UTJECAJ FENOFAZE I GENOTIPA NA SADRŽAJ FRUKTANA U JEČMU (Hordeum vulgare L.)

Škoro, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:934116

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer znanstveni

Marin Škoro

Utjecaj fenofaze i genotipa na sadržaj fruktana u ječmu (*Hordeum vulgare* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2019. godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer znanstveni

Marin Škoro

Utjecaj fenofaze i genotipa na sadržaj fruktana u ječmu (*Hordeum vulgare* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2019. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ FENOFAZE I GENOTIPA NA SADRŽAJ FRUKTANA U JEČMU (*Hordeum vulgare* L.)

Marin Škoro

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka
Mentor: Dr. sc. Lidija Begović, doc.

Kratak sažetak diplomskog rada: Ugljikohidrati topljivi u vodi kod žitarica umjerenog pojasa uglavnom su sastavljeni od saharoze, glukoze, fruktoze i fruktana. Fruktani su polimeri fruktoze dobiveni iz saharoze koji predstavljaju glavnu komponentu ukupnih šećera u biljkama te su važna privremena zaliha ugljika za biljke u periodu nalijevanja zrna. U ovom radu istraživan je sadržaj fruktana u stabljikama te ukupnih topljivih šećera u stabljikama i listovima deset kultivara ozimog ječma u tri razvojne faze ječma: vlatanje, cvatnja i nalijevanje zrna. Pretpostavka je bila da će se sadržaj šećera i fruktana razlikovati u različitim fazama razvoja u kao i u različitim kultivarima. Rezultati su pokazali varijacije u sadržaju kako ukupnih šećera u listovima i stabljikama, tako i fruktana u stabljikama. Koncentracije fruktana u svim kultivarima najmanje su bile u fazi vlatanja, dok tijekom cvatnje i nalijevanja zrna dolazi od porasta koncentracija. Najviše fruktana izmjereno je kod kultivara Titan, Casanova i Osk.6.24/4-12, a najmanje kod Zlatka i Baruna. Akumulacija ukupnih šećera također je kod većine kultivara započela u fazi cvatnje, a nastavila se i tijekom nalijevanja zrna. Kod kultivara Zlatko i Panonac koncentracije ukupnih šećera nisu se mijenjale tijekom razvoja.

Broj stranica: 31
Broj slika: 20
Broj tablica: 0
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: fruktani, šećeri, ječam, razvoj, genotip

Datum obrane: 14. svibnja 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Dr.sc. Zorana Katanić, doc., predsjednik
2. Dr.sc. Lidija Begović, doc., član
3. Dr.sc. Selma Mlinarić, doc., član
4. Dr.sc. Rosemary Vuković, doc., zamjena člana

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

BASIC DOCUMENTATION CARD **Master thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology
Graduate university study program in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

EFFECT OF PHENOPHASE AND GENOTYPE ON FRUCTAN CONTENT IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)

Thesis performed at: Laboratory of plant cell and molecular biology
Supervisor: Lidija Begović, PhD, assistant professor

Short abstract: Water-soluble carbohydrates of temperate cereals are mainly composed of sucrose, glucose, fructose and fructans. Fructans are fructose polymers derived from sucrose and they present the main component of total soluble sugars in plants. They are important temperate carbon reserve for plants during grain filling stage. In this study, fructan and total soluble sugars contents were measured in ten winter barley cultivars at three developmental stages: booting, anthesis and grain filling. The main hypothesis was that the sugar and fructan content will vary among different development stages and between genotypes. Results showed variations both in total soluble sugars and fructan content in leaves and stems. Fructan concentrations were low at booting while at anthesis and grain filling stages fructan content increased. The highest fructan content was measured in cultivars Titan, Casanova and Osk.6.24/4-12 while cultivars Zlatko and Barun had lower fructan content. Accumulation of total soluble sugars begin during anthesis, in most cultivars, and continued during grain filling stage. In cultivars Zlatko and Panonac concentrations of total soluble sugars remained unchanged during development.

Number of pages: 31
Number of figures: 20
Number of tables: 0
Number of references: 43
Original in: Croatian

Keywords: fructans, sugars, barley, development, genotype

Date of the thesis defense: May 14th 2019.

Reviewers:
1. Zorana Katanić, PhD, assistant professor, chair
2. Lidija Begović, PhD, assistant professor, member
3. Selma Mlinarić, PhD, assistant professor, member
4. Rosemary Vuković, PhD, assistant professor, member

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Lidiji Begović na svoj pomoći, strpljenju i posvećenom vremenu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Hvala svim kolegama i prijateljima za lijepe trenutke tijekom studiranja.

Najveća zahvala mojoj obitelji, roditeljima i sestri, na svakoj potpori i podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

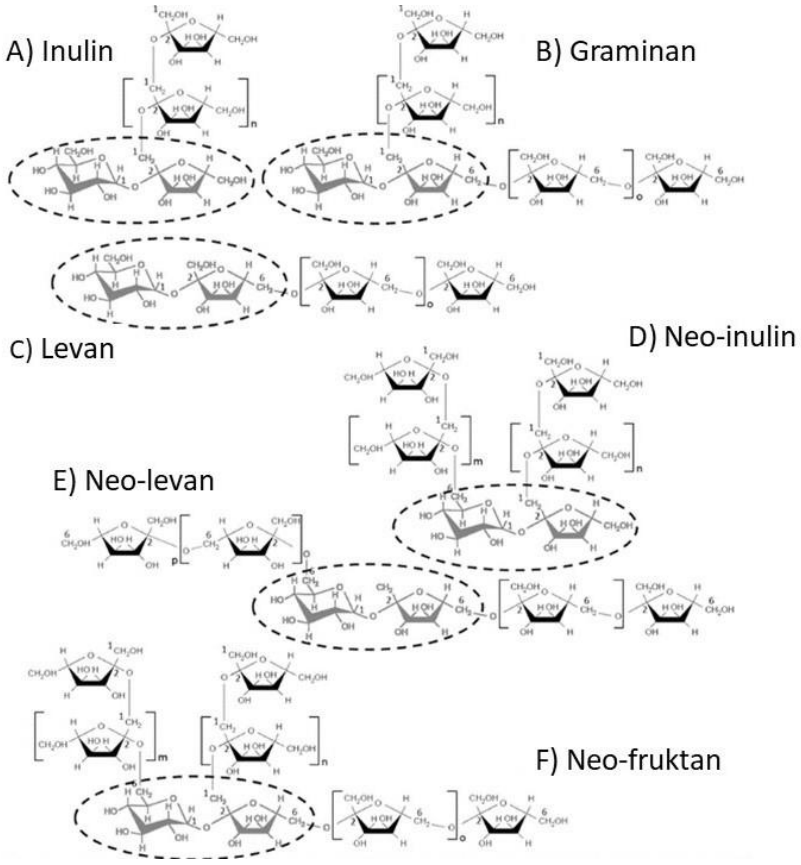
1. Uvod ... 1
1.1. Fruktani u žitaricama ... 1
1.2. Biosinteza i mobilizacija fruktana ... 2
1.3. Uloga fruktana u biljkama i korist za čovjeka ... 4
1.4. Građa ječma ... 5
1.5. Rast i razvoj ječma ... 6
1.6. Cilj rada ... 8
2. Materijali i metode ... 9
2.1. Biljni materijal i uzorkovanje ... 9
2.2. Ekstrakcija ukupnih topljivih šećera ... 9
2.3. Mjerenje sadržaja ukupnih topljivih šećera ... 10
2.4. Ekstrakcija fruktana topljivih u vodi ... 11
2.5. Mjerenje sadržaja fruktana ... 11
2.6. Statistička obrada podataka ... 11
3. Rezultati ... 12
3.1. Sadržaj ukupnih topljivih šećera u stabljici različitih kultivara ozimog ječma ... 12
3.2. Sadržaj ukupnih topljivih šećera u listovima različitih kultivara ozimog ječma ... 14
3.3. Usporedba sadržaja ukupnih topljivih šećera u listovima i stabljikama ... 17
3.4. Sadržaj fruktana u različitim kultivarima ozimog ječma ... 19
4. Rasprava ... 23
5. Zaključak ... 27
6. Literatura ... 28

1. Uvod

1.1. Fruktani u žitaricama

Iako je škrob glavna kemijska tvar koja se prikuplja iz zrna žitarica umjerenog pojasa, veći dio sezone rasta on čini samo vrlo mali udio u ukupnom sadržaju skladišnih ugljikohidrata u biljkama. Prije cvatnje biljaka, topljivi ugljikohidrati se nakupljaju u listovima, stabljikama i vršnim dijelovima. Ti ugljikohidrati se sastoje od mješavine monosaharida, saharoze i fruktana (Pollock i Cairns 1991). Fruktani čine najveći dio mase topljivih šećera u stabljikama te mogu činiti do 85% sadržaja ukupnih topljivih šećera u fazama kada je njihova koncentracija najveća u stabljikama žitarica (Schnyder, 1993). Utvrđeno je da 12-15% vrsta cvjetnica sadrže fruktane u svojim tkivima (Livingston i sur. 2009). Fruktani, ili polifruktozilsaharoze, polimeri su fruktoze dobiveni iz saharoze. Saharoza je disaharid glukoze i fruktoze te je završni produkt fotosinteze (Ritsema i Smeekens, 2003). Za razliku od škroba, koji se skladišti u specijaliziranim organelima, plastidima, fruktani se sintetiziraju i skladište u vakuolama biljnih stanica (Wiemken i sur. 1986).

Biljni fruktani imaju različite strukture i duljine lanaca, od tri do nekoliko stotina fruktoznih jedinica. Jedan od najjednostavnijih fruktana je linearni inulin koji je građen od fruktoznih ostataka povezanih β(1-2) vezom (Slika 1). U biljkama se pojavljuje i drugačiji tip inulina nazvan inulin neo-serija. Inulin neo-serija ima dva β(1-2) vezana fruktoza lanca pričvršćena na početnu jedinicu od saharoze. Fruktani levanskog tipa (također zvani fleini u biljkama) su također nađeni u travama (*Poaceae*). Osnovna struktura ovih fruktana je linearni fruktozni polimer povezan β(2-6) vezama. Mješoviti tip fruktana, nazvan graminani, također je prisutan u biljkama, a građen je od fruktoznih ostataka povezanih β(2-6) vezom s β(1-2) ograncima. Graminani ponekad stvaraju još složenije strukture u kojima su neo-šećeri povezani s ograncima od fruktanskih lanaca (Ritsema i Smeekens, 2003).



