

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Geni nove zelene revolucije
Genes of the new green revolution
Završni rad

Barbara Maračić
Preddiplomski studij Molekularne biologije
Undergraduate Study of Molecular biology
Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-
matematičkog fakulteta u Zagrebu,
pod voditeljstvom doc. dr. sc. Nenada Malenice.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Zelena revolucija.....	1
3. Geni odgovorni za zelenu revoluciju	3
3.1. Mehanizam djelovanja fitohormona giberelina.....	3
3.2. <i>Reduced height-1 (Rht-1)</i> gen pšenice (<i>Triticum aestivum</i>).....	5
3.3. <i>Semi-dwarf1 (SD-1)</i> gen riže (<i>Orzya sativa</i>).....	6
4.1. Prinos u ovisnosti o dušiku	8
4.2. Produžni rast u ovisnosti o dušiku.....	9
4.3. Efikasnost iskorištenja dostupnog dušika	9
5. Geni nove zelene revolucije.....	10
5.1. Gen <i>GRF4 (GROWTH-REGULATING FACTOR 4)</i>	10
5.1.1. Ekspresija GRF4 proteina utječe na efikasnost unosa dušika	10
5.1.2. Zastupljenost GRF4 proteina ovisi o dostupnom dušiku.....	12
5.1.3. Protein GRF4 promovira transkripciju gena odgovornih za asimilaciju dušika	12
5.1.4. Antagonistički odnos GRF4 i DELLA proteina te ovisnost o giberelinu.....	13
5.1.5. GRF4 utječe na metabolizam ugljika	13
5.1.6. Povećana ekspresija GRF4 proteina	14
5.2. Gen <i>NGR5 (NITROGEN-MEDIATED TILLER GROWTH RESPONSE 5)</i>	15
5.2.1. Histonska metilacija posredovana NGR5 kao odgovor biljke na dušik	15
5.2.2. Protein NGR5 meta je giberelinskog GID-1 receptora	16
5.2.3. Interakcija NGR5 s DELLA proteinima.....	17
5.2.4. Povećana ekspresija NGR5 proteina	19
5.3. Nova generacija sorti zelene revolucije	19
6. Zaključak.....	22
7. Literatura.....	23
8. Sažetak	27
9. Summary	27
10. Životopis	28

1. Uvod

Zelena revolucija je popularni pojam koji označava razdoblje šezdesetih godina dvadesetog stoljeća kada je, zbog uvođenja novih biljnih sorti te korištenja pesticida u uzgoju istih, došlo do velikog porasta u proizvodnji prehrambenih žitarica (Merriam-Webster, 2021). Zelena revolucija javila se kao odgovor na porast potražnje za hranom. Glad u svijetu je rasla, a proizvodnja hrane nije mogla pratiti trend rasta stanovništva (Briney, 2021). Zelena revolucija omogućila je uvođenje visokoprinosnih, polu-patuljastih sorti žitarica, pšenice i riže, u masovni uzgoj. Zbog povećanog prinosa i lakšeg uzgoja, ove sorte brzo su bile prihvaćene diljem svijeta te danas tvore bazu moderne poljoprivrede (Ortiz i sur. , 2007). Usprkos tome, sorte zelene revolucije pokazuju smanjenu efikasnost iskorištenja dušika te njihov maksimalni prinos ovisi o količini dostupnog dušika. Iz tog razloga uzgajaju se uz veliku potrošnju anorganskih dušičnih gnojiva koja su u suvišku štetna za okoliš. Kako bi smanjili zagađenje okoliša, pogotovo vodenih područja, potrebno je razviti nove visokorodne sorte žitarica koje bi zadržale prednosti patuljastih sorti zelene revolucije, ali omogućile velike prinose neovisne o dostupnosti dušika (Li i sur. , 2018; Ladha i sur. , 2005). S tim ciljem proučavani su geni pšenice i riže odgovorni za unos dušika i odgovor na dušik, geni nove zelene revolucije, koji bi u budućnosti mogli biti temelj za stvaranje novih sorti s manjom potražnjom za dušičnim gnojivima (Li i sur. , 2018; Wu i sur. , 2020).

2. Zelena revolucija

Tim stručnjaka pod vodstvom agronoma Normana E. Borlauga zaputio se u Meksiko 1945. godine u sklopu projekta koji je organizirala i financirala Rockefeller fondacija (eng. *The Rockefeller Foundation*) u suradnji s Meksičkim ministarstvom poljoprivrede (eng. *Mexican Ministry of Agriculture*) (The Nobel prize, 2021; Ortiz i sur. , 2007). Cilj projekta bio je omogućiti masovnu produkciju žitarica u zemlji u kojoj je, zbog mnogih bolesti koje su u to vrijeme zahvatile usjeve, proizvodnja hrane bila izrazito niska, a glad stanovništva je rasla. Borlaug i suradnici su provodili mnogobrojna križanja postojećih varijeteta/sorti pšenice kako bi dobili nove sorte najboljih svojstava. Željeli su dobiti sorte patuljastog rasta i visokog prinosa te visoke kvalitete zrna za daljnju obradu i proizvodnju namirnica, otporne na bolesti i polijeganje uslijed upotrebe velike količine gnojiva (Ortiz i sur. , 2007). Križanja su se provodila na dvije različite lokacije te u različitim klimatskim zonama i pri različitoj nadmorskoj visini. Jedna od lokacija bio je Ciudad

Obregón, suho područje u sjeverozapadnom Meksiku, na prosječnoj nadmorskoj visini od 38 metara. Druga lokacija bila je Toluca, hladno područje u blizini Mexico Cityja na prosječnoj nadmorskoj visini od 2640 metara (Ortiz i sur. , 2007). Na Slici 1. prikazane su dvije prethodno navedene lokacije uzgoja.



Slika 1. Dvije izvorne lokacije na kojima su provođena križanja pšenice tijekom zelene revolucije: Ciudad Obregón i Toluca (Ortiz i sur. , 2007).

Prijenosom dobivenog hibridnog sjemena između ove dvije lokacije, uspjeli su uzgojiti po dvije generacije pšenice u jednoj godini, što je prepolovilo vrijeme potrebno za dobivanje novih kultivara. Također, biljke koje su selektirane na obje lokacije bile su izložene dvama spektrima bolesti, što je znanstvenicima omogućilo da izaberu sorte otporne na širok spektar biljnih patogena. Dobivene su sorte prilagođene na oba tipa klime i neosjetljive na fotoperiod, što je omogućavalo globalni uzgoj. Usprkos tome, dobivene sorte visokog rasta ipak su imale nedostatke. Prilikom upotrebe velike količine gnojiva biljke bi se uslijed težine klasa savile i polegle na tlo. Osim gnojiva uzrok polijeganju mogu biti i naleti vjetra, kiša, neadekvatna zemlja i drugo. Opisano polijeganje žitarica smanjuje prinos i otežava žetvu (Berry, 2013). Odlučili su križati svoje sorte sa patuljastim kultivarom pšenice Norin 10 te su nakon povratnog križanja dobili visokoprinosne polu-patuljaste sorte koje su predstavljene u Meksiku 1962. godine. Ove sorte osim svog karakterističnog polu-

patuljastog rasta pokazuju i visok prinos, gotovo duplo veći od bilo koje visoke sorte pšenice te ne poliježu zbog korištenja velike količine gnojiva. Nije bilo potrebno dugo vremena da ove sorte pšenice uđu u masovni uzgoj – ukupna proizvodnja pšenice u Meksiku 1945. godine iznosila je 250,000 tona dok je 1988. godine porasla čak na 5 miliona tona (Ortiz i sur. , 2007). Osim pšenice, zelenom revolucijom dobivene su i visokoprinosne sorte riže, žitarice koja danas ima najveći značaj u prehrani populacije (Folger, 2014). Za svoj veliki doprinos u ovim istraživanjima, ali i posljedično smanjenje gladi na globalnoj razini, Norman E. Borlaug je 1970. godine primio Nobelovu nagradu za mir (Ortiz i sur. , 2007).

3. Geni odgovorni za zelenu revoluciju

U vrijeme kada je N. Borlaug provodio svoja križanja, niti jedan od gena odgovornih za svojstva koja je pratio nije bio poznat tj. kloniran i sekvenciran. Tek otkrićem metoda rekombinantne DNA, kartiranja gena i sekvencioniranja, identificirani su geni koji su imali glavnu ulogu u dobivanju novih visokoprinosnih polu-patuljastih sorti tijekom zelene revolucije. Danas je poznato da su to *Reduced height-1 (Rht-1)* gen pšenice te *Semi-dwarf1 (SD1)* gen riže koji oba sudjeluju u regulaciji biljnog odgovora na giberelin (Gale & Marshall, 1976; International Rice Research Institute, 1967; Peng i sur. , 1999; Monna i sur. , 2002; Spielmeyer, 2002).

