Produkti ekspresije gena za peroksidaze i lakaze tijekom lignifikacije u ječmu (Hordeum vulgare L.)

Paić, Ana-Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:181:296955

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ana-Marija Paić

Produkti ekspresije gena za peroksidaze i lakaze tijekom lignifikacije u ječmu (*Hordeum vulgare* L.)

Završni rad

Osijek, 2018. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

PRODUKTI EKSPRESIJE GENA ZA PEROKSIDAZE I LAKAZE TIJEKOM LIGNIFIKACIJE U JEČMU (*Hordeum vulgare L.*)

Ana-Marija Paić

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka

Mentor: prof.dr.sc. Vera Cesar

Komentor: doc. dr.sc. Selma Mlinarić

Kratak sažetak završnog rada:
Peroksidaze i lakaze su enzimi koji sudjeluju oksidaciji ligninskih podjedinica (monolignola) u slobodne radikale koji se povezuju i tvore molekulu lignina. U ovom radu proučavan je sadržaj lignina, te specifična aktivnost peroksidaza i lakaza u stabljici ječma (*Hordeum vulgare L.*) sorte Astor tijekom faze klasanja. Izmjerena je aktivnost dviju izoformi peroksidaza i lakaza: ionske (kationske) i kovalentno vezane (anionske). Proporcionalno sadržaju lignina, najveća aktivnost ukupnih peroksidaza i lakaza kao i obje izoforme izmjerena je u prvom internodiju.

Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: lignin, internodiji, gvajakol, siringaldazin, izoforme

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

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

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

PEROXIDASE AND LACCASE GENE EXPRESSION PRODUCTS DURING LIGNIFICATION IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)

Ana-Marija Paić

Thesis performed at: Laboratory of Plant Cell and Molecular Biology

Supervisor: PhD Vera Cesar, Full professor

Co-mentor: PhD Selma Mlinarić, Assistant professor

Short abstract:

Peroxidases and laccases are enzymes involved in the polymerization of monolignols into the lignin molecule. Both enzymes are capable to oxidize monolignols into free radicals that serve as intermediates during the process of lignification. In this work, lignin content and the specific activity of peroxidase and laccase was studied in the stem of spring barley (*Hordeum vulgare L.*) cultivar Astor at heading. Also, activity of both isoforms of peroxidase and laccase was measured: ionic (cationic) and covalently bound (anionic) peroxidases. Proportionally to the lignin content, the highest activity of total peroxidase and laccases as well as both isoforms, was measured in first internode.

Original in: Croatian
Key words: lignin, internodes, guaiacol, syringaldazine, isoforms

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

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. LIGNIFIKACIJA 1

1.2. PEROKSIDAZE 1

1.3. LAKAZE 2

1.4. JEČAM 3

1.5. CILJ RADA 4

2. MATERIJALI I METODE 5

2.1. UZORKOVANJE BILJNOG TKIVA 5

2.2. IZOLACIJA UKUPNIH TOPLJIVIH PROTEINA 5

2.3. IZOLACIJA STANIČNE STIJENKE 6

2.4. MJERENJE AKTIVNOSTI PEROKSIDAZA 6

2.5. MJERENJE AKTIVNOSTI LAKAZA 7

2.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA LIGNINA 7

2.7. OBRADA REZULTATA 8

3. REZULTATI 9

3.1. SADRŽAJ LIGNINA U STABLJICI TIJEKOM FAZE KLASANJA 9

3.2. AKTIVNOST PEROKSIDAZA U STABLJICI JEČMA TIJEKOM FAZE KLASANJA 9

3.3. AKTIVNOST LAKAZA U STABLJICI JEČMA TIJEKOM FAZE KLASANJA 11

4. RASPRAVA 14

5. ZAKLJUČCI 17

6. LITERATURA 18

1. UVOD

1.1. LIGNIFIKACIJA

Lignin je složeni fenilpropanski polimer primarno izveden iz tri aromatska alkohola: p-kumarila, koniferila i sinapilnog alkohola (koji se još nazivaju i monolignolima). Lignin je ključna strukturna komponenta koja služi za očuvanje integriteta stanične stijenke, koja pruža čvrstoću vaskularnim biljkama, omogućuje transport vode i otopljenih tvari kroz provodne elemente vaskularnog sustava te osigurava fizičku prepreku za fitopatogene i druge oblike stresa iz okoliša.

Lignifikacija je stanični proces u kojemu se lignin ugrađuje u staničnu stijenku. Ovaj se proces odvija u tri faze: (1) biosinteza monolignola u citosolu, (2) prijenos monolignola do stanične stijenke, (3) zatim njihova oksidativna dehidrogenacija i polimerizacija (Liu, C.J. 2012).

U usporedbi s ostalim polimerima stanične stijenke kao što su pektini i hemiceluloza, koji ne nastaju na staničnoj stijenci već se do nje prenose, stvaranje ligninskih polimera odvija se izravno u staničnoj stijenci oksidativnom polimerizacijom prethodno stvorenih lingninskih monomera (Barros, J. i sur. 2015).