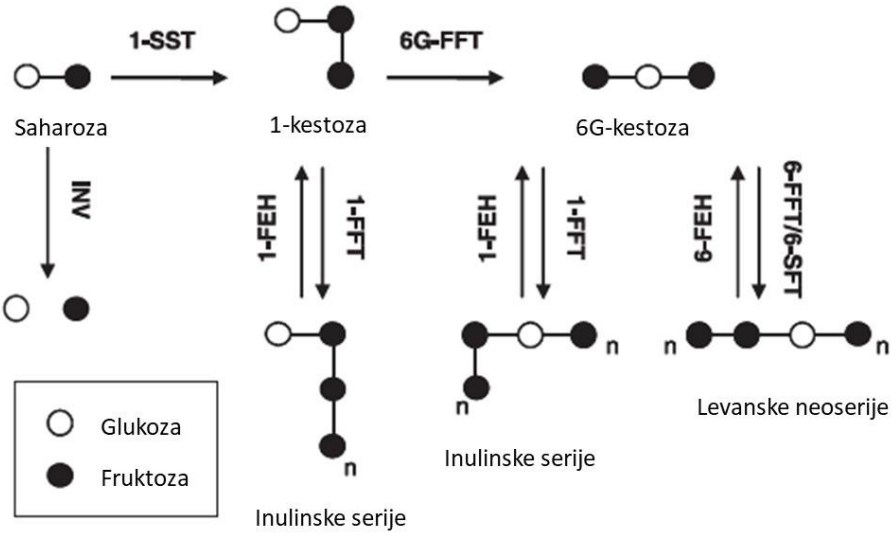
Slika 1: Prikazi strukturnih formula najčešćih tipova fruktana. Molekula saharoze je zaokružena u spojevima (preuzeto i prilagođeno iz Salinas i sur. 2016)

1.2. Biosinteza i mobilizacija fruktana

Sinteza fruktana potaknuta je kada stopa fotosinteze nadmašuje potrebe, odnosno kada razina saharoze u *sink* organima dosegne kritičnu vrijednost (Pollock, 1986). Sinteza fruktana počinje pretvorbom saharoze u 1-kestozu (Slika 2). Enzim potreban za ovu reakciju se zove saharoza:saharoza 1-fruktoziltransferaza (1-SST) te je on pronađen u svim biljkama koje proizvode fruktane. 1-kestozu koriste specifične fruktoziltransferaze za sintezu duljih i složenijih fruktana. U biljkama koje proizvode inulin izolirana su dva enzima, 1-SST i fruktan:fruktan 1-fruktoziltransferaza (1-FFT). 1-FFT koristi 1-kestozu ili fruktane s većim stupnjem polimerizacije kao donore fruktoze, a može koristiti različite fruktane ili saharozu kao primatelje fruktoze (Ritsema i Smeekens, 2003). Dodatni enzimi potrebni su za sintezu složenijih fruktana. Sinteza neo-serijskog inulina zahtjeva fruktan:fruktan 6G-fruktoziltransferazu (6G-FFT). On koristi 1-kestozu kao donor fruktoze i prenosi je do glukoznog ostatka saharoze i veže je β(2-6) vezom stvarajući neo-kestozu (Vijn i sur. 1997).

U ječmu je otkriven još jedan enzim, saharoza:fruktan 6-fruktoziltransferaza (6-SFT). On koristi 1-kestozu za sintezu bifurkoze, tetrasaharida s dodatnom β(2-6) vezanom fruktozom (Simmen i sur. 1993).

Degradacija fruktanskih rezervi u žitaricama može biti inducirana različitim okolišnim uvjetima. Različiti tipovi fruktanskih hidrolaza razgrađuju fruktane, no u biljkama je najčešća fruktan-β-fruktozidaza (FEH, fruktan egzohidrolaza). Ovaj enzim cijepa fruktane uklanjanjem krajnje ne-reducirajuće fruktozne jedinice (egzolitička reakcija) (Marx i sur. 1997). Budući da žitarice imaju graminanski tip fruktana koji imaju i β(1-2) i β(2-6) veze, vjeruje se da postoji i β(2-6)-specifična egzohidrolaza koja je do sada otkrivena kod zobi (Henson i Livingston, 1996). Postoji i teorija da 1-FFT također može biti uključena u remobilizaciju. Inulin može biti korišten kao fruktozilni donor za 1-FFT, dok su i inulin i saharoza akceptori za ovaj enzim. Prema tome, 1-FFT može skratiti inulin prijenosom fruktozilnog ostatka na saharozu, pri čemu nastaju 1-kestoza i skraćeni inulin. 1-kestoza se potom može razgraditi enzimom invertazom. Nije još poznato ima li ovakav biokemijski put značajnu ulogu u biljkama (Ritsema i Smeekens, 2003).



Slika 2: Metabolički put fruktana i enzimi koji sudjeluju u njemu (preuzeto i prilagođeno iz Chalmers i sur. 2005)

1.3. Uloga fruktana u biljkama i korist za čovjeka

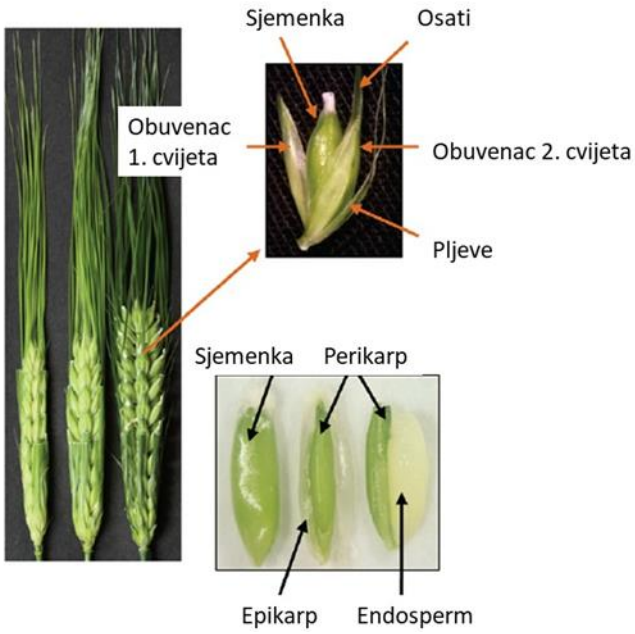
Fruktani mogu imati razne uloge u biljkama. Osim što su glavni skladišni ugljikohidrati, sinteza fruktana može kontrolirati koncentraciju saharoze u vakuolama stanica. Stvaranje fruktana u vakuolama snižava koncentraciju saharoze u stanicama i na taj način sprječava povratnu inhibiciju fotosinteze potaknutu šećerima (Pollock, 1986). Važnu ulogu u biljkama fruktani imaju i u pogledu klimatskih uvjeta. Globalna distribucija biljaka koje akumuliraju fruktane pokazuje da su one najbrojnije u umjerenim klimatskim zonama gdje postoje razdoblja suše i smrzavanja, dok u tropskim zonama gotovo izostaju (Vijn i Smeekens, 1999). Iako se sinteza škroba drastično smanjuje kada temperature padnu ispod 10° C, fotosinteza i proizvodnja fruktana su mnogo manje osjetljivi na niske temperature (Pollock, 1986). Iz tih razloga, skladištenje fruktana ima prednost kod biljaka koje su fotosintetski aktivne tijekom zime ili ranog proljeća. Fruktani su uključeni i u toleranciju biljaka na sušu i hladnoću (Suzuki i Nass, 1988; Pontis, 1989). Točni mehanizmi kojim fruktani pomažu biljkama da toleriraju stres nisu poznati, no pretpostavlja se da sudjeluju u prevenciji oštećenja staničnih membrana (Ritsema i Smeekens, 2003). Smrzavanje uzrokuje stvaranje ozljeda adhezijom, koja je rezultat kompeticije hidrofilnih spojeva u staničnoj stijenci i membrani i leda za vodom na površini stanica, čime dolazi do dehidracije stanica i njihovog skupljanja. Heksozni šećeri oslobođeni hidrolizom fruktana oslobađaju se na površinu stanica i tako povećavaju kemijski potencijal površine te potiču topljenje kristala leda i sprječavaju adheziju (Olien i Lester, 1985).

Fruktani imaju i povoljno djelovanje na zdravlje kod ljudi. Inulinski tip fruktana prepoznat je kao blagotvoran sastojak prehrane. Oni su zapravo topljiva prehrambena vlakna koja ljudi ne mogu probaviti. Imaju prebiotičke kvalitete budući da ih koriste korisne crijevne bakterije za fermentaciju. Potiču rast dobrih bakterija, poput rodova *Lactobacilli* i *Bifidobacteria* u crijevima te tako utječu na crijevnu mikrofloru i smanjuju brojnost patogenih bakterija. Fermentacijom fruktana pomoću korisnih bakterija nastaju kratkolančane masne kiseline koje imaju pozitivan učinak na metabolizam masti (Vijn i Smeekens, 1999). Fruktani također potiču i resorpciju kalcija i zbog toga mogu biti korisni u prevenciji osteoporoze. Kod ljudi koji imaju prehranu bogatu fruktanima uočene su smanjene razine inzulina, kolesterola, triacilglicerola i fosfolipida u krvi (Ritsema i Smeekens, 2003). Male molekule fruktana sačinjene od 3 do 6 šećernih ostataka imaju sladak okus te su zbog toga dio prirodnih niskokaloričnih zaslađivača. Zbog svih tih pozitivnih

utjecaja na zdravlje ljudi fruktani se smatraju jednim od najobećavajućih sastojaka funkcionalne prehrane do sada.

1.4. Građa ječma

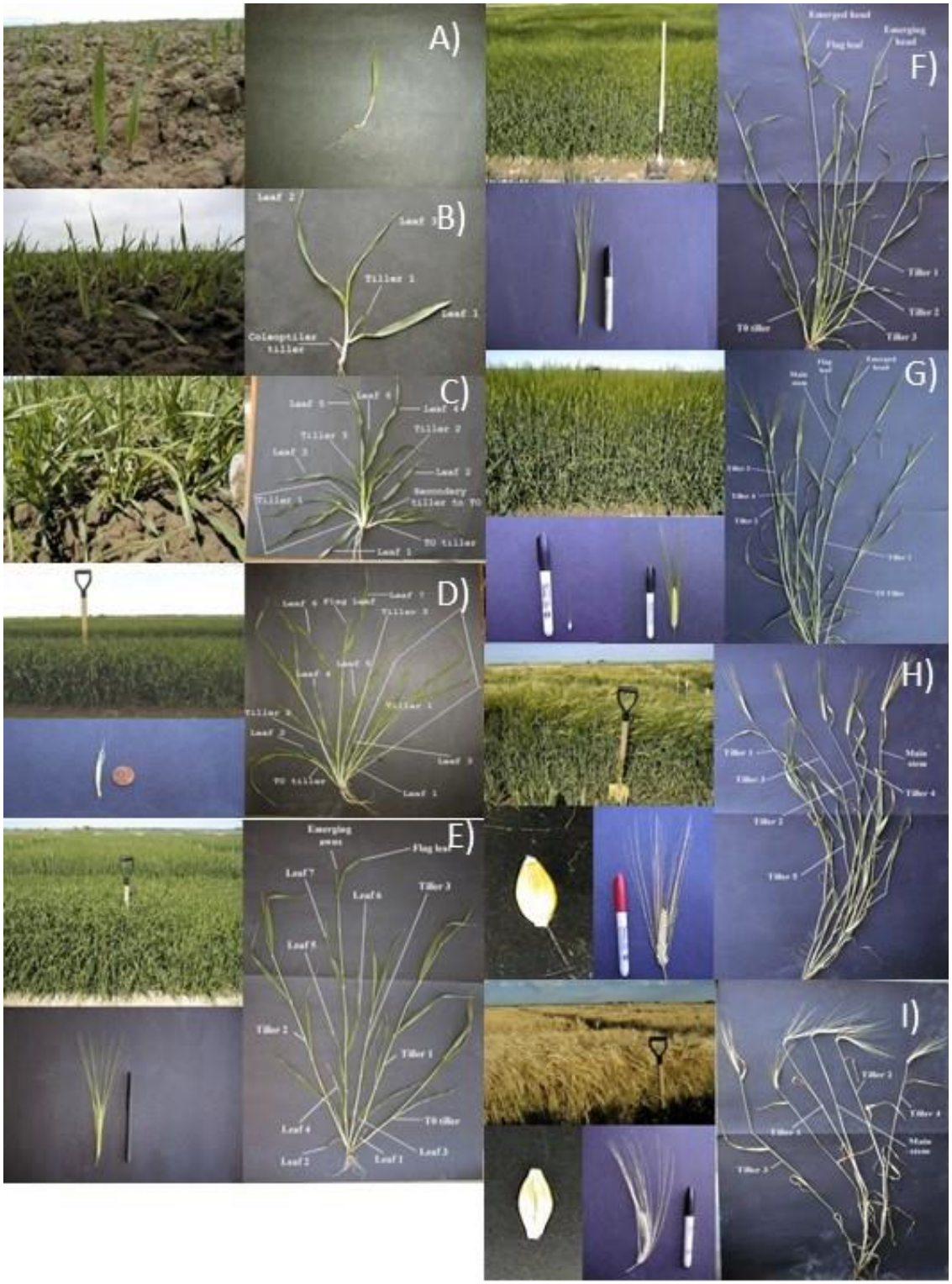
Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jednogodišnja biljka koja pripada porodici trava (Poaceae) zajedno s ostalim vrstama značajnim za prehranu ljudi i životinja, kao što su pšenica, kukuruz, riža, zob i druge. Kao i kod pšenice i zobi, ječam ima dva tipa korjenovog sustava. Prvi tip se razvija od klijanja do tjeranja izdanka. Tijekom tjeranja izdanka pojavljuje se i drugi tip korijena, adventivno korijenje. Korijen daje potporanj biljci i opskrbljuje ju vodom i hranjivim tvarima, a njegova dubina ovisi o strukturi tla, temperaturi i genetičkim svojstvima kultivara. Stabljike ječma su uspravne i sastavljene od 5 do 7 šupljih, cilindričnih internodija koji su odvojeni nodijima. Stabljike mogu narasti do 1,5 metara u visinu i sklone su polijeganju, a ječam može razviti do 5 sekundarnih stabljika. Nodiji nose listove koji su kao i kod svih trava smješteni nasuprotno na stabljici. Listovi ječma su linearni lanceolatni i sastoje se od lisnog rukavca i plojke. Na prijelazu lisnog rukavca u lisnu plojku ječam ima jako razvijene srpaste roščiće (lat. *auriculae*), koji obuhvaćaju stabljiku i prijelaze jedan preko drugoga, pa se po tom svojstvu ječam razlikuje od drugih žitarica. Ovojnica stabljike može biti pigmentirana antocijanima. Zadnji internodij stabljike se produžuje kao glavna os (lat. *rachis*) koja na nodijima nosi naizmjenične klasiće. Cvjetovi ječma skupljeni su u klas. Klas ječma građen je od koljenastog klasnog vretena i klasića s usjecima, u kojima su smješteni klasići. Klasići su građeni od dvije slabo razvijene pljeve (lat. *glumae*) i cvijeta koji u tučak i prašnike sadrži obuvence koje na vrhovima prelaze u osje (Slika 3). Osje ože biti zaoštreno ili tupo, a površina mu može biti glatka ili nazubljena. Za razliku od ostalih žitarica u usjeku klasnog vretena ječma može biti razvijen jedan, dva ili tri klasića. Ako se u usijeku klasno vretena razvije jedan klasić, tada će nastati jedan red s jedne i jedan red s druge strane klasa (dvoredni ječam). Ako se u usjeku razviju sva tri klasića, tada postoje tri reda s jedne i tri reda s druge strane klasa (šestoredni ječam). Zrno ječma građeno je kao i u ostalih žitarica. Pljevice su srasle sa zrnom, iako postoje kultivari s golim zrnom (Web 1 i 2).