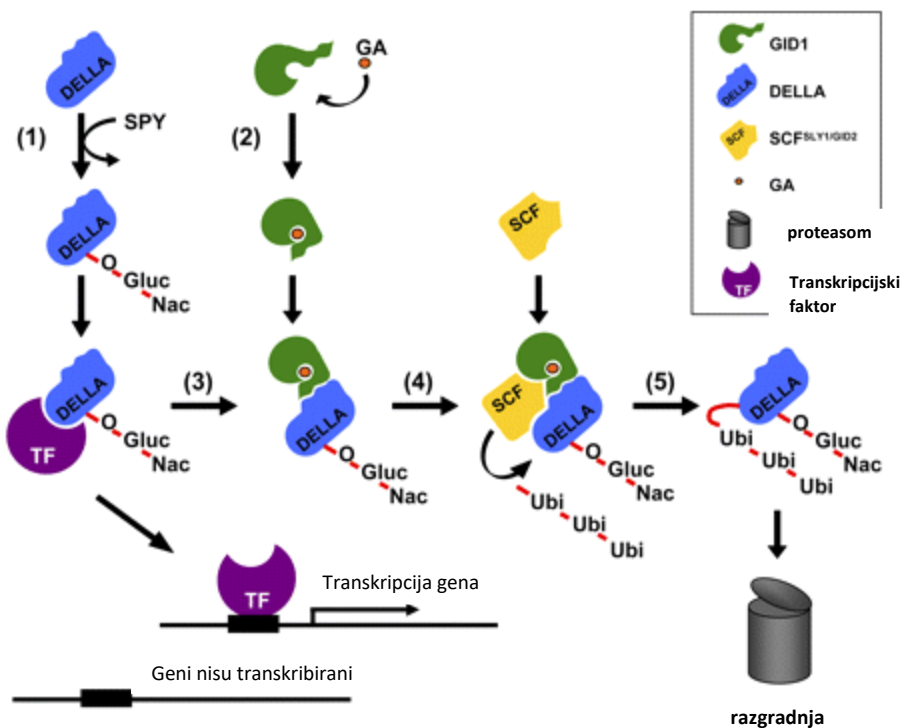
3.1. Mehanizam djelovanja fitohormona giberelina

Giberelini su skupina biljnih hormona koji su po strukturi tetraciklički diterpeni. Neke od njihovih uloga su poticanje produžnog rasta patuljastih biljaka te biljaka s rozetom, prekid dormancije pupova i sjemenki te poticanje klijanja (indukcija sinteze hidrolitičkih enzima tijekom klijanja sjemenki žitarica). Giberelini su također odgovorni za indukciju produžnog rasta biljaka iz porodice trava. Neki od bioaktivnih giberelina koji pokazuju biološki učinak na rast i razvoj biljaka su GA₁, GA₃, GA₄ te GA₇ (Taiz & Zeiger, 2010).

Proteini s DELLA domenom negativni su regulatori odgovora na giberelin. Represorski proteini DELLA vežu se na transkripcijske faktore koji potiču transkripciju gena ovisnih o giberelinu te time inhibiraju njihovu ekspresiju. Bez ekspresije navedenih gena onemogućen je produžni rast biljnih tkiva. Vežanje proteina DELLA na transkripcijske faktore dodatno je potaknut vezanjem

N-acetilglukozamina na hidroksilnu skupinu bočnog ogranka serina ili treonina DELLA proteina pomoću β -glikozidne veze. Ovakvu O-GlcNAc modifikaciju može provoditi enzim SPY. Bez slobodnog transkripcijskog faktora geni ovisni o giberelinu neće se transkribirati. Interakcijom giberelina s receptorom za giberelin *GID-1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*), receptor mijenja svoju konformaciju te omogućuje vezanje proteina DELLA. Stvaranjem ovog GA-*GID1*-DELLA kompleksa smanjuje se mogućnost vezanja proteina DELLA na transkripcijski faktor, ali se i potiče interakcija proteina DELLA s kompleksom SCF^{*GID2*} (Harberd i sur., 2009; Harberd, 2003).

SCF kompleks E3 ubikvitin ligaze (kompleks koji sadrži Skp, Cullin te F-box protein) provodi poliubikvitinaciju proteina predviđenih za razgradnju u 26S proteasomu. Poliubikvitinacija se provodi na DELLA proteinima koji su prethodno fosforilirani zasad nepoznatom protein kinazom (Harberd, 2003). Podjedinicu SCF kompleksa čini F-box protein *GID2* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2*) te se kompleks označava kao SCF^{*GID2*}. DELLA proteini u GA-*GID1*-DELLA kompleksu se zatim ubikvitiniraju te se tako obilježe za proteosomalnu razgradnju. Kada se DELLA proteini razgrade u 26S proteasomu, transkripcijski aktivator može potaknuti prepisivanje i ekspresiju gena ovisnih o giberelinima (Harberd i sur., 2009; Harberd, 2003). Na Slici 2. je shematski prikaz opisanog GA-*GID1*-DELLA mehanizma regulacije produžnog rasta.



Slika 2. Shematski prikaz GA-GID1-DELLA mehanizma regulacije produžnog rasta. Brojevima su redom označeni događaji: (1) uvođenje O-GlcNac modifikacije enzima SPY, (2) vežanje giberelina (GA) na receptor za giberelin (GID1), (3) stvaranje GA-GID1-DELLA kompleksa, (4) poliubikvitinacija enzima SCF^{SLY1/GID2}, (5) proteosomalna razgradnja poliubikvitiniranog DELLA proteina.

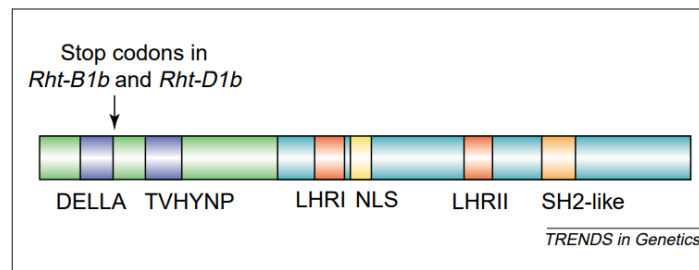
(slika preuzeta s: <http://www.plantcell.org/content/21/5/1328> , pristupljeno: 10.6.2021.)

U uobičajenim sortama, giberelin potiče razgradnju proteina DELLA, čime potiče produžni rast biljke (Harberd i sur. , 2009).

3.2. *Reduced height-1 (Rht-1) gen pšenice (Triticum aestivum)*

Rht-1 gen pšenice jedan je od gena odgovornih za niski fenotip sorti pšenice zelene revolucije. Gen *Rht-1* kodira za protein iz skupine Rht-1a/d8/GAI proteina, proteina s DELLA regijom, koji imaju funkciju represora rasta. Gen *Rht-1* ortologan je genima *GAI* vrste *Arabidopsis thaliana* te *d8 (dwarf8)* kukuruza, genima čijom mutacijom nastaju biljke neosjetljive na giberelin (Peng i sur., 1997; Winkler & Freeling, 1994) . Kao i ostali DELLA proteini, produkti gena *Rht-1* razgrađuju se u prisustvu giberelina (Pearce i sur. , 2011). U sortama pšenice zelene revolucije prisutni su

mutirani aleli *Rht-B1b* i *Rht-D1b*. To su semidominantni mutirani aleli izmjenjene funkcije koji smanjuju visinu biljke, smanjuju odgovor biljke na giberelin te povećavaju *in planta* razinu giberelina. Zbog prisustva preuranjenog stop kodona, oni kodiraju za krnje DELLA proteine kojima nedostaje jedna od dvije N-terminalne regije potrebne za prepoznavanje proteina od strane GID-1 receptora (Peng i sur. , 1999; Hedden, 2003). Na Slici 3. prikazan je shematski prikaz strukture Rht-1a/d8/GAI proteina.



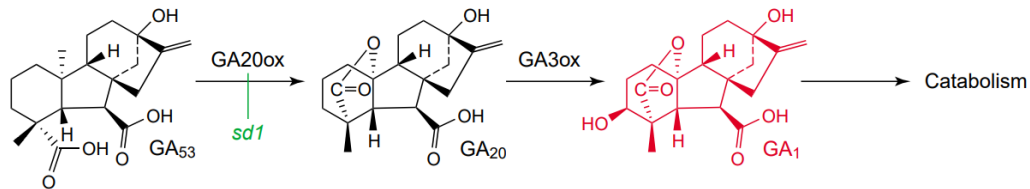
Slika 3. Shematski prikaz strukture Rht-1a/d8/GAI proteina. Tamno plavom bojom prikazane su regije odgovorne za prepoznavanje od strane GID1 receptora, dok je strelicom označena pozicija preuranjenog stop kodona kodiranog mutiranim alelima *Rht-B1b* i *Rht-D1b* (Hedden, 2003).

Takvi DELLA proteini otporniji su na razgradnju posredovanu giberelinom i GID1 receptorom. Samim time povećava se količina DELLA proteina, smanjuje se osjetljivost biljke na gibereline te se postiže karakterističan polu-patuljasti fenotip biljaka (Peng i sur. , 1999).