1.2. PEROKSIDAZE

Peroksidaze su enzimi prisutni u tkivima životinja, biljaka i mikroorganizama, a uloga im je katalizacija oksidoredukcija između vodikovog peroksida (H_2O_2) i različitih drugih reducensa. Peroksidaze sudjeluju u procesima lignifikacije, suberinizacije, katabolizmu auksina, zatim u procesima cijeljenja rana te u obrani od patogena. U pojedinim biljnim vrstama, peroksidaze postoje kao izoenzimi i svaki od tih izoenzima ima različite aminokiselinske ostatke. Oni pokazuju različitu ekspresiju te prema tome možemo zaključiti da su uključeni u različite fiziološke procese (Hiraga, S. i sur. 2001).

Peroksidaze i lakaze sudjeluju u procesu lignifikacije katalizirajući oksidaciju ligninskih prekusrora (monolignola) u završnom koraku sinteze lignina (Boerjan i sur., 2003).

U prijašnjim istraživanjima (Kukavica sur., 2012) pokazano je da stanična stijenka korijena graška (*Pisum sativum* L.) sadrži dvije skupine peroksidaza svrstane na temelju njihove izoelektroforetičke pokretljivosti: kationske peroksidaze vezane ionskim vezama te anionske peorksidaze vezane kovalentnim vezama. Ionske i kovalentno vezane peroksidaze posjeduju specifične karakteristike i strukturu te različite domene za vezanje unutar stanične stijenke.

1.3. LAKAZE

Lakaze su glikoproteini koji sadrže bakar te, u odnosu na peroksidaze, one koriste kisik umjesto vodikovog peroksida za oksidaciju svojih supstrata (Zhao, Q. i sur. 2013). Pronađene su kod viših biljaka, gljiva, bakterija i člankonožaca (Gavnholt, B., Larsen, K. 2002). Lakaze su vjerojatno uključene u brojne biološke procese te je o ovoj porodici enzima poznato da postoje različiti oblici u različitim tipovima organizama. Neka istraživanja dala su dokaze da je aktivnost lakaza usko povezana sa taloženjem lignina u ksilemu je u razvoju (Gavnholt, B., Larsen, K. 2002).

Pretpostavlja se da bi, budući da djeluju u odsustvu toksičnog vodikovog peroksida, upravo lakaze mogle imati važnu ulogu u ranim stadijima lignifikacije živih stanica (Gavnholt, B., Larsen, K. 2002). Također, lakaze bi mogle biti osnovni enzim lignifikacije u uvjetima gdje je koncentracija lignina postigla razinu kada središnja lamela postaje toliko hidrofobna da je većina vode i vodikovog peroksida uklonjena, ali je kisik i dalje dostupan (Gavnholt, B., Larsen, K. 2002).

Što se tiče katalitičkih mehanizama, lakaze su jedne od najviše proučavanih oksidaza. Većina do sada otkrivenih lakaza su izvanstanični enzimi koji se znatno razlikuju prema svojem redoks potencijalu, sadržaju ugljikohidrata, toplinskoj stabilnosti te specifičnosti pri izboru supstrata (Sharma i Kuhad, 2008).

1.4. JEČAM

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice trava (*Poaceae*). Morfologija ječma je slična kao i kod ostalih žitarica sa nekoliko razlika u građi klasa i lista. Korijen je žiličast i slaba mu je usisna snaga. Stabljika ima 5-7 nodija i internodija, može narasti i do 1,5 m, šuplja je i sklona polijeganju. Ječam može oblikovati do pet sekundarnih stabljika. List se sastoji od lisnog rukavca i plojke i sličan je listu ostalih žitarica. Za razliku od ostalih žitarica u usjeku klasnog vretena ječma može biti zbijen jedan, dva ili tri klasića. Plod je pšeno, građeno kao i u ostalih pravih žitarica (Denffer i Ziegler 1982).

Razvoj ječma dijeli se u nekoliko faza, a započinje klijanjem i nicanjem, nakon čega slijedi busanje, vlatanje, klasanje, cvatnja, formiranje zrna, nalijevanje zrna te voštana i puna zrioba kojom završava razvoj. Početak faze klasanja označava pojava klasa koji izlazi iz rukavca gornjeg lista.

1.5. CILJ RADA

Stabljika ječma tijekom razvoja prolazi različite promjene povezane s ulaganjem lignina u staničnu stijenku. Peroksidaze su enzimi ključni u procesu lignifikacije, a njihova aktivnost se mijenja duž stabljike tijekom svake faze razvoja.

