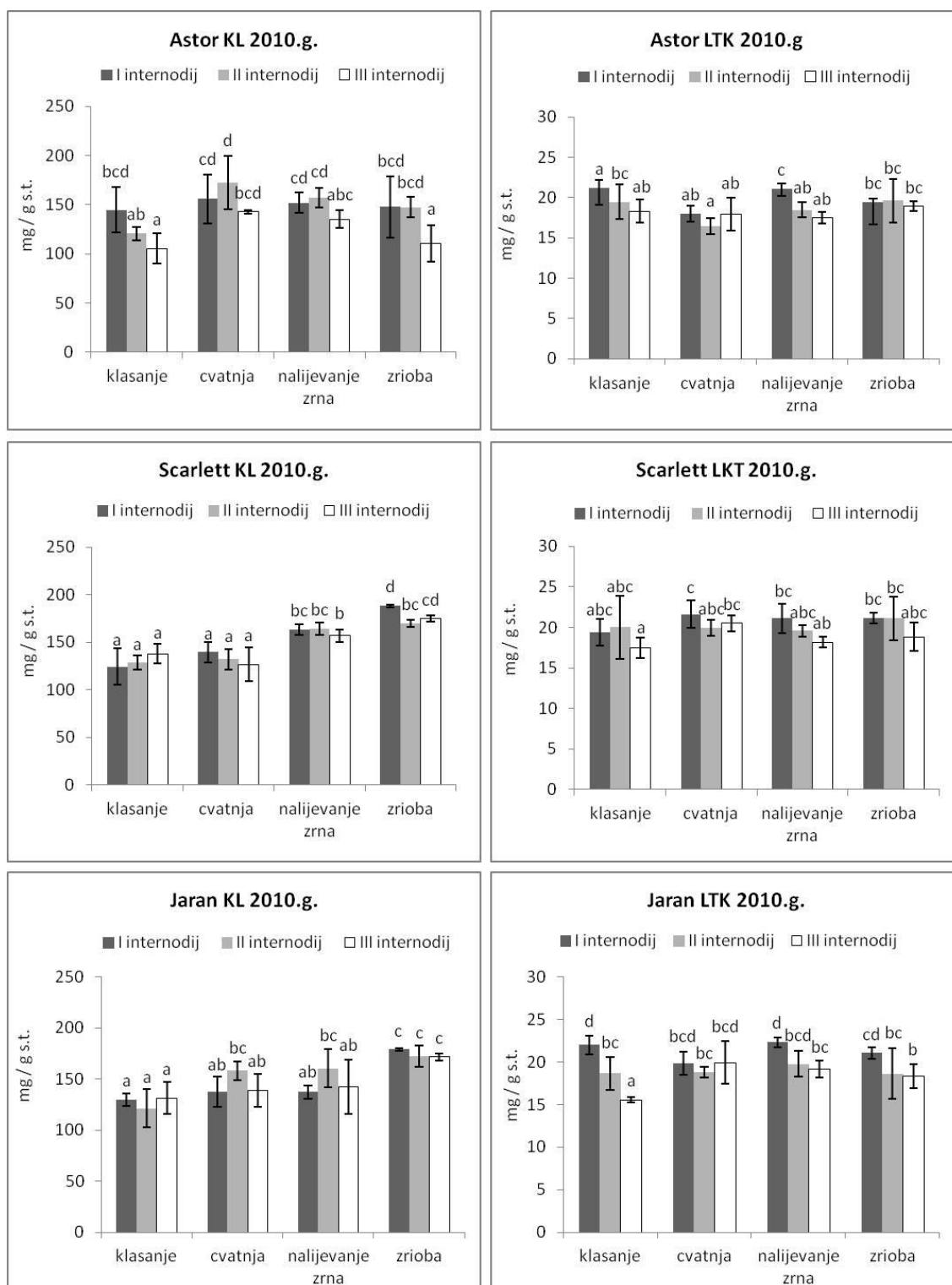
Slika 56. Specifična aktivnost gvajakol peroksidaza u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. i 2011. godini. Specifična aktivnost je izražena kao miligram proteina po gramu svježe tvari (mg proteina/g sv.t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).