3.3. *Semi-dwarf1* (*SD-1*) gen riže (*Oryza sativa*)

Semi-dwarf1 (*SD-1*) gen riže kodira za giberelin-20-oksidadu, enzim ključan u biosintezi giberelina (Monna i sur. , 2002; Spielmeier, 2002). Giberelin-20-oksidaza katalizira biosintezu giberelina GA₂₀ iz giberelina GA₅₃ u 3 koraka (GA₅₃→GA₄₄→GA₁₉→GA₂₀). Na Slici 4. nalazi se shematski prikaz reakcija ovisnih o giberelin-20-oksidazi pri sintezi bioaktivnog giberelina GA₁. Rižin genom sadrži minimalno dva gena odgovorna za sintezu giberelin-20-oksidaze, *GA20ox-1* i *GA20ox-2*. Gen *SD1* odgovara genu *GA20ox-2* koji se najviše eksprimira u listovima, stabljikama i neotvorenim cvjetovima (Sasaki i sur. , 2002). Mutirani *sd1* gen riže recesivnog je karaktera te smanjuje zastupljenost bioaktivnog giberelina i povećava akumulaciju rižinih DELLA proteina

SLR1 (SLENDER RICE1). Smanjena zastupljenost giberelina u vegetativnom vršku riže, u sortama s mutiranim *sd-1* genom, posljedica je nefunkcionalnog enzima giberelin-20-oksidaza. Sorte zelene revolucije koje posjeduju *sd1* gen podrijetlom iz sorti Dee-geo-woo-gen te IR8 sadrže deleciju veličine 383 parova baza u *GA20ox* genu (*OsGA20ox2*) koja dovodi do pomaka okvira čitanja te uvodi preuranjeni stop kodon. Produkt takvog mutiranog gena rezultira krnjim, potpuno neaktivnim enzimom. Postojanje drugog gena *GA20ox-1* koji kodira za giberelin-20-oksidazu u neotvorenim cvjetovima omogućuje sintezu enzima u nativnom obliku, što omogućuje održavanje drugih procesa povezanih s odgovorom na giberelin, kao što su formacija cvijeta, oplodnja, ali i povećani prinos biljke, pritom ne narušavajući njen skraćeni rast (Sasaki i sur. , 2002).



Slika 4. Shematski prikaz reakcija ovisnih o giberelin-20-oksidazi pri sintezi bioaktivnog giberelina GA₁ (Hedden, 2003).

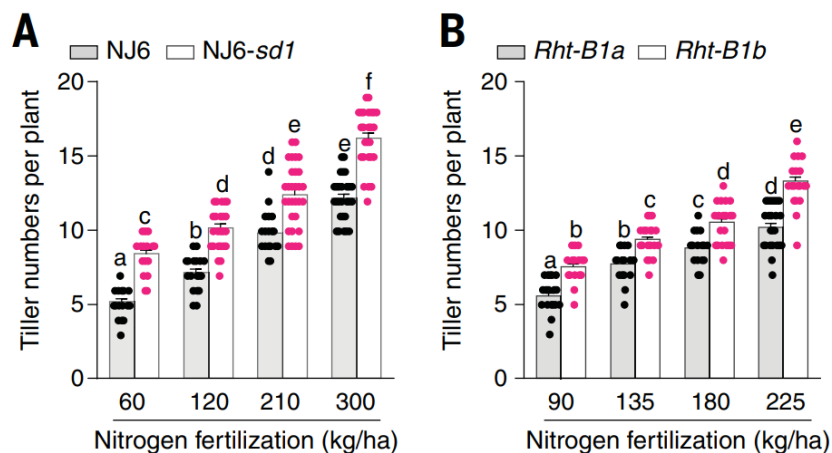
Smanjena proizvodnja giberelina za posljedicu ima smanjen rast te postizanje polu-patuljastog fenotipa (Monna i sur., 2002; Spielmeier, 2002). Visoki fenotip biljaka može se povratiti vanjskom primjenom giberelina (Sasaki i sur. , 2002).

4. Karakterizacija sorti zelene revolucije

Osim karakterističnog polu-patuljastog rasta, koji smanjuje polijeganje žitarica uz tlo, sorte dobivene križanjima tokom zelene revolucije otpornije su na bolesti i klimatske promjene te pokazuju veći prinos i kvalitetu zrna (Ortiz i sur. , 2007). Jedno od najznačajnijih svojstava koje je potaknulo masovni uzgoj ovih sorti upravo je značajno povećan prinos. Prinos žitarica mjeri se prema broju postranih izdanaka, broju zrna na jednoj metlici (riža) ili klasu (pšenica) te ukupnoj težini 1000 zrna neke žitarice (Sun i sur. , 2014). Prinos te produžni rast biljaka sorti zelene revolucije uvelike ovisi o količini dostupnog dušika.

4.1. Prinos u ovisnosti o dušiku

Prinos žitarica pšenice i riže ovisi o količini dostupnog dušika u tlu. Pri većim koncentracijama dušika biljke će proizvoditi veći broj postranih izdanaka i zrna te će imati smanjen rizik od polijeganja. Samim time biljke će pokazivati i veći prinos. Sorte zelene revolucije, koje nose *Rht-B1b* alel pšenice ili mutirani *sdl* gen riže, pokazuju puno veću ovisnost prinosa o dušiku od drugih sorti. Istraživanjima provedenim na sorti riže Nanjing 6 (NJ6) pokazano je da broj postranih izdanaka, zrna te opći prinos biljke raste s porastom opskrbe biljke dušikom. Usporedbom linije sorte NJ6 koja nosi mutirani gen *sdl* (sorta NJ6-*sdl*) s divljim tipom (sorta NJ6) pokazan je veći porast prinosa biljke pri istoj prisutnosti dostupnog dušika. Slični učinak primijećen je i kod pšenice: linije s mutiranim alelom *Rht-B1b* pokazuju veći prinos od kontrolne linije s *Rht-B1a* alelom, pri istim količinama dostupnog dušika. Povećana stabilnost DELLA proteina u sortama zelene revolucije potiče pojačan odgovor na količinu dostupnog dušika (Wu i sur. , 2020). Ovaj fenomen grafički je prikazan na Slici 5.



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti broja postranih izdanaka o količini primijenjenog dušičnog gnojiva za: (A) biljke riže sorte Nanjing 6 (NJ6) te linije NJ6-*sd1*, (B) biljke pšenice s alelom *Rht-B1a* te *Rht-B1b* (Wu i sur, 2020).

4.2. Produžni rast u ovisnosti o dušiku

U sortama žitarica pšenice i riže uobičajene visine, biljke rastu do veće visine pri većoj prisutnosti dostupnog dušika. Ovakav odgovor nije primijećen u sortama zelene revolucije koje nose *Rht-B1b* alel pšenice ili mutirani *sd1* gen riže te pokazuju karakterističan polu-patuljasti rast. Primjerice, produžni rast biljke induciran porastom dostupnog dušika u sorte riže Nanjing 6 (NJ6) znatno je smanjen u liniji NJ6-*sd1* (Wu i sur. , 2020) .

4.3. Efikasnost iskorištenja dostupnog dušika

Kod patuljastih sorti također je primijećena smanjena efikasnost iskorištenja dostupnog dušika (NUE, od eng. *nitrogen-use efficiency*). Najveći izvor dušika za biljke riže, čiji se korijen nalazi u anaerobnim uvjetima, predstavljaju NH_4^+ ioni, dok su u pšenice to nitrati (NO_3^-) (Li i sur. ,2009; Hawkesford 2014). Biljke s mutacijom u genima *Rht-1* ili *sd-1* imaju smanjenu brzinu unosa dostupnog dušika, bilo u obliku NH_4^+ iona u riže, ili nitrata u pšenice. Primjerice, biljke pšenice s mutantnim *Rht-B1b* alelom pokazuju smanjenju brzinu unosa nitrata, kao i smanjenu indukciju produžnog rasta povećanjem količine dostupnog dušika (Li i sur. , 2018).

Posljedično tome, nove sorte polu-patuljastog rasta i visokog prinosa, koje slabo koriste dostupni dušik, često se uzgajaju koristeći puno umjetnih dušičnih gnojiva kako bi se osigurao maksimalan prinos (Li i sur. , 2018). Pošto takva gnojiva u velikim količinama mogu naštetiti okolišu, zadnjih godina pokušavaju se stvoriti nove sorte koje bi zadržale poželjna svojstva polu-patuljastih sorti, ali istovremeno zahtijevala manju uporabu dušičnih gnojiva.