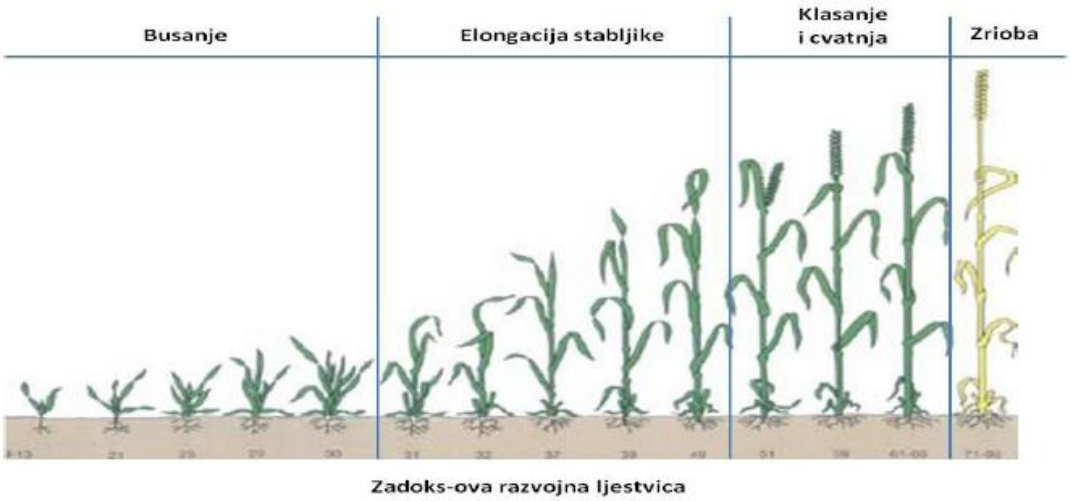
Ciljevi ovog rada su:

1. Utvrditi aktivnost ukupnih peroksidaza i lakaza.
2. Utvrditi aktivnosti kovalentno i ionski vezanih peroksidaza i lakaza u staničnoj stijenci stabljike ječma.
3. Odrediti sadržaj lignina u različitim internodijima stabljike sorte Astor tijekom faze klasanja.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. UZORKOVANJE BILJNOG TKIVA

Kao biljni materijal korišten je jari ječam sorte Astor. Uzorci su prikupljeni u fazi klasanja koja je određena je na temelju fenotipskih karakteristika, a za analizu su uzeta tri donja internodija. Za određivanje razvojnog stadija ječma koristila se ljestvica po Zadoksu (slika 1), (Zadoks i sur. 1974).



Slika 1. Zadoks-ova ili decimalna razvojna ljestvica

Nakon skupljanja uzorci su smrznuti tekućim dušikom i pohranjeni na -80°C. Za sve biokemijske i molekularne analize, tkivo je usitnjeno u tekućem dušiku korištenjem tučka i tarionika.

2.2. IZOLACIJA UKUPNIH TOPLJIVIH PROTEINA

Za izolaciju ukupnih peroksidaza (tPOD) i lakaza (tLACC) korišten je 100 mM Tris pufer (pH = 8,0) uz dodatak 25%-tnog glicerola i polivinilpirolidona (PVP). Odvagano je oko 0,5 g biljnog praha i stavljeno u prethodno izvagane tubice, dodan je 1 mL ekstrakcijskog pufera i zatim sve dobro promiješano na vrtložnoj miješalici. Uzorak se zatim 15 minuta ekstrahirao na ledu. Nakon toga je uzorak centrifugiran 10 minuta pri 18 000 g na +4°C, zatim je postupak ponovljen, a supernatanti su spojeni.

Koncentracija proteina u svim uzorcima određena je metodom po Bradfordu (Bradford 1976). Za izradu baždarne krivulje korištena je otopina albumina goveđeg seruma koncentracije 1 mg/mL.

2.3. IZOLACIJA STANIČNE STIJENKE

Stanična stijenka izolirana je prema protokolu Kukavica i sur., 2012. uz modifikacije. Za izolaciju ionski vezanih peroksidaza (iPOD) i lakaza (iLACC) iz stanične stijenke, korišten je 50 mM Tris pufer (pH = 7,2) uz dodatak 50 mM NaCl i 0,05%-tni Tween 20. Odvagano je oko 0,5 g biljnog tkiva i premješteno u prethodno izvagane tubice te je dodan ekstrakcijski pufer. Homogenat je sonificiran 1 minutu, a zatim 20 minuta centrifugiran pri 1000 *g*. Talog koji sadrži staničnu stijenku je zatim 4 puta uzastopno ispiran sa čistim Tris puferom, promiješan na vrtložnoj miješalici, centrifugiran pri 1000 g na +4°C, a nakon toga resuspendiran u 1M NaCl u 50 mM Trisu. Homogenat je nakon toga inkubiran 24 sata na +4°C. Nakon inkubacije, homogenat je centrifugiran 5 minuta pri 1000 g. Na talog je ponovo dodan 1M NaCl u 50 mM Trisu, promiješan na vrtložnoj miješalici, centrifugiran pri 1000 g na +4°C. Supernatanti koji su sadržavali ionski vezane peroksidaze (iPOD) i lakaze (iLACC) pohranjeni su na -20°C.