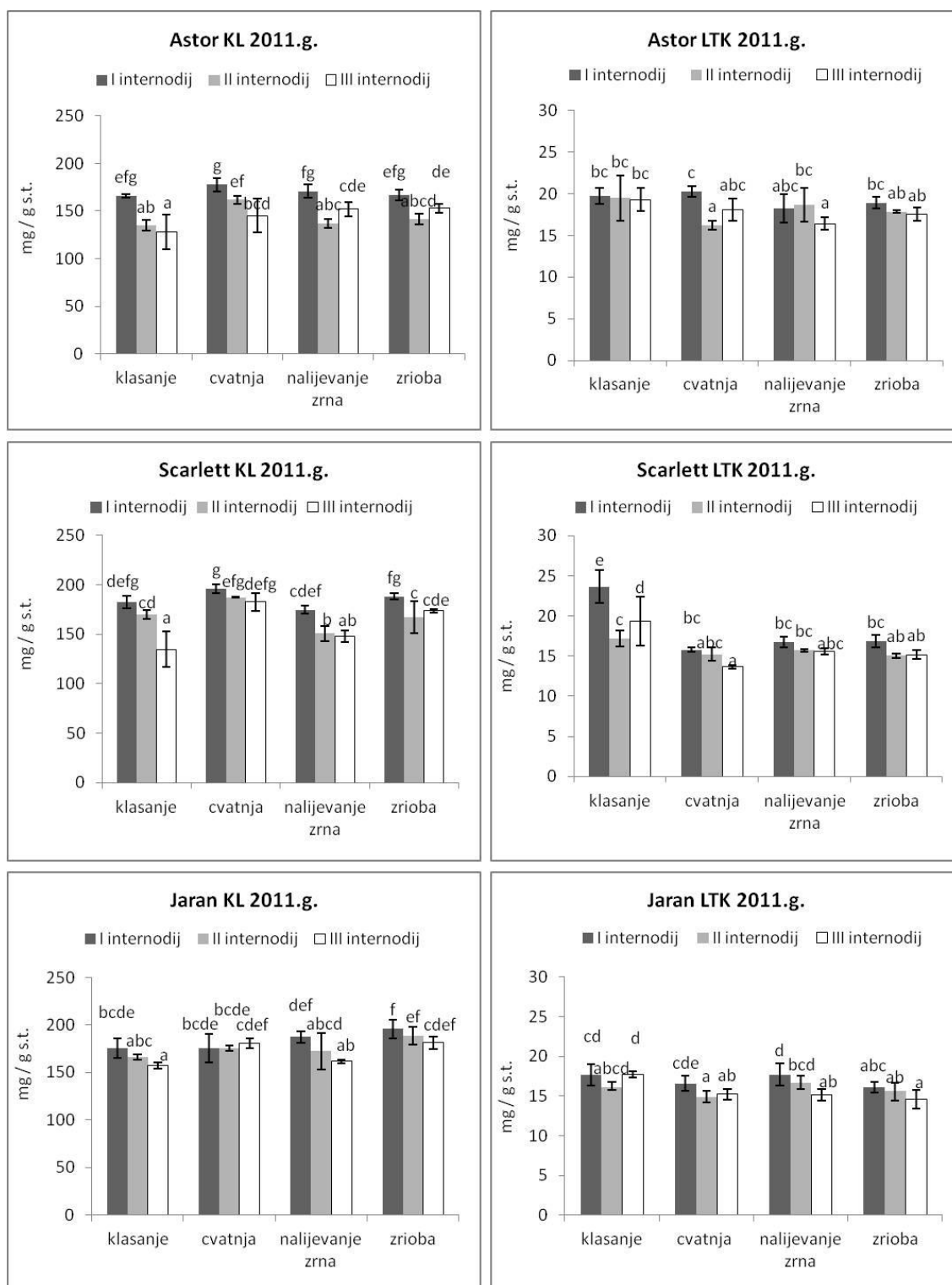
Slika 57. Ukupna aktivnost gvajakol peroksidaza u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasiranje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. i 2011. godini. Aktivnost je izražena kao promjena apsorbancije u minuti po masi svježe tvari ($\Delta A/\text{min g sv.t.}$). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).