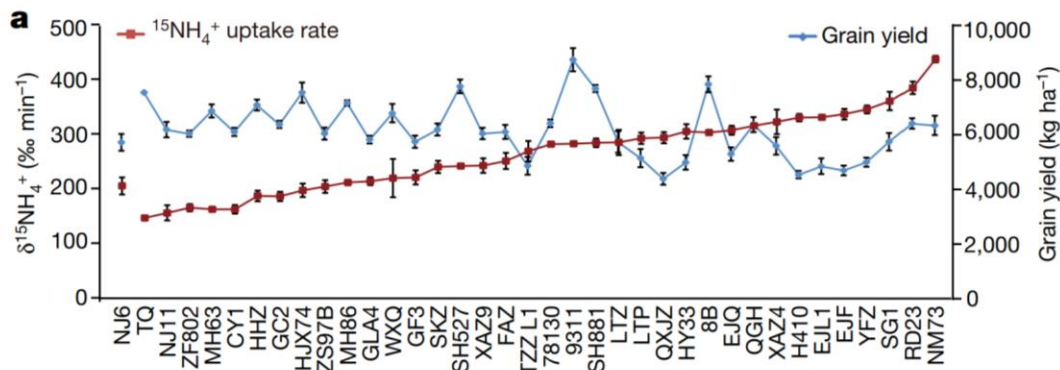
5. Geni nove zelene revolucije

Posljednjih godina provode se brojna istraživanja kojima se pokušavaju otkriti geni odgovorni za regulaciju unosa te odgovora na dušik u visokorodnim polu-patuljastim sortama zelene revolucije. Razumijevanje mehanizama odgovornih za unos dušika omogućilo bi manipulaciju istima te kao potencijalnu posljedicu imalo razvitak novih visokorodnih patuljastih sorti s povećanom efikasnošću iskorištenja dostupnog dušika. Geni koji su do sada otkriveni kao regulatori metabolizma dušika u riže su *GRF4* (*GROWTH-REGULATING FACTOR 4*) te *NGR5* (*NITROGEN-MEDIATED TILLER GROWTH RESPONSE 5*) (Li i sur. , 2018; Wu i sur. , 2020).

5.1. Gen *GRF4* (*GROWTH-REGULATING FACTOR 4*)

5.1.1. Ekspresija *GRF4* proteina utječe na efikasnost unosa dušika

Kako bi se otkrio gen odgovoran za efikasnost iskorištenja dostupnog dušika proučavana je stopa i efikasnost unosa dušikovih iona u različitim komercijalno korištenim sortama riže. Utvrđene su sorte s najvećom i najnižom stopom unosa. Iz prikaza na Slici 6. vidljivo je kako sorta NM73 ima najveću stopu apsorpcije $^{15}\text{NH}_4^+$ iona iz okoliša, dok sorta NJ6 pokazuje najslabiji unos (Li i sur. , 2018).



Slika 6. Stopa apsorpcije $^{15}\text{NH}_4^+$ iona iz okoliša (na grafu označeno crvenom bojom) te prinos (na grafu označeno plavom bojom) u različitim komercijalno korištenih sorti riže (Li sur. , 2018).

Pokušalo se otkriti lokus odgovoran za ovaj fenotip. Pronađena su dva lokusa koja su kosegregirala s lokusima *sd1* te *GRF4*. Iako se otprije znalo za postojanje ovih gena, njihova uloga u regulaciji metabolizma dušika bila je novost. Linija NM73 nosi alel *GRF4^{ngr2}* te pokazuje veću brzinu unosa dušikovih iona od NJ6 koja nosi alel *GRF4^{NGR2}*. Upravo je alel *GRF4^{ngr2}* odgovoran za povećani unos dušikovih iona. Sukladno tome, izogena linija NJ6-*GRF4^{ngr2}* pokazala je povećani unos $^{15}\text{NH}_4^+$ iona u usporedbi s kontrolnom linijom NJ6 te povećanu razinu *GRF4* mRNA i *GRF4* proteina. Kada je ekspresija *GFR4* smanjena RNA interferencijom uočena je i smanjena stopa apsorpcije dušika, dok je kod nadekspresije *GRF4* proteina ta stopa bila povećana (Li i sur. , 2018).

Usporedbom sekvencija alela *GRF4^{NGR2}* (iz sorte NJ6) te *GRF4^{ngr2}* (iz sorte NM73) pronadeno je nekoliko jednonukleotidnih polimorfizama (od eng. *single-nucleotide polymorphism*, SNP), koji sprječavaju cijepanje *GRF4^{ngr2}* mRNA posredovano s miR396 te time povećavaju razinu *GRF4* mRNA te *GRF4* proteina. No nemaju sve sorte koje pokazuju povećanu apsorpciju dušika ovaj mehanizam. Primjerice, sorta RD23 ne sadrži jednonukleotidne polimorfizme koji sprječavaju cijepanje *GRF4* mRNA, već sadrži jednonukleotidne polimorfizme unutar promotora gena *GRF4*. Prema razlikama u slijedu nukleotida promotora za gen *GRF4* u različitim sortama riže, određena su 3 promotorska haplotipa, nazvana A, B i C. Haplotip B prisutan je i kod sorte NM73 i kod RD23 koje pokazuju najveću apsorpciju dušika iz okoliša te je upravo ovaj promotorski haplotip odgovoran za povećanu transkripciju gena *GRF4*. Sorta NM73 ima oba navedena mehanizma regulacije, što objašnjava zašto je vodeća u brzini apsorpcije dušika iz okoliša (Li i sur. , 2018).

5.1.2. Zastupljenost GRF4 proteina ovisi o dostupnom dušiku

Količina prisutnog GRF4 također ovisi o količini dostupnog dušika. Količina prisutne *GRF4* mRNA u sorti NJ6 smanjuje se povećanjem opskrbe dušikom. Pošto u ovakvim uvjetima količina miR396 ostaje nepromijenjena, proizlazi kako je riječ o smanjenoj transkripciji gena *GRF4*. Također, pri smanjenoj opskrbi dušikom, zastupljenost GRF4 je povećana, iz čega slijedi da se radi o mehanizmu povratne sprege odgovornom za održavanje homeostaze metabolizma dušika. Ovakav odgovor na smanjenu opskrbu dušika najizraženiji je upravo kod sorti s promotorskim haplotipom B, a kod mutanata s delecijom gena *GRF4* znatno je smanjen (kao i brzina apsorpcije dušika te porast biomase ovisan o porastu opskrbe dušika) (Li i sur. , 2018).

5.1.3. Protein GRF4 promovira transkripciju gena odgovornih za asimilaciju dušika

Promatrana je međusobna interakcija GRF4 te SLR1 proteina (DELLA protein iz riže). Izogena linija NJ6-*sd1-GRF4^{ngr2}* zadržava fenotip karakterističan za sorte zelene revolucije, polu-patuljasti rast te povećan prinos, ali također ima povećanu apsorpciju $^{15}\text{NH}_4^+$ te $^{15}\text{NO}_3^-$ iona u usporedbi s NJ6-*sd1*. Nadalje, aktivnost enzima ključnih za asimilaciju dušikovih vrsta kao što su glutamin sintetaza te nitrat reduktaza veće su u linije NJ6-*sd1-GRF4^{ngr2}* nego u NJ6-*sd1*, ali i slične aktivnostima u liniji NJ6. Analizom transkriptoma linije NJ6-*sd1-GRF4^{ngr2}* utvrđena je povećana zastupljenost mRNA koja kodira za transportere (primjerice AMT1.1 te AMT1.2) koji sudjeluju u apsorpciji NH_4^+ u odnosu na liniju NJ6-*sd1*. Slična situacija uočena je i u zastupljenosti mRNA koje kodiraju za enzime odgovorne za asimilaciju NH_4^+ (primjerice GS1.223, GS2 te NADH-GOGAT2). Prisutnost GRF4 promovira apsorpciju te asimilaciju dušika dok SLR1 to sprječava (Li i sur. , 2018).

Smatra se kako je GRF4 transkripcijski regulator odgovoran za regulaciju metabolizma dušika, te kako potiče apsorpciju te asimilaciju dušika te regulira prinos biljaka ovisan o dušiku (Li i sur. , 2018).

Metodom CHIP-seq otkrivena su mjesta vezanja GRF4 na DNA. Slijedovi koje veže GRF4 protein mogu se pronaći u promotorima gena odgovornih za sintezu proteina koji sudjeluju u metabolizmu dušika i regulaciji asimilacije NH_4^+ , primjerice *AMT1.1* i *GS1.2*. Vezanjem GRF4 na promotor potiče se transkripcija ovih gena (Li i sur. , 2018).

5.1.4. Antagonistički odnos GRF4 i DELLA proteina te ovisnost o giberelinu

Za sorte zelene revolucije karakteristična je akumulacija SLR1 proteina. Akumulacijom SLR1 smanjuje se transkripcija gena odgovornih za metabolizam dušika, dok se pri manjoj zastupljenosti SLR1 transkripcija ovih gena povećava. Obrnuto vrijedi za prisutnost bioaktivnog giberelina (GA). Povećanjem količine prisutnog GA transkripcija gena za metabolizam dušika se povećava, dok se smanjenjem GA ona smanjuje. Prisutnost GA regulira GA-GID1-DELLA mehanizam koji je odgovoran za proteosomalnu razgradnju DELLA, u slučaju riže SLR1, proteina. Primjenom inhibitora biosinteze giberelina paklobutrazola (PA) u sortama NJ6 i NJ6-*sd1* primijećena je smanjena interakcija proteina GRF4 sa njemu pripadnim slijedovima u promotorima gena *AMT1.1* i *GSI.2*. Akumulacija SLR1, uzrokovana ili prisutnošću mutiranog gena *sd1* ili prisutnošću inhibitora PA, smanjuje vezanje GRF4 transkripcijskog aktivatora te smanjuje apsorpciju NH_4^+ , dok giberelinom posredovana razgradnja SLR1 pospješuje vezanje GRF4 transkripcijskog aktivatora te apsorpciju NH_4^+ . Zaključno, akumulacija SLR1 proteina ima negativan utjecaj na metabolizam dušika, prouzročen smanjenjem vezanja GRF4 transkripcijskog faktora na svoj promotor. SLR1 protein sprječava interakciju GRF4 s GIF1 (GRF-interacting factor) proteinom koji služi kao koaktivator prilikom poticanja transkripcije gena. GA omogućuje razgradnju SLR1 i time, posljedično, omogućuje navedenu interakciju. Gen GRF4 također ima pozitivnu samoregulaciju - protein GRF4 služi kao transkripcijski aktivator za gen *GRF4*. Stoga, akumulacija SLR1 proteina, smanjuje i količinu GRF4 proteina, smanjujući njegovu transkripciju (Li i sur. , 2018).