Slika 3: Usporedba klasa ječma u 3 različita stadija razvoja i prikazi dijelova cvijeta i ploda ječma (Web 3)

1.5. Rast i razvoj ječma

Ječam ima ozime, jare i prijelazne forme te najkraću vegetaciju od svih žitarica. Vegetacijsko razdoblje jarog ječma traje 55-130 dana, a ozimog 240-260 dana te uvelike ovisi o kultivaru, vremenu sjetve i klimatskim uvjetima. Ječam ima brži porat od pšenice, širi list i veću lisnu masu te bolje busa. Kod ječma se razlikuju tri izražene faze rasta: vegetativnu fazu, reproduktivnu fazu i fazu nalijevanja zrna (Slika 4). Vegetativna faza uključuje klijanje sjemena, busanje i vlatanje izdanka. Završava inicijacijom cvjetnih primordija. Prvi listovi se pojavljuju brzo nakon klijanja (Slika 4, a). Busanje počinje pojavom prvih vlati u pazušcu lista na glavnoj stabljici (Slika 4, b). Početna stabljika nastaje iz koleoptila, ali nije uvijek prisutna. Sekundarne stabljike rastu iz lateralnih pupova prve stabljike, a može ih biti dvije do pet (Slika 4, c). Busanje kod jarog ječma nastupa 18-20 dana poslije nicanja, a kod ozimog u našim uvjetima kada izbije treći list, najčešće 3 tjedna nakon nicanja. Vlatanje nastupa 25 do 35 dana poslije nicanja. Vanjskom odlikom vlatanja smatra se pojava malog čvora na glavnoj stabljici, koji se može osjetiti po prstima. Klasanje kod jarog ječma počinje 30 do 74 dana nakon nicanja, našim uvjetima 35 do 77 dana. Cvatnja i oplodnja jarog ječma obično se odvija još prije klasanja dok se klas još nalazi u lisnom rukavcu budući da je ječam samooplodna biljka.



Slika 4: Fotografije habitusa ječma u različitim fazama razvoja. A) Prvi tjedan nakon nicanja, B) Treći tjedan nakon nicanja, C) Peti tjedan, D) Sedmi tjedan, E) Deveti tjedan, F) Deseti tjedan, G) Jedanaesti tjedan, H) Četrnaesti tjedan, I) Sedamnaesti tjedan (Web 4)

Razdoblje od klasanja do zriobe u našim uvjetima za jari ječam iznosi 22 do 55 dana, a za ozimi 34 do 43 dana. Faza nalijevanja zrna se može podijeliti u dva stadija. Mliječna zrioba nastupa 12-15 dana nakon cvatnje. Biljke su u tom razdoblju još zelene i tek donji listovi počinju žutiti. Voštana zrioba nastupa 30 do 35 dana od početka klasanja, a biljke poprimaju žutu boju (Slika 4, h). Puna zrioba nastupa kada zrno postaje tvrdo, a vegetativni dijelovi biljke se počnu sušiti i odumirati (Slika 4, i) (Web 1 i 2).

1.6. Cilj rada

Budući da fruktani imaju bitnu ulogu u biljkama i mogu biti vrlo korisni za čovjeka cilj ovog rada je bio:

1. Istražiti sadržaj fruktana u stabljikama ječma i uočiti promjene u različitim razvojnim fazama kod različitih kultivara ječma.
2. Istražiti sadržaj ukupnih topljivih šećera u različitim razvojnim fazama ječma kod različitih kultivara, te usporediti dobivene koncentracije šećera u stabljikama i listovima ječma.

2. Materijali i metode

2.1. Biljni materijal i uzorkovanje

U istraživanju je uzorkovano deset kultivara ozimog ječma iz oplemenjivačke kolekcije Poljoprivrednog instituta Osijek. Biljni materijal uzorkovan je tijekom jedne vegetacijske sezone 2018. u tri razvojne faze: vlatanje, cvatnja i nalijevanje zrna. Kultivari su posijani na parcelicama veličine 7,56 m^2 s normom sjetve od 450 zrna/m^2, a parcelice su bile raspoređene prema slučajnom blok rasporedu u tri ponavljanja. Na pokusnim poljima u Osijeku tlo je dobre plodnosti 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 .

Listovi zastavičari su odvojeni od stabljike, a stabljikama su uklonjeni ovojni listovi. Tkivo je smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na -80°C.
Prije analize uzorci listova i stabljika usitnjeni su u prah u tekućem dušiku koristeći tučak i tarionik i osušeni u sušioniku na 60°C tijekom 48 sati do konstantne mase.

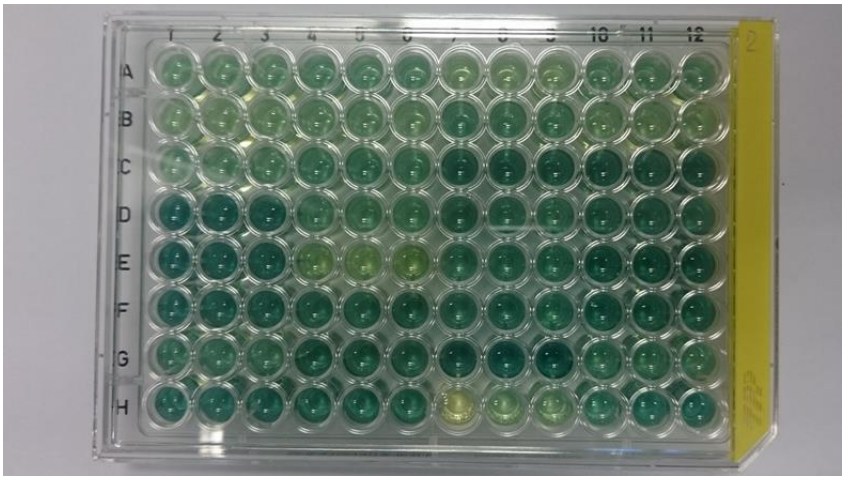
2.2. Ekstrakcija ukupnih topljivih šećera

U plastične označene tubice odvagano je 20 mg prethodno osušenog tkiva stabljike i 10 mg tkiva lista zastavičara. U njih je potom dodano 4 mL acetona, te su promiješane na vrtložnoj miješalici i stavljene na inkubaciju u hladnjak na 4° C preko noći. Nakon inkubacije tubice su ponovno promiješane i stavljene 10 minuta u centrifugu na 3000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja, iz tubica se bacao supernatant, a cijeli postupak je ponovljen još jedanput, ali s inkubacijom od 15 minuta na 4° C. U tubice je potom dodano 4 mL 80% etilnog alkohola nakon čega su tubice promiješane i stavljene na inkubaciju 30 minuta u vodenoj kupelji na 80° C. Nakon inkubacije tubice su bile ponovno promiješane i stavljene na centrifugiranje na 3000 okretaja u minuti 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatanti su odvojeni u nove označene tubice. U tubice s uzorcima je ponovno dodano 4 mL 80% etilnog alkohola i ponovljen je prethodni postupak, a dobiveni supernatant je spojen s prvim. Potom je iz tubica sa supernatantima uzeto 200 µL uzorka i stavljeno u označene epice koje su zatim uparavane u vodenoj kupelji na 80° C sve dok nije isparila sva tekućina iz njih. U tubice je nakon toga dodano 200 µL ultra čiste vode.

2.3. Mjerenje sadržaja ukupnih topljivih šećera

Za mjerenje sadržaja ukupnih topljivih šećera korištene se mikrotitarske pločice s 96 bunarića (Slika 5) u koje je dodano 10 µL prethodno ekstrahiranog uzoraka stabljike i 90 µL destilirane vode, a 100 µL prethodno ekstrahiranog uzoraka listova.

Sadržaj ukupnih topljivih šećera korištene izračunat je iz standardne krivulje koje je pripremljena koristeći otopinu glukoze (1 mg/mL) u destiliranoj vodi. Standardi su pripremljeni pipetirajući 0, 2, 4, 6, 8 i 10 µL glukoze nakon čega je dodano destilirane vode do ukupnog volumena od 100 µL. Na uzorke i standarde dodano je 200 µL antron reagensa koncentracije 2 mg/mL otopljenog u 95% sulfatnoj kiselini. Pločice su potom zagrijavane 30 minuta na 80° C nakon čega su ohlađene na sobnu temperaturu. Koncentracije šećera su zatim izmjerene na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan) na valnoj duljini od 625 nm (Foster i sur. 2010).