Talog koji je preostao korišten je za izolaciju kovalentno vezanih peroksidaza (cPOD) i lakaza (cLACC). Talog je opran 4 puta uzastopno s 50mM TRIS puferom (pH = 7,2), a nakon svakog ispiranja, sadržaj je centrifugiran 3 puta po 5 minuta te zadnji puta 15 minuta pri 1000 g. Nakon ispiranja slijedila je digestija taloga 24 sata na +4°C u 50mM Tris puferu (pH = 7,2) uz dodatak 0,5%-tne celulaze i 2,5%-tne pektinaze. Nakon digestije sadržaj je centrifugiran 15 minuta pri 1000 g te je supernatant ponovno sačuvan za analizu.

2.4. MJERENJE AKTIVNOSTI PEROKSIDAZA

Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti peroksidaza sastojala se od 5 mM gvajakola i 5 mM vodikovog peroksida u 0,2 M fosfatnom puferu (pH = 5,8). Aktivnost je mjerena spektrofotometrom (Spekord 40, Analytik Jena) na 470 nm, u plastičnoj kiveti, svake sekunde tijekom dvije minute koristeći gvajakol kao supstrat (Siegel i Galston, 1967).

Aktivnost se mjerila u ukupnom volumenu od 1 mL, a je volumen uzorka ovisio o skupini peroksidaza (10 µL za tPOD, 60 µL za cPOD te 150 µL za iPOD). Ukupnu izražena je kao promjena apsorbancije u minuti izražena po masi proteina (ΔA_{470} min^{-1} g^{-1}proteina).

2.5. MJERENJE AKTIVNOSTI LAKAZA

Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti sastojala se od 50 mM K-fosfatnog pufera pH= 7,0 u koji je dodano 45 µM siringaldazina (pripremljen na način da je 0,002 g siringaldazina otopljeno u 5 ml smjese 50% aceton: 50% metanol) te 10 µL vodikovog peroksida.
Aktivnost je mjerena spektrofotometrom na 530 nm, svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. Ukupni volumen iznosio je 1 ml gdje je volumen uzorka također ovisio o skupini peroksidaza (10 µL za iPOD i tPOD te 100 µl za cPOD). Ukupna aktivnost izražena je kao promjenu apsorbancije u minuti izraženu po masi proteina (ΔA_{530} $min^{-1}g^{-1}$prot.).

2.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA LIGNINA

Količina lignina preostalog nakon razgradnje 72%-tnom sulfatnom kiselinom određuje se gravimetrijski i naziva se Klasonov lignin (Kirk i Obst 1988), odnosno predstavlja lignin netopljiv u kiselini. Lignin koji je topljiv u kiselini mjerimo spektrofotometrijski koristeći ekstinkcijski koeficijent za lignin (Dence i Lin 1992).

2.6.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KLASONOVOG LIGNINA

Prije određivanja lignina uzorci su se sušili 48 sati na 65°C u sušioniku te su samljeveni u mlinu koristeći sito s otvorima od 0,5 cm. Uzorci su ekstrahirani u 80% etanolu 30 minuta na 80°C u vodenoj kupelji, centrifugirani na 1000 g te je dekantiran supernatant nakon svake inkubacije. Postupak je ponovljen četiri puta. U posljednjem koraku talog je opran 96% acetonom i uzorci su se sušili preko noći u sušioniku na 70°C.

Nadalje, izvagano je po 100 mg ekstrahiranog tkiva, od svakog uzorka po tri primjerka. Stavljeni su u Erlenmeyerove tikvice od 150 mL, a zatim je dodano 1,5 mL 72%-tne sulfatne

kiseline. Uzorci su se inkubirali 1 sat na 30°C u vodenoj kupelji uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije, 72%-tna sulfatna kiselina razrijeđena je destiliranom vodom do 4%, a uzorci su autoklavirani 1 sat na 121°C. Uzorci su filtrirani na prethodno izvagane filter papire, filtrati su odvojeni za određivanje topljivog lignina, a talog je ispran vrućom destiliranom vodom do neutralne reakcije. Filter papiri su se preko noći sušili u sušioniku na 70°C do konstantne mase te su sljedeći dan izvagani (Begović 2013).

2.6.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA LIGNINA TOPLJIVOG U KISELINI

Tijekom postupka određivanja sadržaja Klasonovog lignina, u filtratu se zadržava dio lignina koji je topljiv u sulfatnoj kiselini. Topljivi lignin određen je spektrofotometrijski pri čemu je mjerena apsorbancija na 205 nm u kvarcnoj kiveti dodatkom 200 µL uzorka i 1800 µL destilirane vode, destilirana voda poslužila je i kao slijepa proba.
Sadržaj lignina izražen je kao ukupni lignin, koji predstavlja zbroj Klasonovog i lignina topljivog u kiselini, u miligramima po gramu suhe tvari (mg/g s.t.).