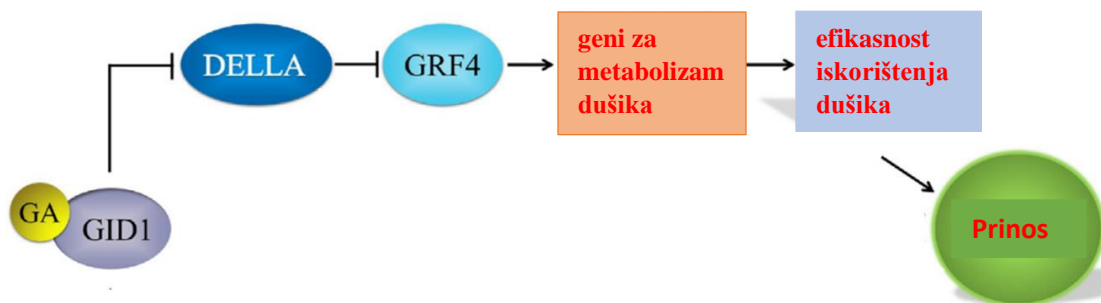
5.1.5. GRF4 utječe na metabolizam ugljika

Pokazano je kako osim gena za metabolizam dušika, GRF4 regulira i gene odgovorne za metabolizam ugljika. GRF4 pospješuje transkripciju gena koji sudjeluju u fotosintezi (primjerice *Lhca1* i *CAB1*), metabolizmu saharoze (primjerice *TPS1* i *TPP1*) i prijenosu saharoze (primjerice *SWEET11* i *SWEET12*), dok SLR1 smanjuje transkripciju istih. Povećana transkripcija ovih gena pokazala je učinak na metabolizam i fiksaciju ugljika. Sorte zelene revolucije, primjerice NJ6-*sd1*, imaju karakterističnu povećanu stopu fotosinteze. Linija NJ6-*sd1-GRF4^{ngr2}* pokazuje još veći porast u stupnju fotosinteze s obzirom na kontrolu (NJ6). Također, GRF4 potiče transkripciju gena odgovornih za diobu stanica, uključujući gene za ciklin-ovisne kinaze. Također, GA potiče

transkripciju ovih gena, dok ju SLR1 protein sprječava, inhibirajući GRF4-GIF1 interakciju. Antagonistički odnos GRF4 i SLR1 proteina u regulaciji gena za dušik i ugljik omogućava biljki održavanje homeostaze i održavanje konstantnog omjera N:C u organizmu te utječe na staničnu proliferaciju (Li i sur. , 2018).

5.1.6. Povećana ekspresija GRF4 proteina

Akumulacija GRF4 proteina povećava efikasnost iskorištenja dušika iz okoliša (NUE, od eng. *nitrogen-use efficiency*) u sortama zelene revolucije te biljke s povećanom zastupljenosti GRF4 pokazuju veći prinos. Pokazano je kako nadekspresija GRF4 u sortama polu-patuljastog rasta, ne utječe na produžni rast biljke i rast postranih izdanaka u ovisnosti o dušiku, ali znatno povećava apsorpciju i metabolizam dušika. Ovo znači da bi se u sortama zelene revolucije nadekspresijom GRF4 proteina mogao riješiti problem smanjene apsorpcije dušika iz okoliša, bez utjecaja na njihov karakterističan i poželjan polu-patuljasti rast i povećan broj postranih izdanaka. Sličan učinak uočen je i kod sorti pšenice zelene revolucije, gdje akumulacija GRF4 povećava debljinu stabljike i debljinu stanične stijenke, što dodatno potiče otpornost biljke na polijeganje. Nadalje, pokazano je da u riže protein GRF4 djeluje kao direktni pozitivni regulator transkripcije gena *MYB61*, gena koji kodira za transkripcijski faktor koji regulira sintezu celuloze te samim time utječe i na sintezu stanične stijenke i na povećanje biomase (Gao i sur. , 2020). Na Slici 7. shematski je prikazan mehanizam djelovanja transkripcijskog faktora GRF4.



Slika 7. Prisutnost giberelina (GA) regulira GA-GID1-DELLA mehanizam koji je odgovoran za proteosomalnu razgradnju DELLA proteina. Akumulacijom DELLA proteina smanjuje se vezanje GRF4 transkripcijskog aktivatora na svoje promotore. Transkripcijski faktor GRF4 potiče transkripciju gena odgovornih za metabolizam i asimilaciju dušika te posljedično biljke s povećanom zastupljenosti GRF4 pokazuju veću efikasnost iskorištenja dušika te veći prinos (Xue i sur. , 2020).

Ovakva svojstva postignuta akumulacijom GRF4 mogu se iskoristiti za uzgajanje sorti zelene revolucije pri umjerenim količinama dostupnog dušika, odnosno za smanjenje korištenja dušičnih gnojiva pri uzgoju (Li i sur. , 2018).

5.2. Gen *NGR5* (*NITROGEN-MEDIATED TILLER GROWTH RESPONSE 5*)

5.2.1. Histonska metilacija posredovana *NGR5* kao odgovor biljke na dušik

U svrhu pronalazjenja gena odgovornih za regulaciju odgovora biljke na dušik provedena je mutageneza pomoću etil-metan sulfonata (EMS) na sorti riže 9311. Pronađeni su mutanti koji ne pokazuju porast prinosa ovisan o dušiku. To su jedinke koje sadrže mutirani alel *ngr5* (*nitrogen-mediated tiller growth response 5*). Takve jedinke pokazuju smanjen broj postranih izdanaka, koji je neovisan o dostupnosti dušika. Protein *NGR5* nužan je za povećanje broja postranih izdanaka pri većim količinama dostupnog dušika, fenotip karakterističan za visokorodne sorte zelene revolucije. Sukladno tome, pri višim koncentracijama dušika prisutna je i veća količina mRNA koja kodira za protein *NGR5*, ali i samog *NGR5* proteina (Wu i sur. , 2020).

Daljnijim istraživanjem pokazano je kako *NGR5* gen kodira za transkripcijski faktor s APATELA2 (AP2) - domenom te time utječe na ekspresiju gena i regulaciju odgovora biljke na dušik (Wu i sur. , 2020).

Analizom transkriptoma metodom RNA-seq utvrđeno je kako nedostatak *NGR5* dovodi do promjene u zastupljenosti mRNA duž cijelog genoma. Mnogi diferencijalno eksprimirani geni pokazuju povećanu zastupljenost pripadne mRNA u *ngr5* mutantu. Set gena čija je transkripcija potaknuta u *ngr5* mutantu također je set gena čija je transkripcija reprimirana histonskom modifikacijom, trimetilacijom histona H3 na lizinu na položaju 27 (H3K27me3). Među te gene spadaju *D14* (*Dwarf14*), *D3* (*Dwarf3*), *OsTB1* (*TEOSINTE BRANCHED1*) i *OsSPL14* (*squamosa promoter binding protein-like-14*), geni za koje je ranije utvrđeno da sudjeluju u inhibiciji lateralnog grananja i broja postranih izdanaka. Provođenjem metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qRT-PCR) pokazano je kako povećana količina dostupnog dušika smanjuje količinu mRNA ranije navedenog seta gena. Ovaj učinak nije prisutan u *ngr5* mutantu (Wu i sur. , 2020).

Metodom ChIP-PCR pokazano je vezanje proteina *NGR5*-HA (HA privjesak, eng. *hemagglutinin-tagged fusion gene*) na promotorske regije, ali i duž gena *D14* i *OsSPL14*. Porastom koncentracije dušika, transkripcija ovih gena se smanjuje, dok se zastupljenost H3K27me3 modifikacija na histonima u tom području povećava. Kako bi se pomnije ispitaio mehanizam metilacije posredovane *NGR5*, metodom yeast two-hybrid ustvrđena je interakcija proteina *NGR5* s proteinom LC2 (leaf inclination2), koji je dio kompleksa PRC2 (poly-comb repressive complex 2). Mutanti s mutiranim *lc2* alelom, pokazuju isti fenotip kao i *ngr5* mutanti, odnosno ne pokazuju povećanje broja postranih izdanaka s porastom količine dostupnog dušika. Kompleksi LC2 te PRC2 nužni su za regulaciju gena posredovanu proteinom *NGR5*. Vezanjem *NGR5* u interakciji s PRC2 kompleksom na svoju metu, promovira se uvođenje H3K27me3 histonskih modifikacija i posljedično inhibicija gena odgovornih za inhibiciju lateralnog grananja i stvaranja postranih izdanaka. Ova metilacija dodatno je potaknuta većom dostupnosti dušika te promovira povećan broj postranih izdanaka (Wu i sur. , 2020).