Slika 5: Mikrotitarska pločica s uzorcima korištena za mjerenje sadržaja ukupnih topljivih šećera (Fotografirao: M. Škoro)

2.4. Ekstrakcija fruktana topljivih u vodi

Za potrebe mjerenja sadržaja fruktana bilo je potrebno izvagati po 50 mg tkiva stabljike prethodno ekstrahiranog i osušenog. Tkivo je ekstrahirano acetonom nakon čega su uslijedile četiri ekstrakcije 80% etilnim alkoholom na 80°C kako je opisano u prethodnom poglavlju. Tkivo se sušilo preko noći na 60°C. Na ekstrahirano i osušeno tkivo dodano je 2 mL destilirane vode, tubice su zatim su bile promiješane na vrtložnoj miješalici i stavljene 10 na inkubaciju u vodenu kupelj na 90° C. Nakon inkubacije, tubice su ponovno bile promiješane na vrtložnoj miješalici i potom stavljene 10 minuta u centrifugu na 3000 okretaja po minuti. Poslije centrifugiranja se uzimao supernatant koji je sipan u nove tubice. Na talog je dodano 7 mL destilirane vode, uzorci su promiješani i stavljeni na inkubaciju u vodenu kupelj na 30 minuta. Nakon toga, tubice su prije centrifugiranja promiješane i stavljene 10 minuta u centrifugu na 3000 okretaja po minuti. Dobiveni supernatant je dodan onom iz prvog koraka, a tubice sa supernatantima su dopunjene destiliranom vodom do volumena od 10 mL.

2.5. Mjerenje sadržaja fruktana

Reakcijska smjesa za mjerenje sadržaja fruktana sadržavala je 1 mL uzorka, 500 µL resorcinol reagensa (Ashwell 1957) i 3,5 mL 30% klorovodične kiseline (HCl). Resorcinol reagens pripremljen je otapanjem 1 g resorcinola i 0,25 g tiouree u 100 mL ledene octene kiseline. Tubice s uzorcima su promiješane i stavljene 30 minuta na inkubaciju u vodenu kupelj na 80° C. Nakon inkubacije, uzorci su stavljeni na led da se ohlade na sobnu temperaturu prije mjerenja. Sadržaj fruktana u uzorcima mjerio se u plastičnim kivetama spektrofotometrijski očitavanjem apsorbance na valnoj duljini od 520 nm. Za izradu standardne krivulje korištena je otopina fruktoze koncentracije 1 mg/mL. Sadržaj fruktana izražen kao ekvivalent µg fruktoze po g suhe tvari.

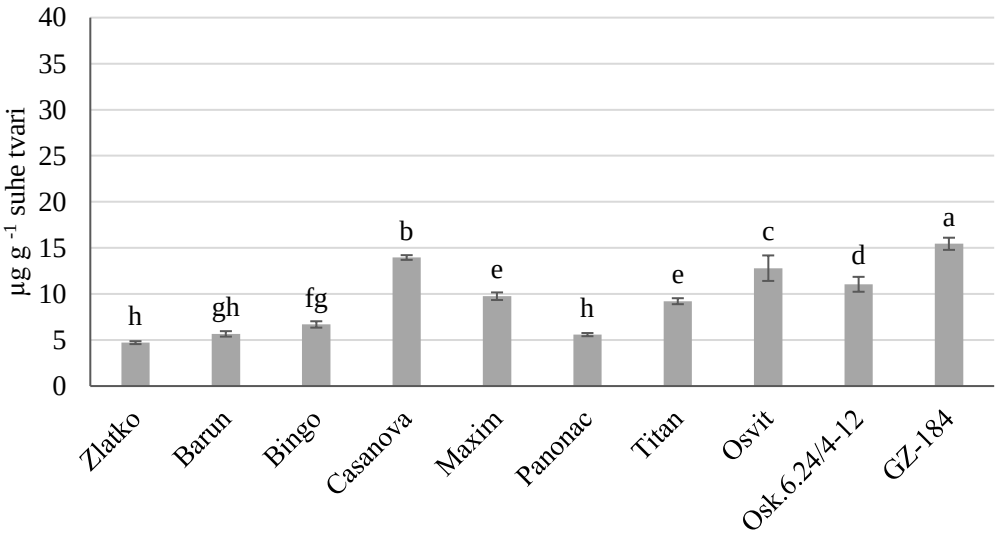
2.6. Statistička obrada podataka

Podaci su analizirani koristeći analizu varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) s testom statističke značajnosti Fisher's LSD test (engl. *least significant difference*). Statističke analize izvedene su pomoću računalnog programa Statistica 13.4. (TIBCO Software Inc 2019).

3. Rezultati

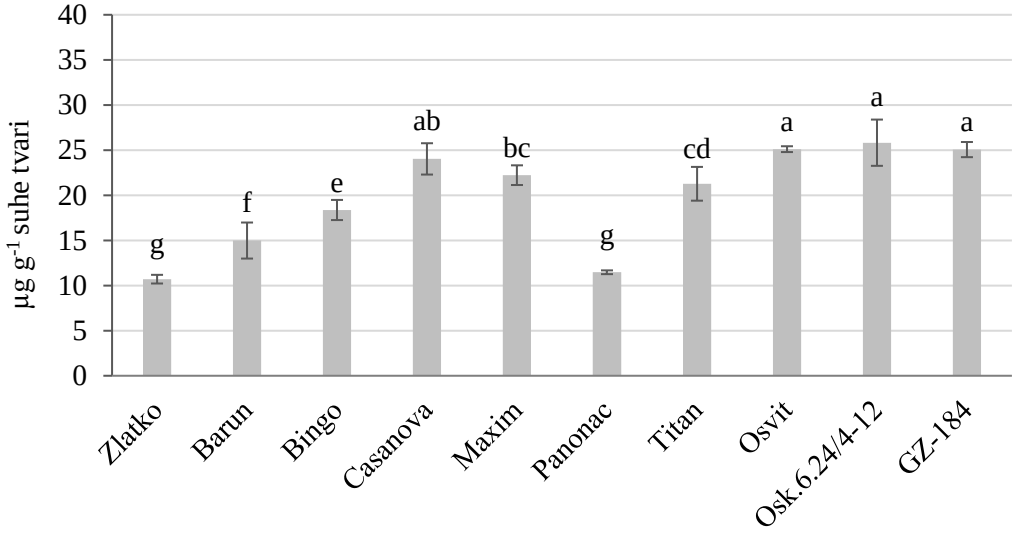
3.1. Sadržaj ukupnih topljivih šećera u stabljici različitih kultivara ozimog ječma

Mjerenjem koncentracije ukupnih topljivih šećera u stabljici ječma u fazi vlatanja (Slika 6) utvrđeno je da je ona najveća kod kultivara GZ-184. Visoka koncentracija šećera izmjerena je i kod kultivara Casanova i Osvit. Kod kultivara Maxim i Titan su bile izmjerene podjednake koncentracije šećera. Najniže koncentracije šećera imali su kultivari Panonac i Zlatko.



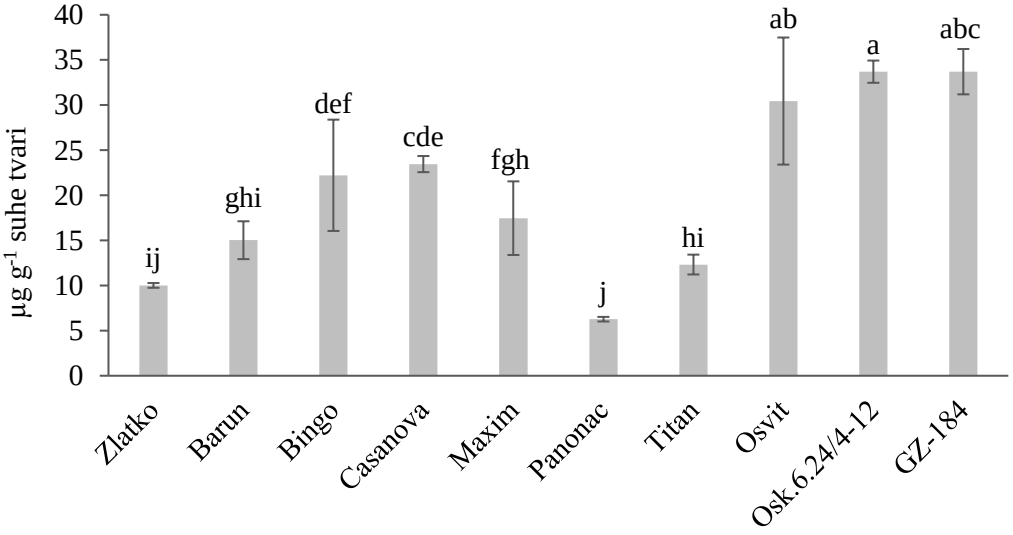
Slika 6: Koncentracija ukupnih topljivih šećera u stabljici ozimog ječma u fazi vlatanja. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

Koncentracija topljivih šećera u stabljici ječma u fazi cvatnje (Slika 7) najveća je bila u kultivarima Osk.6.24/4-12, Osvit te GZ-184. Visoka koncentracija izmjerena je i u kultivarima Casanova, Maxim i Titan. Najmanje koncentracije ukupnih topljivih šećere izmjerene su u kultivarima Zlatko i Panonac.



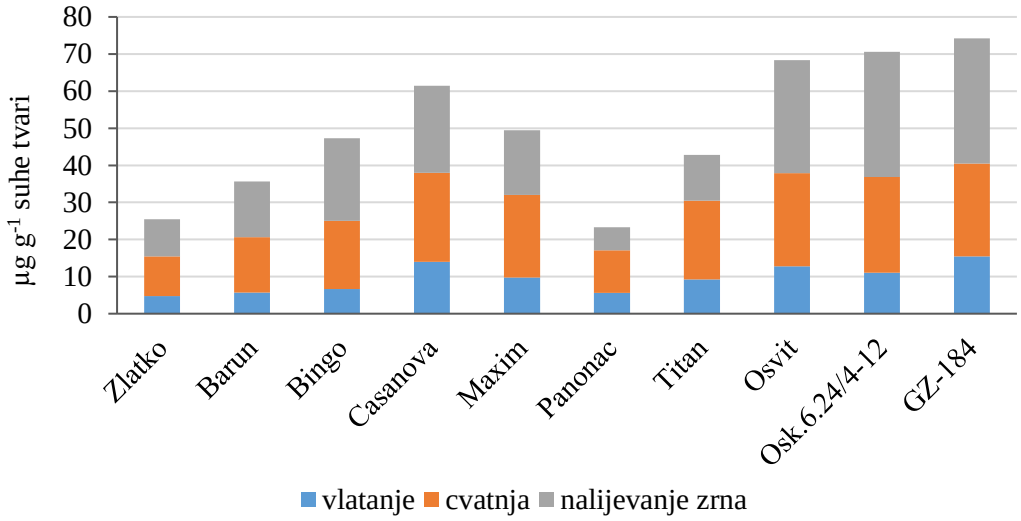
Slika 7: Koncentracije ukupnih topljivih šećera u stabljici ozimog ječma u fazi cvatnje. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

U fazi nalijevanja zrna (Slika 8) najveće koncentracije topljivih šećera u stabljikama ozimog ječma izmjerene su u kultivarima Osk.6.24/4-12, Osvit i GZ-184. Najmanje šećera izmjereno je u kultivarima Titan, Zlatko te posebno kod Panonca.