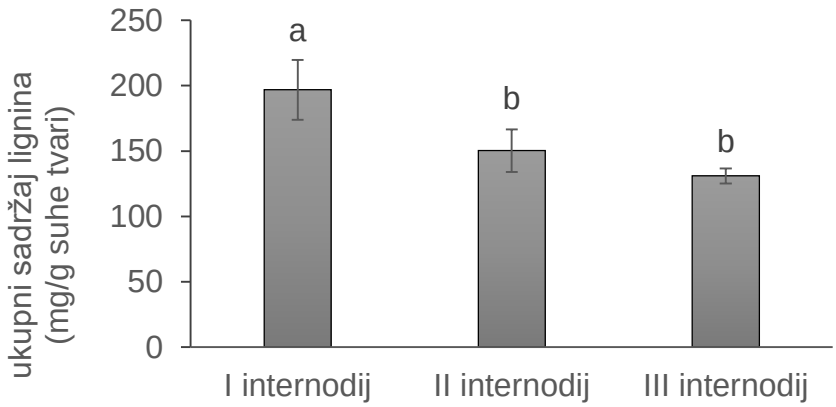
2.7. OBRADA REZULTATA

Podaci su statistički obrađeni u programu StatSoft Inc. STATISTICA, verzija 12 (2015). Korištena je analiza varijance (engl. analysis of variance – ANOVA) te *post hoc* statistički test značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – LSD (engl. least significant difference). Rezultati analize varijance i LSD testa su prikazani slovima. Različita slova značе statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. SADRŽAJ LIGNINA U STABLJICI TIJEKOM FAZE KLASANJA

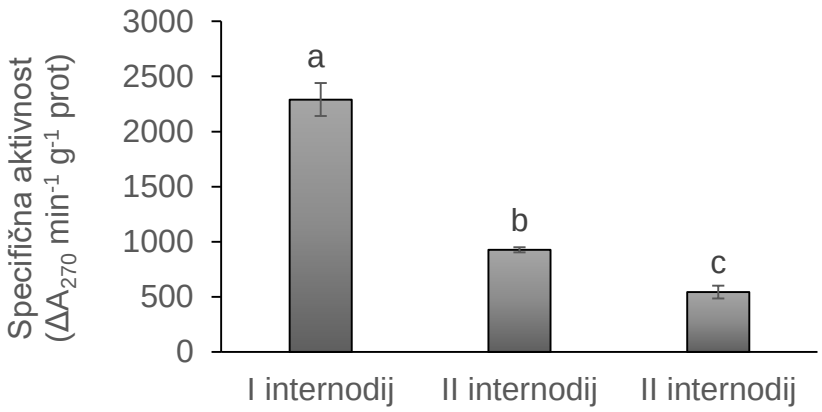
Tijekom faze klasanja, najveći sadržaj ukupnog lignina izmjeren je u prvom internodiju. Između drugog i trećeg internodija nema statistički značajne razlike u ukupnom sadržaju lignina, ali postoji statistički značajna razlika u odnosu na prvi internodij (slika 2).



Slika 2. Ukupni sadržaj lignina u tri donja internodija stabljike ječma tijekom faze klasanja (mg/g suhe tvari). Stupci predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija (SD).

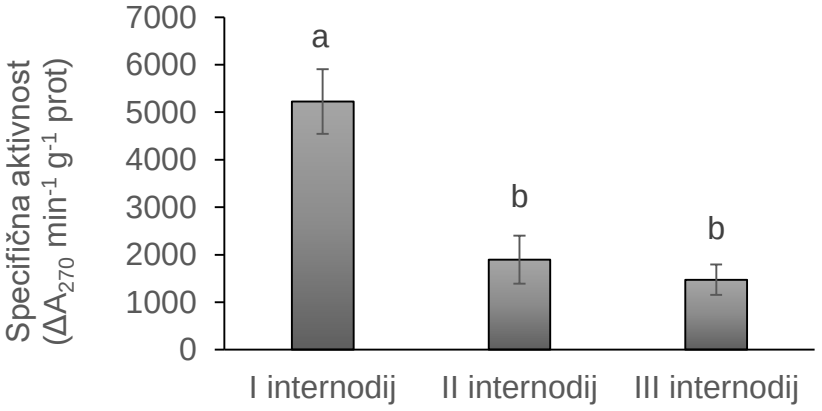
3.2. AKTIVNOST PEROKSIDAZA U STABLJICI JEČMA TIJEKOM FAZE KLASANJA

Najveća aktivnost ukupnih peroksidaza (tPOD) izmjerena je u prvom, najstarijem, internodiju i smanjuje se u drugom i trećem (slika 3).