5.2.2. Protein *NGR5* meta je giberelinskog *GID-1* receptora

Iako je odgovor na dušik u sortama zelene revolucije povećan, on se može reducirati vanjskom primjenom giberelina. Vanjskom primjenom giberelina također se smanjuje metilacija H3K27me3

histona, slično kao i u *ngr5* i *lc2* mutanata. Mutanti sa gubitkom funkcije u genu *gid-1*, u sorte riže NJ6, pokazuju povećan broj postranih izdanaka, dok oni s nadekspresijom *GID-1* gena pokazuju manji broj postranih izdanaka, neovisno o količini dušika (Wu i sur. , 2020).

Količina NGR5 u stanicama negativno je proporcionalna količini bioaktivnog giberelina. Sukladno tome, količina NGR5-HA je viša u NJ6-*sd1* mutantima koji su deficitarni u proizvodnji bioaktivnog giberelina, dok se zastupljenost proteina NGR5 smanjuje egzogenim dodavanjem giberelina. Provođenjem hibridizacije po Westernu u prisustvu proteosomalnog inhibitora MG132 (od eng. *carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*) utvrđena je akumulacija poliubikvitiranog NGR5-HA proteina. Giberelin potiče proteosomalnu razgradnju NGR5 proteina, koja je zbog prisustva inhibitora onemogućena, stoga se u stanici nakuplja NGR5 protein. Degradacija NGR5-HA proteina ovisna o giberelinu inhibirana je u NJ6-*gid1-10* mutantu. Poliubikvitinacija te zatim proteosomalna razgradnja proteina NGR5 u prisustvu giberelina ovisna je o receptoru za giberelin GID1 (Wu i sur. , 2020).

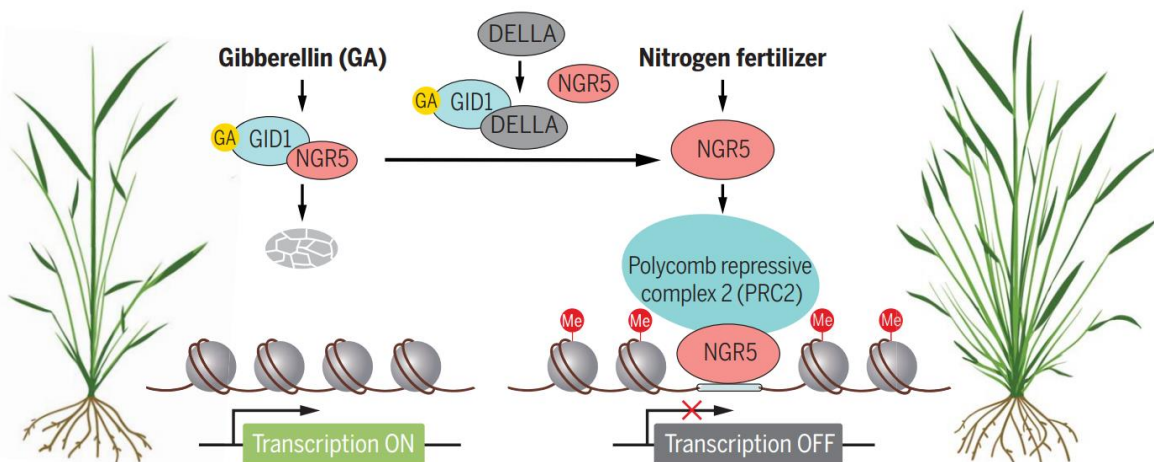
Ova razgradnja NGR5 potaknuta giberelinom neovisna je o prisustvu DELLA proteina. Naime, pokazano je kako GID1 receptor u prisustvu giberelina direktno interagira s NGR5 čime potiče njegovu poliubikvitinaciju SCF^{GID2} kompleksom te posljedično razgradnju u proteasomu. Iako NGR5 proteinu nedostaje regija specifična za vezanje DELLA proteina na GID1, uočena je AP2-R2 (eng. *repeated units 2*) domena koja ipak omogućuje ovu interakciju. Jačina interakcije NGR5-GID1 povećava se pri većoj količini primijenjenog giberelina. NGR5 također može interagirati s F-box komponentom GID2 kompleksa SCF^{GID2}. Sukladno tome gubitak funkcije gena *gid-2* također onemogućuje razgradnju NGR5, kao i kod *gid-1* mutanta (Wu i sur. , 2020).

5.2.3. Interakcija NGR5 s DELLA proteinima

Protein NGR5 direktno interagira s SLR1, rižinim DELLA proteinom. Ova interakcija ne utječe na vezanje NGR5 s LC2, stoga ne utječe na funkciju samog NGR5. Pošto su NGR5 i SLR1 oba supstrati giberelin-GID1-SCF^{GID2} kompleksa, oni su u kompetitivnom odnosu kada je u pitanju vezanje na GID1 receptor. U jedinkama gdje je potaknuta povećana sinteza NGR5-HA, također je primijećena akumulacija SLR1 proteina. U biljkama pšenice koje nose alel *Rht-B1b*, povećana je zastupljenost DELLA proteina. U tim biljkama također je primijećena smanjena proteosomalna razgradnja NGR5 proteina posredovana receptorom GID1. Pošto su DELLA proteini prisutni u

većoj količini, oni popunjavaju većinu veznih mjesta *GID1* receptora, stoga *NGR5* opstaju u stanici. Sličan učinak primijećen je i kod akumulacije pšeničnih *Rht-B1a* proteina, te rižinih *SLR1* proteina. Na molekularnoj razini, akumulacija *DELLA* proteina jedna je od karakteristika sorti zelene revolucije koja u istima stabilizira *NGR5* protein, smanjujući njegovu proteosomalnu razgradnju posredovanu *GID1* receptorom u prisustvu giberelina. Zbog smanjene proteosomalne razgradnje *NGR5* proteina, dolazi do akumulacije istog, što omogućuje povećan odgovor biljaka zelene revolucije na dostupan dušik (Wu i sur. , 2020).

Na Slici 8. prikazana je shema djelovanja transkripcijskog faktora *NGR5* te ranije spomenute interakcije s proteinima *GID1* i *DELLA* te kompleksom *PRC2*.



Slika 8. Transkripcijski faktor *NGR5* potiče dušik ovisnu H3K27me3 metilaciju histona posredovanu kompleksom *PRC2*. Ova metilacija reprimira gene odgovorne za inhibiciju lateralnog grananja i povećan broj postranih izdanaka. *NGR5* proteosomalno se razgrađuje u prisustvu giberelina posredstvom *GID1* receptora. Akumulacija *DELLA* proteina kompetitivno inhibira ovu razgradnju, čime stabilizira *NGR5* te posljedično potiče stvaranje postranih izdanaka (Wu i sur. , 2020).

5.2.4. Povećana ekspresija NGR5 proteina

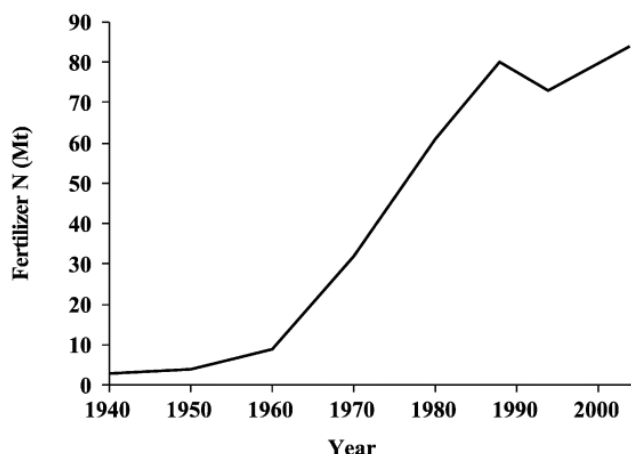
Kako bi se dodatno pokušao povećati prinos te broj izdanaka sorti zelene revolucije, tražile su se sorte koje prirodno pokazuju povećanu zastupljenost NGR5 proteina. Analizom genomskih sekvenci, nađene su sorte s prirodnim varijacijama u *NGR5* genu. Pronađeno je 5 različitih haplotipova, od kojih je najistaknutiji Hap.2 koji pokazuje povećanu količinu pripadne *NGR5* mRNA pri visokim, ali i pri niskim količinama dostupnog dušika, te sukladno s time visoki prinos neovisan o dušiku. Nadalje, pokušao se imitirati učinak Hap.2 haplotipa nadekspresijom *NGR5* pomoću *p35S::NGR5* transgena u polu-patuljastoj sorti riže 9311. Postignut je povećani prinos i stvaranje postranih izdanaka neovisno o količini dostupnog dušika, kao posljedica povećane količine NGR5, ali su također zadržana korisna polu-patuljasta svojstva karakteristična za sorte zelene revolucije (Wu i sur. , 2020).