Slika 8: Koncentracije ukupnih topljivih šećera u stabljici ozimog ječma u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

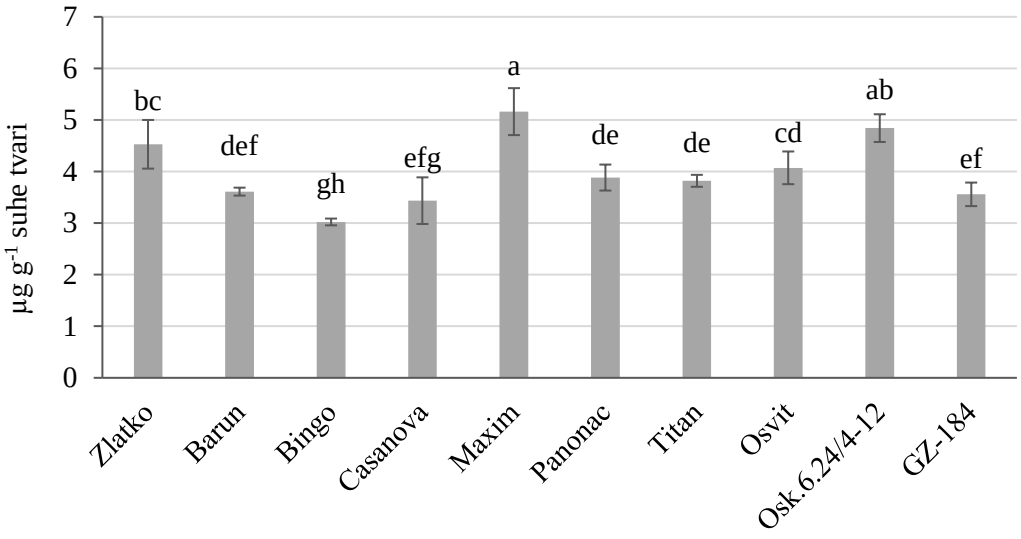
Usporedbom izmjerenih koncentracija šećera u 3 razvojne faze kod odabranih kultivara ječma (Slika 9) može se zaključiti da je u fazi vlatanja koncentracija ukupnih topljivih šećera u stabljikama najmanja u odnosu na ostale dvije razvojne faze. U fazama cvatnje i nalijevanja zrna razlike u koncentraciji šećera su manje izražene.



Slika 9: Usporedba koncentracija ukupnih topljivih šećera u stabljikama kultivara ozimog ječma u različitim fazama razvoja. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti.

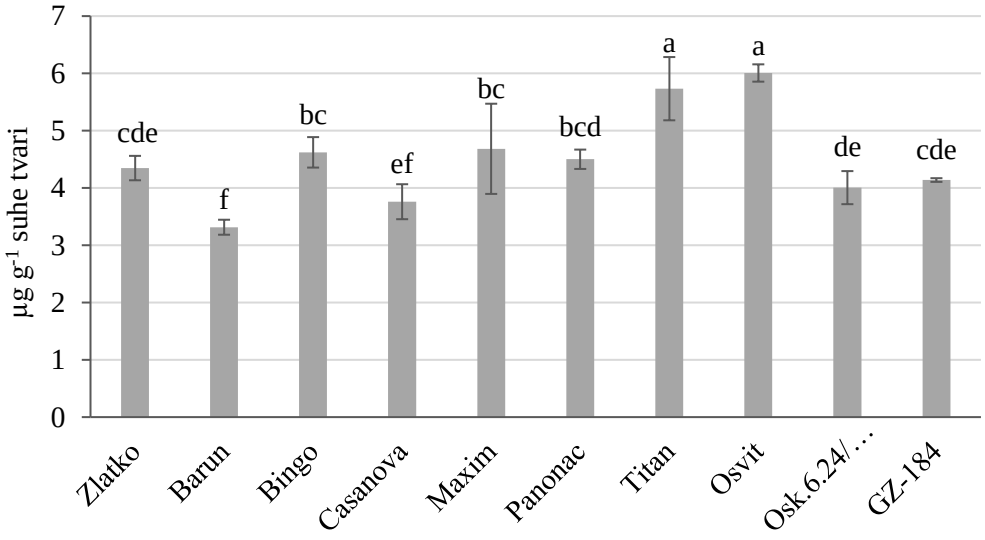
3.2. Sadržaj ukupnih topljivih šećera u listovima različitih kultivara ozimog ječma

Mjerenjem koncentracija ukupnih topljivih šećera u listovima ozimog ječma u fazi vlatanja (Slika 10) utvrđeno je da najviše šećera imao kultivar Maxim s preko 5 mg/g suhe tvari. Također, visokom koncentracijom isticali su se i kultivari Osk.6.24/4-12 i Zlatko. Sličnim sadržajem šećera isticali su se kultivari Panonac i Titan i GZ-184. Najmanja koncentracija šećera bila je izmjerena u kultivarima Casanova i Bingo.



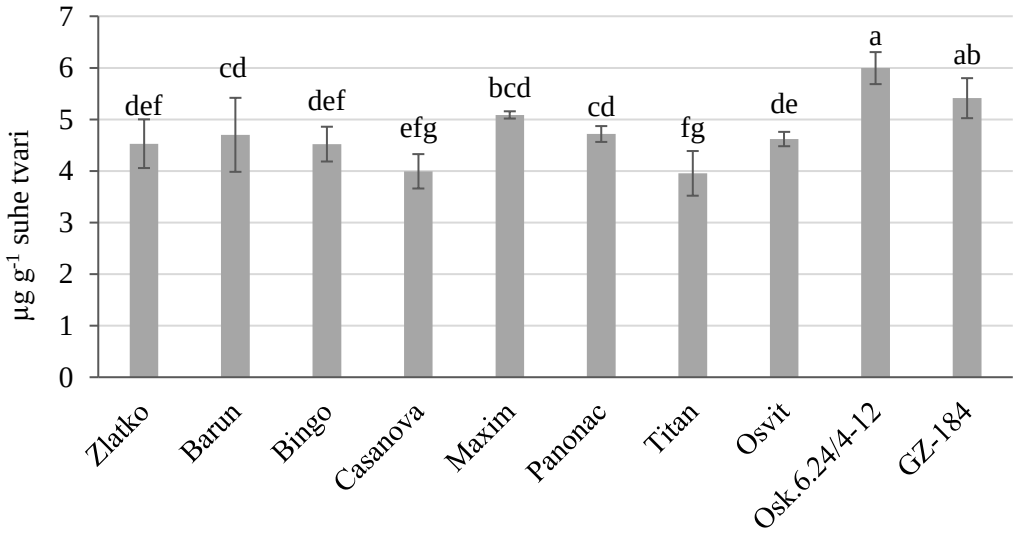
Slika 10: Koncentracije ukupnih topljivih šećera u listovima ozimog ječma u fazi vlatanja. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

U fazi cvatnje (Slika 11) u listovima ozimog ječma najveću koncentraciju šećera imali su kultivari Osvit i Titan. Sličnim prema sadržaju šećera u listovima pokazali su se kultivari Bingo i Maxim te Zlatko i GZ-184. Najnižu razinu šećera imali su kultivari Casanova i Barun.



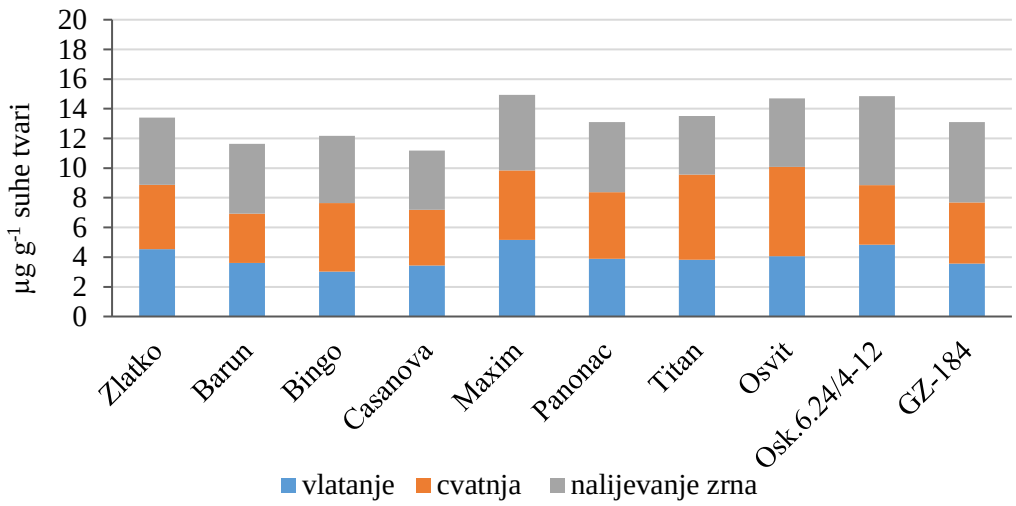
Slika 11: Koncentracije ukupnih topljivih šećera u listovima ozimog ječma u fazi cvatnje. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

Mjerenjem koncentracija ukupnih topljivih šećera u listovima ozimog ječma u fazi nalijevanja zrna (Slika 12) utvrđeno je da je najveću koncentraciju imao kultivar Osk.6.24/4-12. Uz njega, visoku koncentraciju šećera imali su i kultivari GZ-184 i Maxim. Kultivari Barun i Panonac su imali slične razine šećera, kao i kultivari Zlatko i Bingo. U fazi nalijevanja zrna najmanje koncentracije šećera u listovima izmjerene su kod kultivara Casanova i Titan.



Slika 12: Koncentracije ukupnih topljivih šećera u listovima ozimog ječma u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

Usporedbom izmjerenih koncentracija ukupnih topljivih šećera u listovima izabranih kultivara ječma po fazama razvoja (Slika 13) pokazalo se da kod kultivara Zlatko, Casanova i Maxim ne postoje statistički značajne razlike u sadržaju šećera u različitim razvojnim fazama. Kod kultivara Barun u fazama vlatanja i cvatnje nije bilo značajne razlike u koncentraciji šećera u listovima, dok je u fazi nalijevanja zrna bilo izmjereno značajno više šećera nego u prethodne dvije faze.

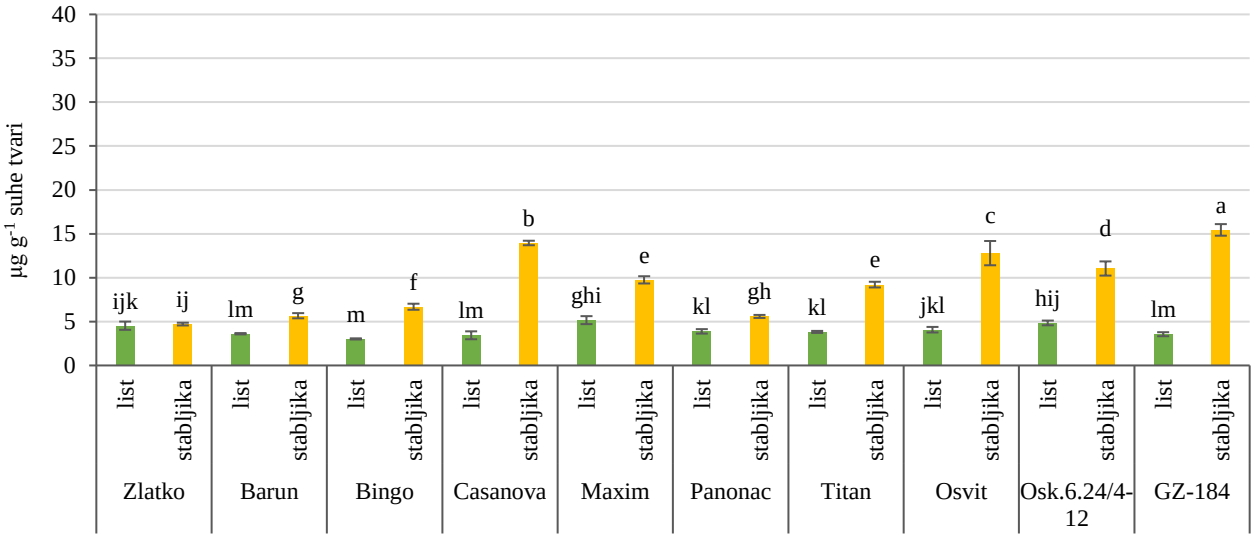


Slika 13: Usporedba koncentracija ukupnih topljivih šećera u listovima kultivara ozimog ječma u različitim fazama razvoja. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti.