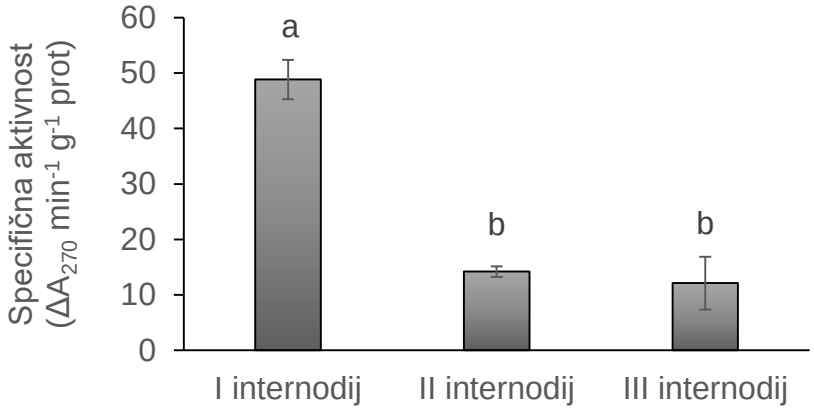
Slika 3. Specifična aktivnost ukupnih peroksidaza (tPOD) izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu proteina (ΔA_{270} min^{-1} g^{-1} prot.). Različito slovo označava statističku značajnost $p \leq 0,05$. Stupci predstavljaju po jedan internodij, a vrijednost svakog internodija izražena je kao srednja vrijednost tri replike (n=3) ± standardna devijacija (SD).

Na grafikonu koji prikazuje aktivnost ionskih peroksidaza (iPOD) (slika 4) aktivnost ionskih peroksidaza se smanjuje od prvog do drugog internodija, dok između drugog i trećeg internodija nema statistički značajne razlike.



Slika 4. Specifična aktivnost ionskih peroksidaza (iPOD) izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu proteina (ΔA_{270} min^{-1} g^{-1} prot.). Različito slovo označava statističku značajnost $P \leq 0,05$. Stupci predstavljaju po jedan internodij, a vrijednost svakog internodija izražena je kao srednja vrijednost dobivena iz tri replike ± standardna devijacija (SD).

Mjerenjem je utvrđena značajna razlika između aktivnosti kovalentno vezanih peroksidaza prvog i ostala dva internodija, dok se aktivnosti izmjerene u drugom i trećem internodiju ne razlikuju značajno (slika 5).

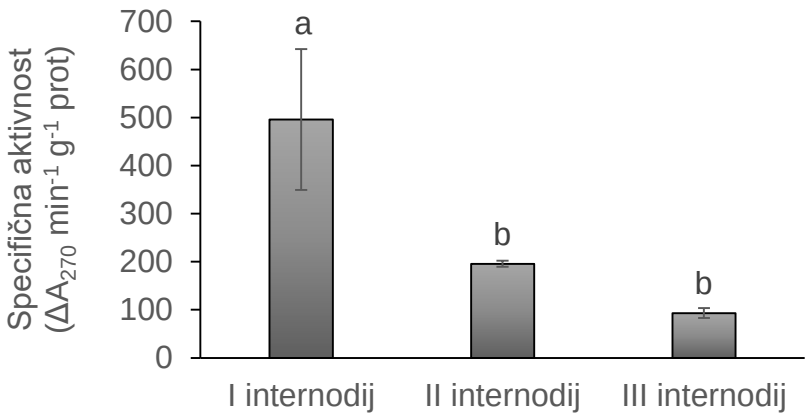


Slika 5. Specifična aktivnost kovalentno vezanih peroksidaza (cPOD) izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu proteina (ΔA_{270} min^{-1} g^{-1} prot.). Različito slovo označava statističku značajnost $P \leq 0,05$. Stupci predstavljaju po jedan internodij, a vrijednost svakog internodija izražena je kao srednja vrijednost dobivena iz tri replike ± standardna devijacija (SD).

3.3. AKTIVNOST LAKAZA U STABLJICI JEČMA TIJEKOM FAZE KLASANJA

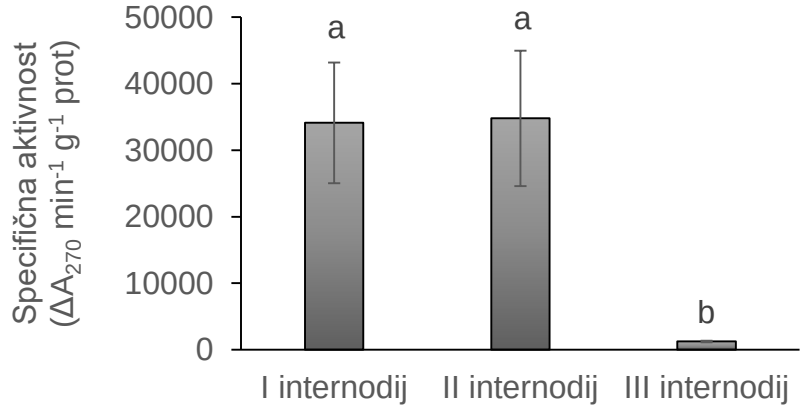
Za mjerenje aktivnosti lakaza kao supstrat korišten je siringaldazin. Najveća aktivnost lakaza izmjerena je u prvom internodiju te se u drugom i trećem internodiju smanjuje. Ovi rezultati prikazani su na sljedeća tri grafikona (slika 6, slika 7 i slika 8) gdje su prikazane ukupne lakaze (tLACC), ionske lakaze (iLACC) te kovalentno vezane lakaze (cLACC).