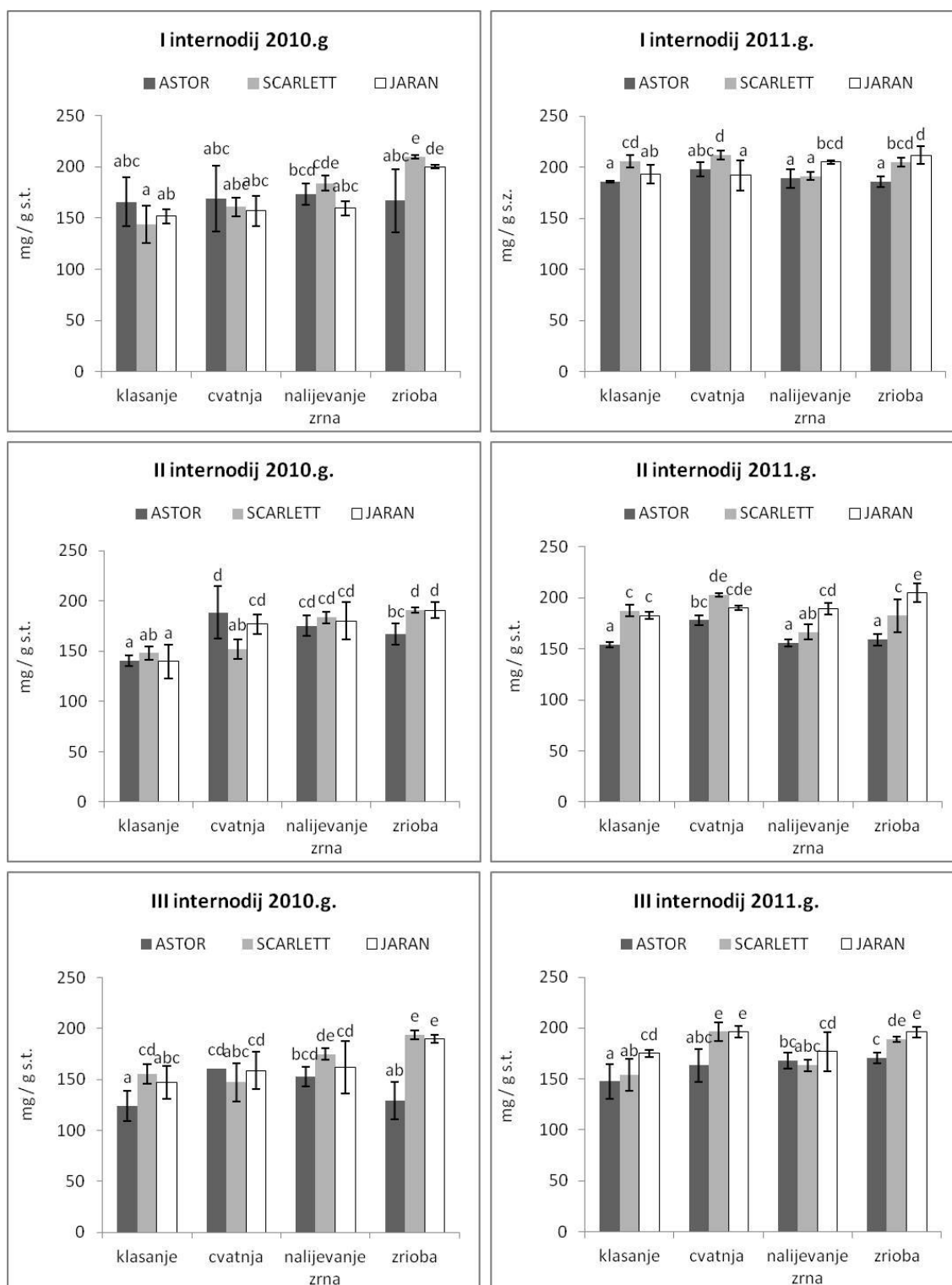
Slika 58. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. i 2011. godini izražen kao miligram ekvivalenta taninske kiseline po gramu svježe tvari (mg ETK/g s.v.t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).