Kod kultivara Bingo faza vlatanja se značajno razlikuje sadržajem šećera od faza cvatnje i nalijevanja zrna, kod kojih nema statistički značajne razlike. Kod kultivara Osvit, pak, izmjerene koncentracije šećera u listovima statistički su se razlikovale u sve tri razvojne faze ječma.

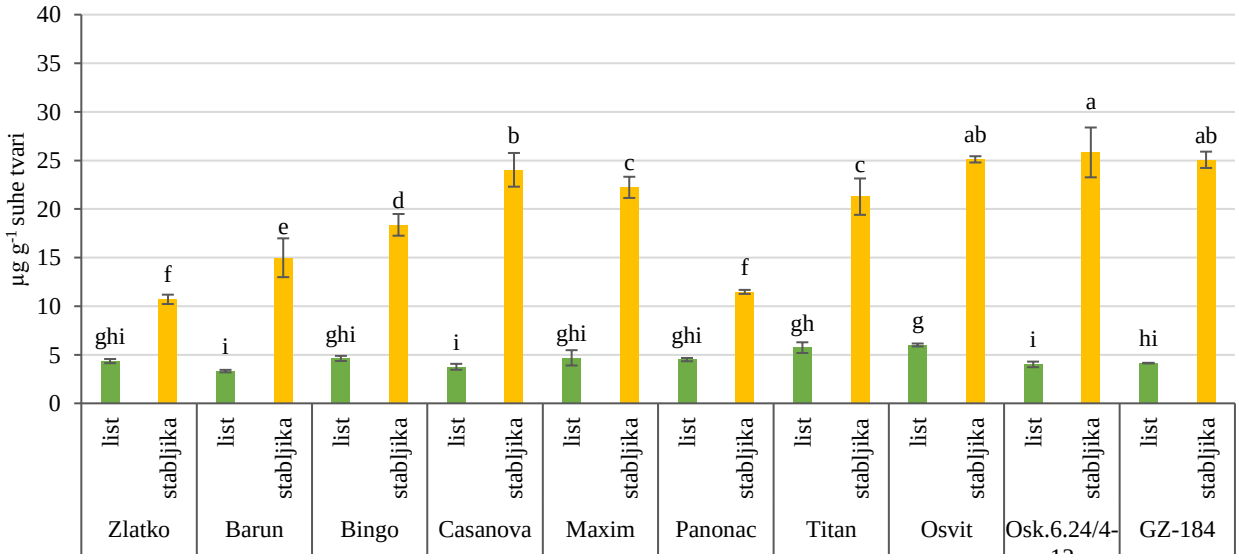
3.3. Usporedba sadržaja ukupnih topljivih šećera u listovima i stabljikama

U fazi vlatanja (Slika 14) najveće razlike u koncentraciji ukupnih topljivih šećera u stabljikama i listovima izmjerene su kod kultivara GZ-184, Casanova, Osvit, Osk.6.24/4-12, Maxim te Titan. Kultivari Bingo, Barun i Panonac su imali manje izražene razlike u koncentracijama šećera, dok kod kultivara Zlatko nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama šećera u listovima i stabljikama.



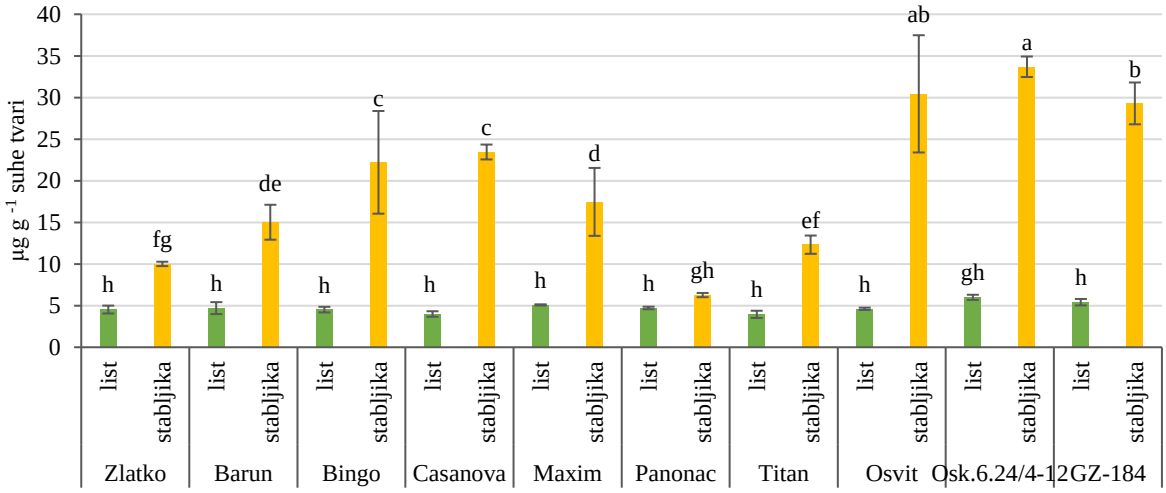
Slika 14: Usporedba sadržaja ukupnih topljivih šećera u listovima i stabljikama kultivara ozimog ječma u fazi vlatanja. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa (p≤0,05).

U fazi cvatnje (Slika 15) najveće razlike u koncentracijama šećera u listovima i stabljikama su bile u kultivarima Osk.6-24/4-12, GZ-184, Osvit, Casanova, Titan, Maxim i Bingo. Statistički značajne razlike u koncentracijama ukupnih topljivih šećera u stabljikama i listovima izmjerene su i u kultivaru Barun, dok je najmanja razlika izmjerena u kultivarima Panonac i Zlatko.



Slika 15: Usporedba sadržaja ukupnih topljivih šećera u listovima i stabljikama kultivara ozimog ječma u fazi cvatnje. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa (p≤0,05).

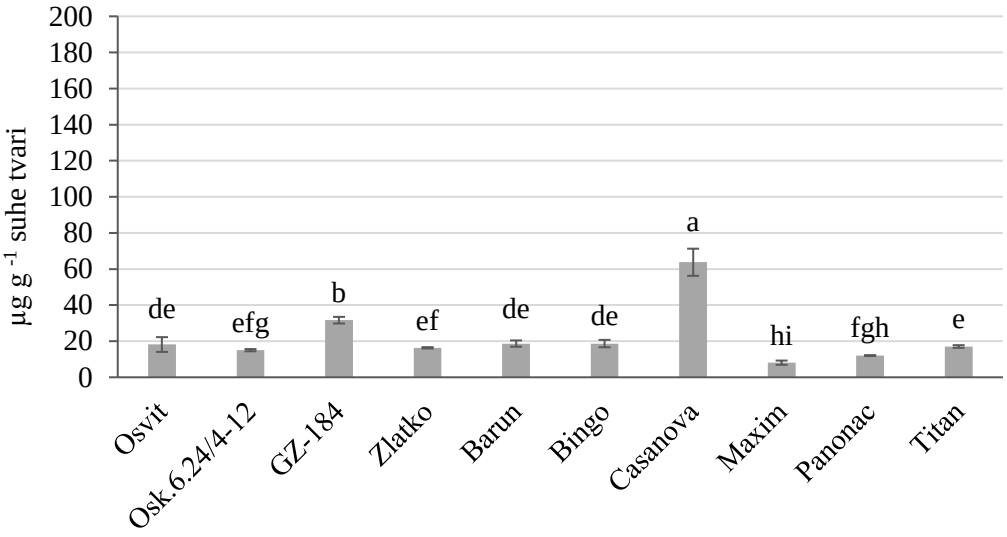
U fazi nalijevanja zrna (Slika 16) najveće razlike u koncentraciji šećera izmjerene su kod kultivara Osk.6.24/4-12, Osvit i GZ-184. Izražene razlike izmjerene su i kod kultivara Casanova, Bingo, Maxim i Barun. Najmanje razlike u koncentraciji ukupnih topljivih šećera izmjerene su kod kultivara Zlatko i Titan, dok kod kultivara Panonac nisu uočene značajne razlike u koncentracijama šećera.



Slika 16: Usporedba sadržaja ukupnih topljivih šećera u listovima i stabljikama kultivara ozimog ječma u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

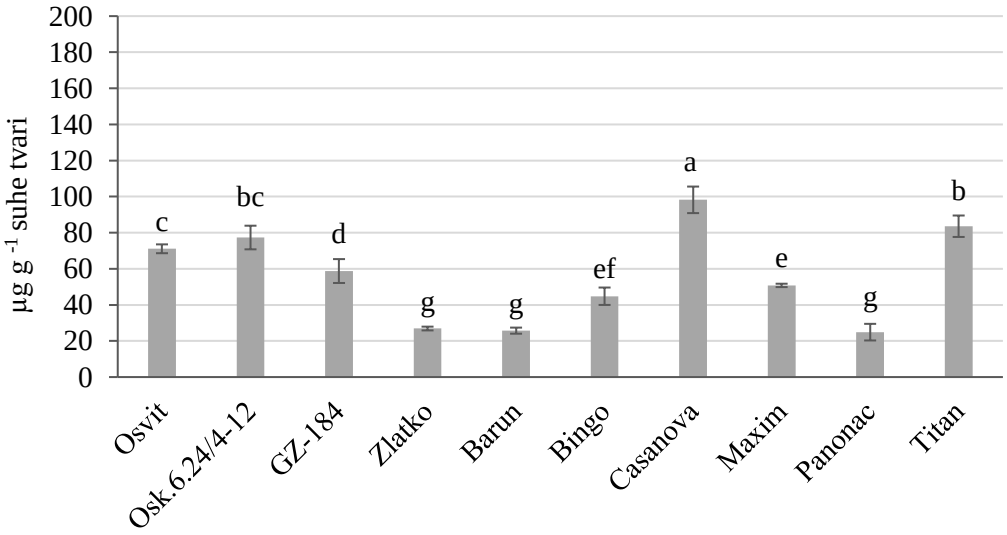
3.4. Sadržaj fruktana u različitim kultivarima ozimog ječma

U fazi vlatanja (Slika 17) najveći sadržaj fruktana je bio izmjeren u kultivaru Casanova i iznosio je oko 64 µg/g suhe tvari, dok je najmanje fruktana izmjereno u kultivarima Panonac i Maxim. Veće koncentracije fruktana izmjerene su kod kultivara GZ-184. Slične koncentracije fruktana izmjerene su u kultivarima Osvit, Barun i Bingo.



Slika 17: Koncentracije fruktana u različitim kultivarima ozimog ječma u fazi vlatanja. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

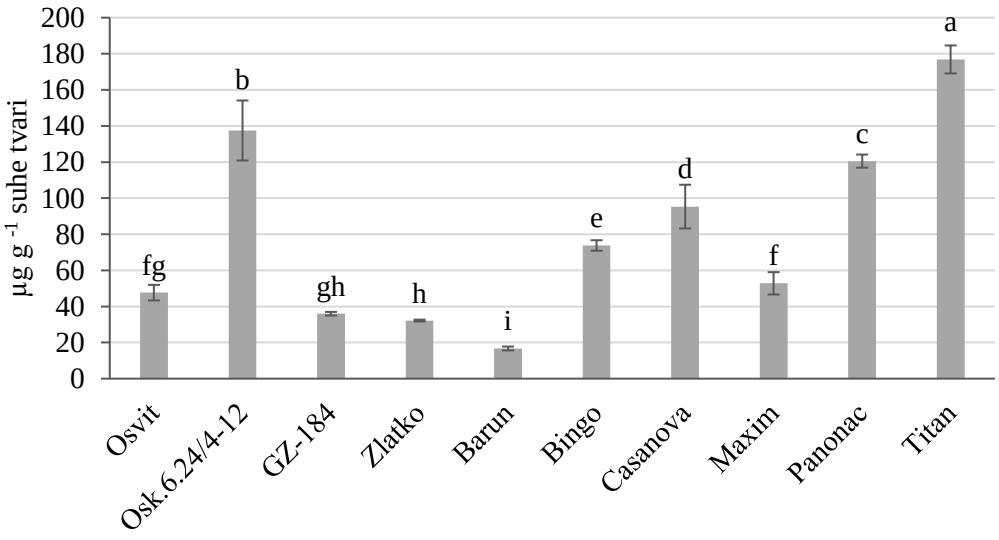
U fazi cvatnje (Slika 18) najveću koncentraciju fruktana u stabljici je ponovno imao kultivar Casanova, koja je iznosila gotovo 100 µg/mg suhe tvari. Visokom koncentracijom fruktana ističe se i kultivar Titan kod kojega je izmjereno nešto više od 80 µg/mg suhe tvari.