Iz grafikona prikazanog na slici 6 možemo vidjeti da je aktivnost ukupnih lakaza (tLACC) najveća u prvom i smanjuje se u drugom i trećem internodiju. Između drugog i trećeg internodija ne postoji statistički značajna razlika, dok se oni statistički značajno razlikuju od prvog internodija.



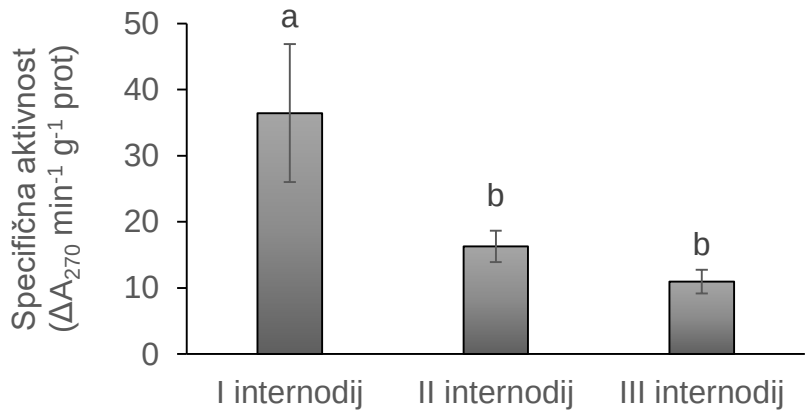
Slika 6. Specifična aktivnost ukupnih lakaza (tLACC) izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu proteina (ΔA_{270} min^{-1} g^{-1} prot.). Različito slovo označava statističku značajnost P≤0,05. Stupci predstavljaju po jedan internodij, a vrijednost svakog internodija izražena je kao srednja vrijednost dobivena iz tri replike ± standardna devijacija (SD).

U slučaju aktivnosti ionskih lakaza (iLACC) koju prikazuje slika 7, vidimo da je aktivnost ionskih lakaza u prva dva internodija podjednaka, odnosno nema statistički značajne razlike. Aktivnost u trećem internodiju se značajno smanjuje u odnos na u odnosu na prvi i drugi internodij.



Slika 7. Specifična aktivnost ionskih lakaza (iLACC) izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu proteina (ΔA_{270} min^{-1} g^{-1} prot.). Različito slovo označava statističku značajnost P≤0,05. Stupci predstavljaju po jedan internodij, a vrijednost svakog internodija izražena je kao srednja vrijednost dobivena iz tri replike ± standardna devijacija (SD).

Slika 8 prikazuje aktivnost kovalentno vezanih lakaza (cLACC). Iz grafikona možemo vidjeti da aktivnost kovalentnih lakaza postepeno opada od prvog prema trećem internodiju, a između drugog i trećeg internodija ne postoji statistički značajna razlika.



Slika 8. Specifična aktivnost kovalentno vezanih lakaza (cLACC) izražena kao promjena apsorbancije u minuti po gramu proteina (ΔA_{270} min^{-1} g^{-1} prot.). Različito slovo označava statističku značajnost $P \leq 0,05$. Stupci predstavljaju po jedan internodij, a vrijednost svakog internodija izražena je kao srednja vrijednost dobivena iz tri replike ± standardna devijacija (SD).

4. RASPRAVA

Određivanjem ukupnog sadržaja lignina utvrđeno je da je najviše lignina prisutno u prvom internodiju u usporedbi s drugim i trećim internodijem, koji je sadržavao najmanju količinu lignina. Pretpostavlja se da je primarni razlog tome ulaganje lignina u staničnu stijenku što ukazuje na prestanak elongacije samih internodija (Begović i sur. 2015).

Peroksidaze su enzimi koji sudjeluju u procesu lignifikacije katalizirajući oksidaciju ligninskih prekursora u završnom koraku sinteze lignina (Boerjan i sur., 2003). Povezanost peroksidaza i lignifikacije potvrdili su rezultati dobiveni ovim radom. Usporedimo li ukupni sadržaj lignina u internodijima stabljike ječma (slika 2) i specifičnu aktivnost ukupnih peroksidaza (slika 3), ionskih peroksidaza (slika 4) te kovalentno vezanih peroksidaza (slika 5), možemo vidjeti da je ukupni sadržaj lignina proporcionalan aktivnosti ovih peroksidaza. Sadržaj lignina, te ujedno i aktivnost peroksidaza, najveći je u prvom, najrazvijenijem internodiju, dok idući prema mlađem, vršnom internodiju vrijednost opada. Razlog tome je što se u mladim internodijima stanice brzo izdužuju uz minimalno učvršćivanje stanične stijenke, a lignifikacija je ograničena samo na određene dijelove. Kako sazrijevanje napreduje, završava se izduljivanje te stanična stijenka postaje zadebljana i lignificiraju se različiti tipovi stanica (Cesarino i sur., 2012).