Slika 59. Sadržaj Klason-ovog lignina (KL) i lignina topljivog u kiselini (LTK) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. godini izražen kao miligram po gramu suhe tvari (mg/g s. t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).



Slika 60. Sadržaj Klason-ovog lignina (KL) i lignina topljivog u kiselini (LTK) u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2011. godini izražen kao miligram po gramu suhe tvari (mg/g s. t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).



Slika 61. Sadržaj ukupnog lignina u internodijima tri sorte jarog ječma Astor, Scarlett i Jaran tijekom četiri razvojne faze: klasanje, cvatnja, nalijevanje zrna i zrioba u 2010. i 2011. godini izražen kao miligram po gramu suhe tvari (mg/g s. t.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Barovi predstavljaju \pm SD (prikazana je srednja vrijednost pet mjerenja, $n=5$).

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 21. kolovoza 1973. godine gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu diplomirala sam 1999. godine, smjer profesor biologije. Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2004. godine, smjer Fiziologija i imunobiologija i magistrirala 2008. godine. Od 2004.-2007. bila sam zaposlena kao stručni suradnik u Laboratoriju za mutagenezu i kancerogenezu Zavoda za molekularnu biologiju. Od 2007. godine do danas zaposlena sam Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku u Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka kao asistent. Sudjelovala sam na međunarodnim skupovima i koautor sam dva rada.

Znanstveni radovi:

1. Filipović Marijić, Vlatka; Makarević, Janja; Stojković, Ranko; **Kalinić, Lidija**; Katalenić, Darinka; Radačić, Marko., 2008. Reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by pyrazolone compounds, derivatives of tetrahydroindazolonicarboxylic acid (HIDA). *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 30 , 9; 675-680
2. Lepeduš, Hrvoje; **Begović, Lidija**; Mlinarić, Selma; Šimić, Domagoj; Štolfa, Ivna; Parađiković, Nada; Užarević, Zvonimir; Jurković, Vlatka; Cesar, Vera. Physiology and biochemistry of leaves bleaching in prematurely aging maple (*Acer saccharinum* L.) trees: II. Functional and molecular adjustment of PSII. *Acta botanica Croatica*. 70 (2011), 2; 137-150.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. HDBMB: Congress of Croatian society of biochemistry and molecular biology, Osijek, 2008. **Begović, Lidija**; Mlinarić, Selma; Štolfa, Ivna; Parađiković, Nada; Šimić, Domagoj; Cesar, Vera; Lepeduš, Hrvoje. Functional and molecular adjustment of PSII in bleached leaves of silver maple. *Book of abstracts of the HDBMB 2008, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology / Strelec, Ivica ; Glavaš-Obrovac, Ljubica (ur.)*. Osijek : Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2008. 66-67 (poster, sažetak, znanstveni).

2. IRPA12 International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, 2008. Radnić, Maja; **Kalinić, Lidija**; Matić, Igor; Ruso, Ana; Marijanović, Inga; Furčić, Ivana; Nagy, Biserka. Effect of FADD expression during UVC carcinogenesis // *IRPA12 International Congress of the International Radiation Protection Association, Proceedings*. IRPA, 2008. (poster, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

3. Hrvatski biološki kongres, Osijek, Hrvatska. 2009. **Begović, Lidija**; Mlinarić, Selma; Antunović, Jasenka; Katanić, Zorana; Lepeduš, Hrvoje; Cesar, Vera. Physiological responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term cobalt exposure // *Zbornik sažetaka/ 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-20. rujna 2009., Osijek/Besendorfer, Višnja; Kopjar, Nevenka; Vidaković-Cifrek, Željka; Tkalec, Mirta; Bauer, Nataša; Lukša, Žaklin* (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 2009. 93-94 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).