Ovaj ishod vrlo je značajan za budućnost svjetske agrikulture, pošto bi se nadekspresijom NGR5 proteina mogla zaobići ovisnost prinosa o količini dostupnog dušika. Križanjima patuljastih sorti zelene revolucije s biljkama koji su nosioci haplotipa Hap.2 mogle bi se dobiti sorte poželjnih patuljastih, visokorodnih sredstava, čiji prinos ne bi ovisio o količini korištenih dušičnih gnojiva. Takve sorte omogućile bi održivi uzgoj riže te manju štetu za okoliš (Wu i sur. , 2020).

5.3. Nova generacija sorti zelene revolucije

Sorte zelene revolucije neupitno su imale velik značaj za razvitak današnje agrikulture. Iako su ove sorte vrlo rasprostranjene i popularne u biljnoj industriji, svejedno imaju svoje mane koje je potrebno riješiti kako bi se postigao razvoj održive poljoprivrede.

Sorte zelene revolucije zbog vrlo niske efikasnosti unosa dušika moraju se uzgajati pri vrlo velikim količinama anorganskih dušičnih gnojiva. Čak 60% ukupne potrošnje dušičnih gnojiva koristi se u proizvodnji tri glavne žitarice: riže, pšenice i kukuruza. Zbog konstantnog rasta svjetske populacije potražnja za hranom je sve veća te se predviđa kako će do 2050. godine proizvodnja žitarica morati porasti za 50-70% (Ladha i sur. , 2005). Na Slici 9. je grafički prikaz iz kojeg je vidljiv znatni porast u svjetskoj potrošnji dušičnih gnojiva nakon zelene revolucije (oko 1960. godine) i prihvaćanja novih sorti pšenice i riže. Zbog povećane potražnje za hranom predviđa se kako će se trend rasta potrošnje dušičnih gnojiva nastaviti (Ladha i sur. , 2005).

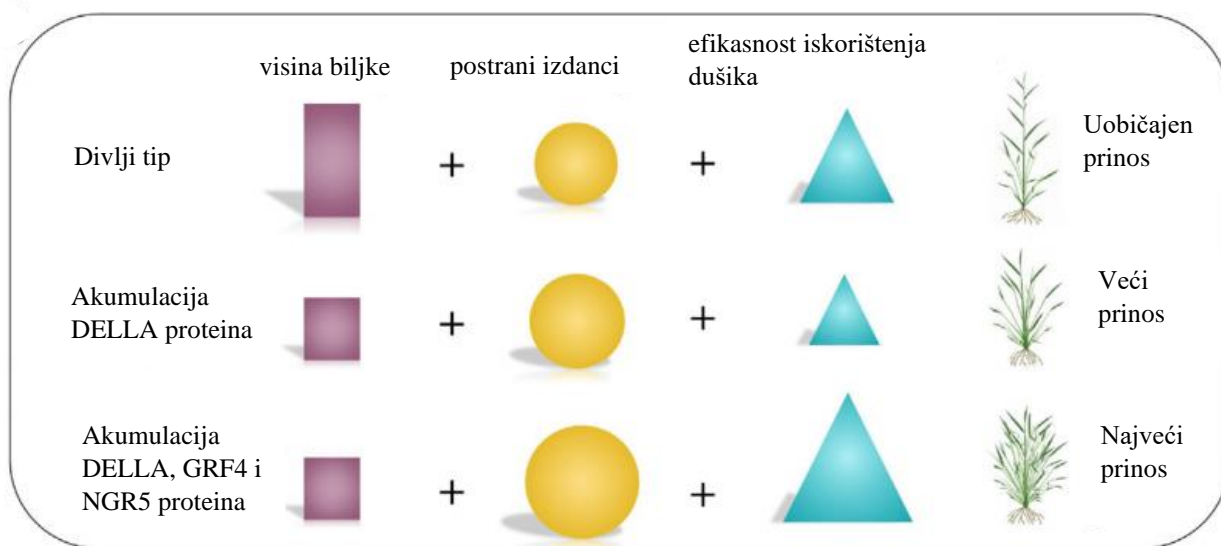


Slika 9. Grafički prikaz globalne potrošnje dušičnih gnojiva po godinama. Uočava se veliki porast u svjetskoj potrošnji dušičnih gnojiva nakon zelene revolucije (oko 1960. godine) (Ladha i sur. , 2005).

Dušična gnojiva mogu imati negativan efekt na okoliš. Ispiranjem nitrata iz zemlje, oni mogu prijeći u podzemne vode dovodeći do njihovog zagađenja. Posljedice povećane koncentracije nitrata u vodi za piće mogu uzrokovati razne bolesti kod djece i odraslih (kao što je methemoglobinemija ili rak) (Höring & Chapman, 2004; WHO, 1999 i 2004; Wolfe & Patz, 2002). Višak nutrijenata također može dovesti do negativnih utjecaja na okoliš kao što je eutrofikacija površinskih voda. Dušik je jedan od limitirajućih nutrijenata u razvoju biljnog svijeta. Prekomjernim korištenjem dušičnih gnojiva, dolazi do prekomjernog unosa dušika u sustav, koji omogućuje neuobičajeno velik rast populacija pojedinih organizama, primjerice alga i makrofita. Zbog njihovog prekomjernog rasta dolazi do nedostatka kisika u ekosustavima, ali također, oni mogu lučiti i toksine otrovne za ribe, stoku ili druge organizme (Howarth i sur. , 1996; Howarth & Marino, 2006). Dušikov (I) oksid (N_2O), formiran procesima denitrifikacije i nitrifikacije, važan je staklenički plin odgovoran za približno 5% ukupnog efekta staklenika (Watson i sur., 1996).

Primjenom novih saznanja o genima odgovornim za iskorištenje te odgovor biljke na dušik, otvara se mogućnost proizvodnje nove generacije sorti zelene revolucije koje bi nadekspresijom proteina GRF4 te NGR5 pokazivale veću efikasnost iskorištenja dušika, ali i povećani prinos pri manjim koncentracijama dušika u odnosu na ranije sorte. Sorte nove zelene revolucije zadržale bi i polupatuljasti rast kao posljedicu akumulacije DELLA proteina te sva poželjna svojstva koja s time

dolaze. Na Slici 10. shematski su prikazana svojstva sorti divljeg tipa, sorti zelene revolucije te nove generacije sorti zelene revolucije s nadekspresijom GRF4 te NGR5 proteina (Xue i sur. , 2020). U svrhu boljeg razumijevanja mehanizama regulacije ovisnih o dušiku bilo bi poželjno proučavati gene srodne genima *NGR5* te *GRF4*.



Slika 10. Shematski prikaz svojstva sorti žitarica divljeg tipa, sorti zelene revolucije koje akumuliraju DELLA proteine te nove generacije sorti zelene revolucije koje akumuliraju DELLA proteine, GRF4 te NGR5 proteine. Ljubičasti pravokutnici predstavljaju visinu biljke, žuti krugovi stvaranje postranih izdanaka, a plavi trokuti efikasnost iskorištenja dušika (Xue i sur. , 2020).

Nova generacija sorti zelene revolucije može se postići križanjima postojećih sorti zelene revolucije s biljkama koje prirodno pokazuju povećanu ekspresiju NGR5 ili GRF4 proteina ili metodama genetskog inženjstva.

6. Zaključak

Razumijevanje mehanizama ekspresije gena *GRF4* (*GROWTH-REGULATING FACTOR 4*) te *NGR5* (*NITROGEN-MEDIATED TILLER GROWTH RESPONSE 5*) predstavlja prvi korak za razvijanje nove generacije sorti zelene revolucije. Nadekspsijom *GRF4* proteina može se pospješiti efikasnost korištenja dušika sorti zelene revolucije, bez interferencije s akumulacijom *DELLA* proteina odgovornih za polu-patuljasti rast. Isto vrijedi i za protein *NGR5*, transkripcijski faktor, čijom se nadekspresijom potiče povećani urod sorti zelene revolucije koji je neovisan o dušiku. Daljnjim istraživanjima bilo bi potrebno pomnije ispitati ove, ali i njima srodne gene, te križanjima ili korištenjem genetske modifikacije postići sorte s pojačanom ekspresijom istih.