Slika 18: Koncentracije fruktana u različitim kultivarima ozimog ječma u fazi cvatnje. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

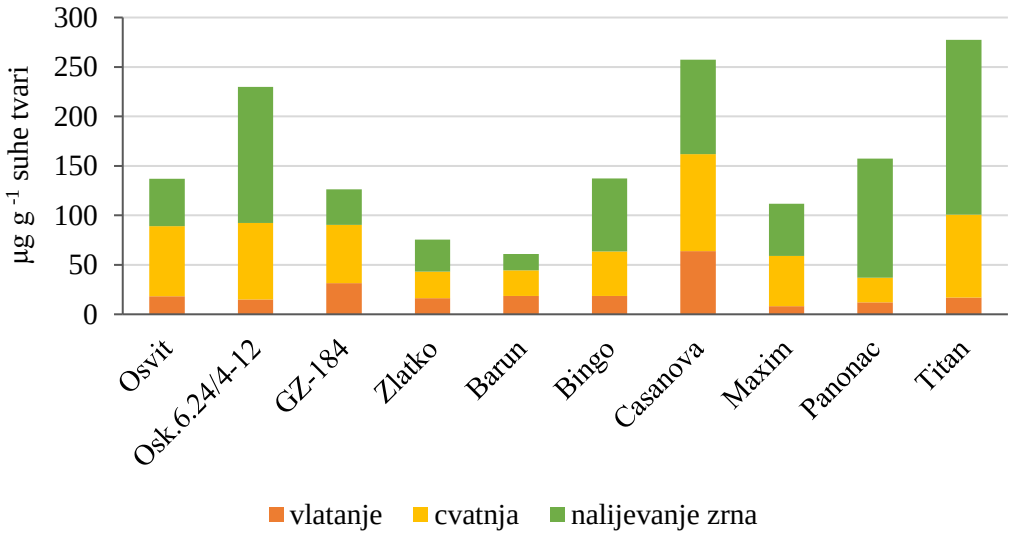
Također se visokim sadržajem fruktana ističu i kultivari Osk.6.24/4-12, Osvit i GZ-184. Kao kultivari s najmanjom koncentracijom fruktana ističu se Zlatko, Barun te Panonac.

U fazi nalijevanja zrna (Slika 19) najveće koncentracije fruktana imao je kultivar Titan s oko 180 μg fruktana/mg suhe tvari. Visokom izmjerenom koncentracijom fruktana ističu se i kultivari Osk.6.24/4-12 i Panonac, oba s preko 100 μg fruktana/mg suhe tvari. Kultivari u kojima je izmjereno više od 50 μg fruktana/mg suhe tvari su Casanova i Bingo. Najmanje fruktana izmjereno je u kultivaru Barun s tek oko 17 μg fruktana/mg suhe tvari.



Slika 19: Koncentracije fruktana u različitim kultivarima ozimog ječma u fazi nalijevanja zrna. Rezultati su prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

Usporedbom sadržaja fruktana kod različitih kultivara u 3 razvojne faze može se zaključiti da su ukupno najveću koncentraciju fruktana imali kultivari Titan, Casanova i Osk.6.24/4-12. Kod Titana i Osk.6.24/4-12 količina fruktana u fazi vlatanja je bila mnogo manja od onih u fazama cvatnje i nalijevanja zrna, dok je kod Casanove ona u fazi vlatanja bila nešto veća. Općenito gledano, kod svih ispitanih kultivara koncentracija fruktana je bila najmanja u fazi vlatanja. Tijekom razvoja, u fazi cvatnje, najviše fruktana imali su kultivari Osvit i GZ-184. U fazi nalijevanja, najviše fruktana tijekom razvoja imali su kultivari Bingo, Osk.6.24/4-12 i Panonac. Najmanje ukupno izmjerenih fruktana imali su kultivari Maxim, Zlatko i Bingo.



Slika 20: Usporedba koncentracija fruktana u stabljikama kultivara ozimog ječma u različitim fazama razvoja. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti.

4. Rasprava

Ugljikohidrati topljivi u vodi u žitaricama umjerenog pojasa, poput pšenice, ječma, zobi i riže, većinom su sastavljeni od saharoze, glukoze, fruktoze i fruktana. Oni se nakupljaju u stabljikama i lisnim ovojima žitarica u periodu od rasta stabljike do ranih faza nalijevanja zrna i služe kao privremena zaliha ugljikohidrata (Blum, 1998). Kada zalihe asimilata dobivenih fotosintezom nadmašuju potrebe za rast kod žitarica, fiksirani ugljik može biti usmjeren prema sintezi fruktana. Topljivi šećeri, koje većinom čine fruktani, u stabljikama žitarica u fazi vrhunca njihove akumulacije mogu činiti više od 40% suhe tvari stabljike (Blacklow i sur. 1984). Tako stvorene zalihe fruktana mogu se remobilizirati kada potreba za tim asimilatima nadmašuje stvarnu zalihu nastalu fotosintezom, što je često slučaj tijekom rasta u ranim fazama razvoja, ponovnog rasta uslijed košnje te tijekom faze nalijevanja zrna (Wagner i sur. 1983).

Nalijevanje zrna kod žitarica ovisi o dva glavna izvora ugljika, trenutačnoj fotosintezi u listovima i mobilizaciji spremljenih topljivih ugljikohidrata iz stabljika u rastuća zrna. Mobilizirane zalihe topljivih šećera i fruktana u normalnim uvjetima mogu doprinositi do 20 % ukupnom prinosu zrna žitarica (Wardlaw i Willenbrink, 2000). U slučajevima kada stres, poput zasjenjenja, suše i zagrijavanja eliminira fotosintetski izvor, nalijevanje zrna postaje još ovisnije o mobiliziranim izvorima (Ehdaie i sur. 2008). Uslijed stresa izazvanog sušom, biljke su sposobne ograničiti gubitak vode zatvaranjem puči. Smanjenje provodnosti puči ne smanjuje samo gubitak vode isparavanjem, već onemogućuje ulazak ugljikovog dioksida te posljedično reducira fiksaciju ugljika i inhibira aktivnost fotosintetskih enzima i regeneraciju, što pak utječe na metabolički ekvilibrij ugljikohidrata (Méndez i sur. 2011). U uvjetima terminalog stresa izazvanog sušom topljivi šećeri iz stabljika mogu potencijalno imati i više od 50% doprinosa prinosu zrna (Brooks i sur. 1982).

U ovom istraživanju proučavan je sadržaj fruktana u stabljikama 10 kultivara ječma tijekom 3 razvojne faze: vlatanje, cvatnja i nalijevanje zrna, kao i sadržaj ukupnih topljivih šećera u stabljikama i listovima ječma u navedene tri razvojne faze. Zabilježena je različita akumulacija ukupnih topljivih šećera u istraživanim kultivarima. Kod svih kultivara je zabilježeno značajno povećanje u sadržaju šećera u fazi cvatnje u odnosu na fazu vlatanja. U fazi nalijevanja zrna, kod kultivara ″GZ-184″, ″Osk.6.24/4-12″ i ″Osvit″ izmjeren je veći sadržaj topljivih šećera nego u fazi cvatnje. Kultivari ″Titan″, ″Panonac″, ″Maxim″ i ″Zlatko″ imali su manje šećera nego u fazi cvatnje. Kod ostalih kultivara sadržaj šećera je bio

podjednak onom u fazi cvatnje. Uspoređujući sadržaj ukupnih topljivih šećera u listovima i stabljikama ječma kroz navedene razvojne faze također se mogu primijetiti promjene. U fazi vlatanja kod svih kultivara, osim Zlatka, izmjerene su značajno veće količine šećera u stabljikama u odnosu na listove, što upućuje na to da dolazi do njihovog nakupljanja i skladištenja u stabljikama. U fazi cvatnje ta akumulacija se još više povećava i dostiže maksimalne izmjerene vrijednosti, sada kod svih 10 istraživanih kultivara. U fazi nalijevanja zrna pak, uslijed remobilizacije asimilata za potrebe stvaranja i rasta zrna, dolazi do pada sadržaja šećera u stabljikama kod kultivara Panonac i Titan. Kod kultivara Panonac koncentracije šećera u stabljikama i listovima su gotovo jednake.

Biljke skladište višak ugljikohidrata u tkivima stabljike kako bi spriječile promjene u *″source-sink″* interakcijama tijekom različitih stadija rasta i u varirajućim okolišnim uvjetima (Asseng i Herwaarden, 2003). Ovo predstavlja primjer dugoročnog ″pufera″, za razliku od kratkotrajne uloge škroba i šećera u listovima koji variraju na dnevnoj bazi (Slewinski, 2012). Skladišne parenhimske stanice stabljika, koje okružuju žile, su usputni spremišni odjeljci koji bi teoretski kod nekih biljnih vrsta mogli biti kompeticijski *″sink″* uz put prema krajnjim *″sink″* organima poput korijena i sjemenki (Sadras i Denison, 2009). No, općenito gledano, ove rezerve ugljikohidrata nisu u kompeticiji s drugim *″sink″* tkivima u biljkama, nego vjerojatno skladište višak fotoasimilata tijekom perioda niske *″sink″* snage (Slafer, 2003).

Rezultati mjerenja sadržaja fruktana su stabljikama su pokazali značajne varijacije u pojedinim kultivarima. Nakupljanje fruktana započelo je kod svih 10 kultivara u fazi cvjetanja budući da dolazi do značajnog povećanja u koncentraciji fruktana u odnosu na fazu vlatanja, što je u suglasnosti s prijašnjim istraživanjima (Schnyder, 1993; Housley, 2000). Najviše fruktana bilo je izmjereno u kultivarima ″Casanova″ (98 μg g^{-1} suhe tvari) i ″Titan″ (84 μg g^{-1} suhe tvari). Značajni porast koncentracije fruktana u fazi nalijevanja zrna, u odnosu na fazu cvatnje, uočen je kod 4 kultivara (″Titan″, ″Panonac″, ″Bingo″ i ″Osk.6.24/4-12″), dok su kod ostalih kultivara razine fruktana podjednake ili manje u odnosu na one u fazi cvatnje. Najviše fruktana u fazi nalijevanja zrna izmjereno je kod kultivara ″Titan″ (177 μg g^{-1} suhe tvari) i ″Osk.6.24/4-12″ (137 μg g^{-1} suhe tvari). Značajni porast fruktana u fazi nalijevanja zrna upućuje na potencijalnu osjetljivost pojedinih kultivara na stresne uvjete, poput suše koja je česta pojava u tom razdoblju rasta.

Akumulacija fruktana kod ječma i pšenice ovisi o okolišnim i genetičkim faktorima. Okolišni uvjeti koji smanjuju trenutnu asimilaciju tijekom nalijevanja zrna uzrokuju veće potrebe za rezervama u stabljici za nalijevanje zrna. Zasjenjivanje listova ječma nakon cvatnje potiče upotrebu rezervi iz stabljike za nalijevanje zrna (Bonnet i Incoll, 1992). Mobilizacija rezervi iz stabljike također je pod utjecajem manjka vode tijekom nalijevanja zrna. Palta i suradnici (1994) otkrili su da je asimilacija nakon cvatnje bila smanjena za 57%, dok je remobilizacija rezervi bila povećana za 36% u uvjetima manjka vode. Goggin i Setter (2004) su u svom istraživanju na pšenici utvrdili da su stabljike biljaka koje su ovisile samo o atmosferskim padalinama imale 1,8 puta više ukupnih ugljikohidrata i 2,5 puta više fruktana u odnosu na biljke koje su bile navodnjavane. Sušni uvjeti tijekom nalijevanja zrna često uključuju i temperaturni stres, koji skraćuje trajanje nalijevanja zrna. U uvjetima visokih temperatura normalno dolazi do povećanja akumulacije suhe tvari zrna, no to nije dovoljno da bi nadomjestilo smanjenje trajanja samog punjenja zrna. Kada punjenje zrna u takvim uvjetima ovisi o remobilizaciji rezervi iz stabljike, stopa njihovog metaboliziranja i prijenosa u zrno postaje iznimno važna, iako ni ona ne može nadomjestiti redukciju nalijevanja zrna pri vrlo visokim temperaturama. Prema tome, genetički uvjetovano dulje nalijevanje zrna ovdje ima veću prednost (Blum i sur. 1994). Kraćim trajanjem nalijevanja može se izbjeći terminalni oblik stresa dok dulje trajanje nalijevanja omogućuje veće iskorištavanje rezervi iz stabljike.

Xue i sur. (2008) su, želeći otkriti molekularne i biokemijske mehanizme koji stoje iza genotipskih varijacija u sadržaju ukupnih topljivih šećera, proveli analize profiliranja transkripata i sadržaje završnih produkata kod rekombinantnih linija pšenice. Istraživanje je pokazalo da su visoke koncentracije topljivih šećera u stabljikama pšenice povezane s povišenim nakupljanjem fruktana, smanjenom hidrolizom saharoze te smanjenim udjelom ugljika u polisaharidima stanične stijenke. Ti podaci upućuju na potencijalno veliku snagu odljeva ugljika za skladištenje privremenih rezervi u stabljikama linija s visokim sadržajem topljivih šećera, što je pod utjecajem povećanih razina transkripata enzima za sintezu fruktana i smanjenom količinom ugljika koji sudjeluje u drugim metaboličkim putevima. Međutim, faktori koji vode do povećane ekspresije fruktozil transferaza su još uvijek nepoznati (Xue i sur. 2013). Genotipske varijacije u akumulaciji ugljikovih rezervi određene su relativnom dostupnošću ugljika i potrebama na razini cijele biljke. Akumulacija ugljikovih rezervi u biljkama može biti pod utjecajem *"sink"* snage, *"source"* snage ili oboje. Povećana razina sinteze fruktana u stabljikama može biti rezultat velike snage ugljika u

listovima koji opskrbljuju stabljiku saharozom ili genetičke odrednice neovisne o dostupnosti ugljika u izvoru (Xue i sur. 2013).

″Sink″ snaga se može opisati kao kompetitivna sposobnost organa da primi asimilate. Kapacitet te snage je produkt veličine i aktivnosti *″sinka″* (Warren-Wilson 1967). Potencijalnu snagu *″sinka″* određuju njegova fizička i fiziološka ograničenja. *″Sink″* veličina dio je fizičkog ograničenja, a *″sink″* aktivnost dio fiziološkog ograničenja kapaciteta unosa asimilata. Veličina *″sinka″* ovisi o broju stanica, pa bi jedan aspekt fizičkog ograničenja mogla biti genetička odrednica broja stanica (Ho, 1988). *″Sink″* aktivnost se sastoji od 3 važne fiziološke značajke: iskrcavanje asimilata iz floema (post floemski transport i preuzimanje od strane *″sink″* stanica), zatim iskorištavanje, uglavnom respiracijom, te spremanje unesenih ugljikohidrata. Prema tome, *″sink″* snaga može biti pod utjecajem različitih metaboličkih procesa te je proizvod višestrukih molekularnih odrednica (Herbers i Sonnewald, 1998).

Stopa hidrolize fruktana je još jedan faktor koji potencijalno može doprinijeti akumulaciji fruktana. Fruktani se hidroliziraju do fruktoze i saharoze enzimom fruktan 1-egzohidrolaza (1-FEH) ili fruktan 6-egzohidrolazom (6-FEH). Ekspresija gena za ove enzime značajno se povećava tijekom kasnijih faza sazrijevanja zrna, a istodobno dolazi do smanjenja koncentracije fruktana. Regulacija uzvodno ili nizvodno od gena uključenih u sintezu i hidrolizu saharoze može imati važnu ulogu u određivanju veličine zaliha ukupnih topljivih šećera i fruktana u internodijima stabljika (Khoshro i sur. 2014).

Daljnja istraživanja fruktana i topljivih šećera u ječmu i ostalim žitaricama nužna su za bolje razumijevanje njihova metabolizma u biljkama. Daljnje molekularne analize dale bi bolji uvid u regulaciju njihova metabolizma, što bi pak doprinijelo razvoju novih i poboljšavanju postojećih kultivara žitarica koji bi bili otporniji na stresne uvjete.

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Sadržaj ukupnih topljivih šećera u stabljici se mijenja razvojem biljaka i različit je kod različitih kultivara ječma
- Sadržaj ukupnih topljivih šećera u listovima je također različit kod različitih kultivara ječma, no njihove promjene su razvojem manje izražene
- Sadržaj fruktana u ječmu također ovisi o razvojnom stadiju biljke i njenom genotipu
- Kultivari Titan, Casanova i Osk.6.24/4-12 imali su najveći sadržaj fruktana, a kultivari Zlatko i Barun imali su najmanji u fazi cvatnje.

6. Literatura

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

Asseng S., Herwaarden, A. F. (2003) Analysis of the benefits to wheat yield from assimilates stored prior to grain filling in a range of environments. Plant and Soil 256:217–229.

Blacklow, W., Darbyshire, B., Pheloung, P. (1984) Fructans polymerised and depolymerised in the internodes of winter wheat as grain-filling progressed. Plant Science Letters 36: 213–218.

Blum, A. (1998) Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilization. Euphytica 100:77–83.

Blum, A., Sinmena B., Mayer, J., Golan, G., Shpiler, L. (1994) Stem reserve mobilisation supports wheat grain filling under heat stress. Aust J Plant Physiol 21:771-781.

Bonnett, G. D., Incoll, L. D. (1992). Effects on the stem of winter barley of manipulating the source and sink during grain filling: Changes in accumulation and loss of mass from internodes. J Exp Bot 44:75-82.

Brooks, A., Jenner, C. F., Aspinall, D. (1982) Effect of water deficit on endosperm starch granules and grain physiology of wheat and barley. Aust J Plant Physiol 9:423–436.

Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J., Spangenberg, G. (2005) Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. Plant Biotechnology Journal 3:459-474.

Ehdaie, B., Alloush, G. A., Waines, J. G. (2008) Genotypic variation in linear rate og grain growth and contribution of tem reserves to grain yield in wheat. Field Crop Research 106:36-43.

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.

Goggin, D. E., Setter, T. L. (2004) Fructosyltransferase activity and fructan accumulation during development in wheat exposed to terminal drought. Functional Plant Biology 31:11-21.

Henson, C. A., Livingston, D. P. (1996) Purification of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes β-2,6-fructans. Plant Physiol 110:639-644.

Herbers, K., Sonnewald, U. (1998) Molecular determinants of sink strength. Current Opinion in Plant Biology 1:207-216.

Ho, L. C. (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39:355-378.

Housley, T. L. (2000) Role of fructans redistributed from vegetative tissues in grain filling of wheat and barley. Developments in Crop Science 26:207-221.

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

Livingston, D. P., Hincha, D. K., Heyer, A. G. (2009) Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. Cell Mol Sci 66:2007-2023.

Marx, S. P., Nösberger, J., Frehner, M. (1997) Hydrolisis of fructan in grasses: a β-(2-6)-linkage specific fructan-β-fructosidase from stubble of *Lolium prenne*. New Phytol 135:279-290.

Méndez, A. M., Castillo, D., del Pozo, A., Matus, I., Morcuende, R. (2011) Differences in stem soluble carbohydrate contents among recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) of barley under drought in a Mediterranean-type Environment. Agronomy Research 9:433-438.

Olien, C. R., Lester, G. E. (1985) Freeze-induced changes in soluble carbohydrates of rye. Crop Sci 25:288-290.

Palta, J. A., Kobata, T., Turner, N. C., Fillery, I. R. (1994) Remobilisation of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. Crop Sci 34:118-124.

Pollock, C. J. (1986) Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phytol 104:1-24.

Pollock, C. J., Cairns, A. J. (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol 42:77-101.

Pontis HG (1989) Fructans and cold stress. J Plant Physiol 134:148–150.

Ritsema, T., Smeekens, S. (2003) Fructans: beneficial for plants and humans, Current Opinion in Plant Biology 6:223-230.

Sadras, V. O., Denison, R. F. (2009) Do plant parts compete for resources? An evolutionary viewpoint. New Phytologist 183:565–574.

Salinas, C., Handford, M., Pauly, M., Dupree, P., Cardemil, L. (2016) Strucutral modifications of fructans in *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) grown under water stress. PLoS ONE 11(7):e0159819.

Schynder, H. (1993) The role of carbohydrate storage and reditribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling – a review. New Phytol 123:233-245.

Simmen, U., Obenland, D., Boller, T., Wiemken A. (1993) Fructan synthesis in excised barley leaves. Identification of two sucrose-sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases. Plant Physiol 101: 459-468.

Slafer, G. A. (2003) Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. Annals of Applied Biology 142:117–128.

Suzuki, M., Nass, H. G. (1988) Fructan in winter wheat, triticale and fall rye cultivars of varying cold hardiness. Can J Bot 66:1723–1728.

Vijn, I., van Dijken, A., Sprenger, N., van Dun, K., Weisbeek, P., Wiemken, A., Smeekens, S. (1997) Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G fructosyltransferase. The Plant Journal 11(3): 387-398.

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

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

Wardlaw, I. F., Willenbrink, J. (2000) Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. New Phytol 148:413–422.

Warren-Wilson, J. (1967) Ecological data on dry-matter production by plants and plant communities. In The Collection and Processing of Field Dana 1967:77-123.

Wiemken, A., Frehner, M., Keller, F., Wagner, W. (1986) Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. Curr Top Plant Biochem Physiol 5:17-37.

Xue, G. P., McIntyre, C. L., Jenkins, C. L. D., Glassop, D., van Herwaarden, A.F., Shorter, R. (2008) Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat (*Triticum aestivam* L.). Plant Physiol 146:441–454.

Xue, G. P., Drenth, J., Glassop D., Kooiker, M., McIntyre, C. L. (2013) Dissecting the molecular basis of the contribution of source strength to high fructan accumulation in wheat. Plant Mol Biol 81:71-92.

Mrežne stranice

Web 1. ecoport.org. *Hordeum vulgare* L. (3. 3. 2019.)
http://ecoport.org/ep?Plant=1232&entityType=PL****&entityDisplayCategory=PL****0500#PL****0500

Web 2. www.bilje.hr. Ječam (3. 3. 2019.)
http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_1/HTM/jecam.htm

Web 3. Parts of barley spikes (3. 3. 2019.)
https://www.researchgate.net/figure/Parts-of-the-barley-spike-A-Spikes-at-pollination-left-early-grain-fi-lling_fig1_243132392

Web 4. University of Idaho. Barley growth stages (3. 3. 2019.)
https://www.uidaho.edu/extension/cereals/scseidaho/growstage/barley