7. Literatura

- Berry P.M. (2013): Lodging Resistance in Cereals. U: Christou P., Savin R., Costa-Pierce B.A., Misztal I., Whitelaw C.B.A. (ur.) Sustainable Food Production. Springer, New York, NY.
- Briney A. (2021): History and Overview of the Green Revolution. ThoughtCo. <https://www.thoughtco.com/green-revolution-overview-1434948> (pristupljeno: 14.8.2021.)
- Folger T. (2014): The Next Green Revolution. National Geographic Magazine. <https://www.nationalgeographic.com/foodfeatures/green-revolution/> (pristupljeno: 6.7.2021.)
- Gale M. D. & Marshall G. A. (1976): The chromosomal location of *Gai1* and *Rht1* genes for gibberellin insensitivity and semi-dwarfism, in a derivative of Norin 10 wheat. *Heredity* 37: 283-289.
- Gao Y., Xu Z., Zhang L., Li S., Wang S., Yang H., Liu X., Zeng D., Liu Q., Qian Q., Zhang B., Zhou Y. (2020): MYB61 is regulated by GRF4 and promotes nitrogen utilization and biomass production in rice. *Nature Communications* 11 (5219).
- Harberd N. P. (2003): Relieving DELLA restraint. *Science* 299 (5614): 1853-1854.
- Harberd N. P., Belfield E., Yasumura Y. (2009): The Angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA Growth Regulatory Mechanism: How an “Inhibitor of an Inhibitor” Enables Flexible Response to Fluctuating Environments. *The Plant Cell* 21 (5): 1328–1339.
- Hawkesford M. J. (2014): Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *Journal of cereal science* 59 (3): 276-283.
- Hedden P. (2003): The genes of the Green Revolution. *TRENDS in Genetics* 19 (1): 5-9.
- Höring H. & Chapman D. (2004): Nitrates and Nitrites in Drinking Water. World Health Organization Drinking Water Series. IWA Publishing, London.
- Howarth R. W., Billen G., Swaney D., Townsend A., Jaworski N., Lajtha K., Downing J. A., Elmgren R., Caraco N., Jordan T., Berendse F., Freney J., Kudeyarov V., Murdoch P.,

- Zhu Z. L. (1996): Regional nitrogen budgets and riverine N&P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences. *Biogeochemistry* 35: 75-139.
- Howarth R.W. & Marino R. (2006): Nitrogen as the limiting nutrient for eutrofication in coastal marine ecosystems: evolving views over three decades. *Limnol. Oceanogr.* 51: 364-376.
- International Rice Research Institute (1967): Annual Report for 1966. 59–82.
- Ladha J. K., Pathak H., Krupnik T. J., Six J., van Kessel C. (2005): Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. *Advances in agronomy* 87: 85-156.
- Li B. Z., Merrick M., Li S. M., Li H. Y., Zhu S. W., Shi W. M., Su Y. H. (2009): Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. *Rice Science* 16 (4): 314-322.
- Li S., Tian Y., Wu K., Ye Y., Y, J., Zhang J., ... & Fu X. (2018): Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature* 560 (7720): 595-600.
- Merriam-Webster. green revolution. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/green%20revolution> (pristupljeno: 13.8.2021.)
- Monna L., Kitazawa N., Yoshino R., Suzuki J., Masuda H., Maehar, Y., ... & Minobe Y. (2002): Positional cloning of rice semidwarfing gene, sd-1: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA research* 9 (1): 11-17.
- Ortiz R., Mowbray D., Dowsell C., Rajaram, S. (2007): Dedication: Norman E. Borlaug The humanitarian plant scientist who changed the world. *Plant Breeding Reviews* 28 (1).
- Pearce S., Saville R., Vaughan S. P., Chandler P. M., Wilhelm E. P., Sparks C. A., ... & Thomas S. G. (2011): Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat. *Plant physiology* 157 (4): 1820-1831.
- Peng J., Carol P., Richards D. E., King K. E., Cowling R. J., Murphy G. P., Harberd N. P. (1997): The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & development* 11 (23): 3194-3205.

- Peng J., Richards D. E., Hartley N. M., Murphy G. P., Devos K. M., Flintham J. E., ... & Harberd N. P. (1999): 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400 (6741): 256-261.
- Sasaki A., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Swapan D., ... & Matsuoka M. (2002): A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416 (6882): 701-702.
- Spielmeyer W., Ellis M. H., Chandler P. M. (2002): Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (13): 9043-9048.
- Sun H., Qian Q., Wu K., Luo J., Wang S., Zhang C., ... & Fu X. (2014): Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice. *Nature genetics* 46 (6): 652-656.
- Taiz L. & Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- The Nobel prize. Norman Borlaug Biographical.
<https://www.nobelprize.org/prizes/peace/1970/borlaug/biographical/> (pristupljeno: 13.8.2021.)
- Watson R. T., Zinyowera M. C., Moss R. H., Dokken D. J. (1996): *Climate Change 1995, Impacts, Adaptations and Mitigation of Climate Change: Scientific-Technical Analyses*. Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, USA.
- Winkler R. G. & Freeling M. (1994): Physiological genetics of the dominant gibberellin non-responsive maize dwarfs, Dwarf8 and Dwarf9. *Plant* 193: 341-348.
- Wolfe A.H. & Patz J.A. (2002): Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio* 31 (2): 120-125.
- World Health Organization (WHO) (1999): *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London.
- World Health Organization (WHO) (2004): *Guidelines for Drinking Water Quality*, third ed. WHO, Geneva.

Wu K., Wang S., Song W., Zhang J., Wang Y., Liu Q., ... & Fu X. (2020): Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice. *Science* 367 (6478).

Xue H., Zhang Y., Xiao G. (2020): Neo-gibberellin signaling: Guiding the next generation of the green revolution. *Trends in plant science* 25 (6): 520-522.

8. Sažetak

Zelenom revolucijom uvedene su polu-patuljaste sorte pšenice i riže koje su zbog lakšeg uzgoja i većeg prinosa ubrzo postale temelj poljoprivrede. (Peng i sur. , 1999; Hedden, 2003). Ove sorte akumuliraju DELLA proteine koji onemogućavaju transkripciju gena ovisnih o giberelinu te sprječavaju produžni rast biljke. Sorte zelene revolucije pokazuju smanjenu efikasnost korištenja dušika zbog čega se pri uzgoju koriste velike količine dušičnih gnojiva štetnih za okoliš. Protein GRF4 transkripcijski je aktivator koji potiče transkripciju gena odgovornih za asimilaciju i metabolizam dušika te utječe na metabolizam ugljika. Akumulacija DELLA proteina sprječava pozitivnu regulaciju gena posredovanu GRF4 proteinom (Li i sur. , 2018). Za sorte zelene revolucije karakterističan je i povećan prinos pri većoj koncentraciji dostupnog dušika. Za ovakav odgovor odgovoran je transkripcijski faktor NGR5 koji potiče dušik ovisnu H3K27me3 metilaciju histona posredovanu kompleksom PRC2. Ova metilacija reprimira gene odgovorne za inhibiciju lateralnog grananja i povećanog broja izdanaka. NGR5 razgrađuje se u prisustvu giberelina posredstvom GID1 receptora. Akumulacija DELLA proteina kompetitivno inhibira ovu razgradnju, čime stabilizira NGR5 te posljedično potiče stvaranje izdanaka (Wu i sur. , 2020). Nadekspresijom GRF4 te NGR5 proteina može se pospješiti efikasnost iskorištenja dušika te povećati prinos sorti zelene revolucije neovisno o dušiku, bez narušavanja patuljastog fenotipa.

Ključne riječi: zelena revolucija, polu-patuljaste sorte, giberelin, dušična gnojiva, *NGR5*, *GRF4*

9. Summary

During the Green Revolution semi-dwarf varieties of wheat and rice were introduced, which quickly became the basis of today's agriculture due to easier cultivation and higher yields. (Peng et al., 1999; Hedden, 2003). These varieties accumulate DELLA proteins that prevent the transcription of the gibberellin-dependent genes, thereby preventing plant growth. Green revolution varieties show reduced nitrogen use efficiency, which is why large amounts of nitrogen fertilizers have to be used in their cultivation. Excess nitrogen fertilizers can be harmful for the environment. The GRF4 protein is a transcriptional activator that stimulates the transcription of genes responsible for nitrogen assimilation and metabolism, but also affects carbon metabolism. Accumulation of DELLA proteins prevents positive regulation of genes mediated by the GRF4

protein (Li et al., 2018). One of the characteristics of the Green revolution varieties is also increased yield at higher concentrations of available nitrogen. The protein responsible for this response is the transcription factor NGR5 which stimulates nitrogen dependent H3K27me3 histone methylation mediated by the PRC2 complex. This methylation represses the genes responsible for inhibiting lateral branching. NGR5 is degraded in the presence of gibberellin via the GID1 receptor. Accumulation of DELLA proteins competitively inhibits this degradation, thereby stabilizing NGR5 and consequently stimulating tillering (Wu et al., 2020). Overexpression of GRF4 and NGR5 proteins can enhance nitrogen use efficiency and increase the yield of Green Revolution varieties even in low nitrogen conditions, without interfering with the semi-dwarf phenotype.

Key words: the Green Revolution, semi-dwarf varieties, gibberellin, nitrogen fertilizers, *NGR5*, *GRF4*

10. Životopis

Rođena sam u Zagrebu, 2000. godine, gdje nakon završene osnovne škole i gimnazije krećem na preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. S odličnim uspjehom izvršavam svoje fakultetske obaveze te sam posljednje tri godine dobitnica državne stipendije u STEM područjima znanosti. Na fakultetu također odrađujem laboratorijsku stručnu praksu u sklopu Zavoda za biokemiju. Tečna sam govornica njemačkog i engleskog jezika, a u slobodno vrijeme bavim se sportom i glazbom.