Osim povezanosti sadržaja lignina i aktivnosti peroksidaza, uočava se i povezanost ovih dvaju čimbenika i stadija razvoja internodija. Kao što je već rečeno, sadržaj lignina i aktivnost peroksidaza povećani su u starijim, odnosno razvijenijim internodijima. Povezanost stadija razvijenosti stabljike i lignifikacije uočena je u istraživanjima na biljci *Zinnia elegans*, jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice glavočika (*Asteraceae*). Princip lignifikacije sadnica *Z. elegans* jedinstven je jer u određenoj fazi razdoblja istodobno nudi dva modela lignifikacije koji sliče onima koji se odvijaju kod golosjemenjača i kritosjemenjača. Istraživanje modela lignifikacije na *Z. elegans* pokazuje da stariji dijelovi biljke sadrže veću količinu lignina (Ros Barcelo, A. i sur., 2004).

Ionske peroksidaze su ujedno i kationske, dok su kovalentno vezane peroksidaze anionske. Ionske i kovalentno vezane peroksidaze pokazuju specifičan afinitet prema supstratima te imaju različitu osjetljivost na inhibitore i toplinu. Izoforme peroksidaza razlikuju se ovisno o načinu vezanja za staničnu stijenku te prema tome svaka izoforma ima specifičnu i određenu funkciju. Kationska izoforma (iPOD) uključena je u elongaciju stanica, dok je

anionska izoforma (cPOD) uključena u stvaranje stanične stijenke i lignifikaciju (Kukavica, B.M. i sur., 2012). Usporedimo li dobivene rezultate, možemo vidjeti da su i ionske (slika 4) i kovalentno vezane peroksidaze (slika 5) prisutne u sva tri internodija ječma te su obje izoforme podjednako zastupljene.

Lakaze, enzimi koji uz peroksidaze, sudjeluju u polimerizaciji monolignola u molekulu lignina. Dokaz koji potvrđuje povezanost ovih enzima s lignifikacijom nalazimo u činjenici da su oba enzima sposobna *in vitro* oksidirati monolignole u slobodne radikale koji služe kao intermedijeri u cijelom procesu lignifikacije (Whetten, r., Sederoff, R., 1995). Usporedimo li dobivene rezultate, vidimo da su peroksidaze (slika 3, 4 i 5) i lakaze (slika 6, 7 i 8) u podjednakom omjeru prisutne u svakom od određenih internodija. Najveća aktivnost i peroksidaza i lakaza izmjerena je u prvom, najrazvijenijem internodiju uz iznimku ionskih lakaza (slika 7), gdje rezultati pokazuju da je aktivnost lakaza podjednaka u prvom i drugom internodiju.

Usporedimo li međusobno određene izoforme lakaza: ionske lakaze (slika 7), kovalentno vezane lakaze (slika 8) te njihovu ukupnu aktivnost (slika 6), vidimo da je najveća aktivnost ovih izoformi uočena u prvom internodiju te da, idući prema mlađim internodijima, njihova aktivnost opada, ali s mnogo manjim razlikama u odnosu na ukupne peroksidaze. Objašnjenje ovoga možemo pronaći u činjenici da lakaze djeluju u odsustvu vodikovog peroksida te stoga sudjeluju u ranim fazama lignifikacije živih stanica (Gavnholt, B., Larsen, K., 2002). Odnosno, moguće je da su lakaze primjerice potrebne za započinjanje biosinteze lignina, dok peroksidaze pridonose formiranju lignina u kasnijim stadijima razvoje (Koutanemi i sur., 2015). Upravo iz tog razloga, usporedbom aktivnosti ukupnih peroksidaza (slika 3) i ukupnih lakaza (slika 6), zatim ionskih peroksidaza (slika 3) i ionskih lakaza (slika 7) te kovalentno vezanih peroksidaza (slika 5) i kovalentno vezanih lakaza (slika 8) vidimo da je izmjerena aktivnost svih izoformi peroksidaza nešto veća od izmjerene aktivnosti svih izoformi lakaza.

Još jedan od važnih parametara je odnos između ukupnog sadržaja lignina i aktivnosti lakaza. Usporedbom dobivenih aktivnosti ukupnih lakaza (slika 6), ionskih lakaza (slika 7) i kovalentno vezanih lakaza (slika 8) s ukupnim sadržajem lignina (slika 2), vidimo da je najveća aktivnost svih izoformi lakaza izmjerena u prvom internodiju u kojem je ujedno prisutan i najveći ukupni sadržaj lignina.

Kako je već rečeno i peroksidaze kao i lakaze mogu *in vitro* oksidirati monolignole, a aktivnost lakaza znanstvenici su otkrili u lignificirajućim staničnim stijenkama diferencirajućeg ksilema (Chang-Yun, L., 2012). Konkretno, u kulturi obične smreke (*Picea abies*) peroksidaze su se pokazale kao glavni enzimi u aktivaciji monolignola koji sudjeluju u stvaranju lignina. Međutim, u genomu smreke detektirani su i brojni geni za lakaze, a neke od lakaza bile su eksprimirane u ksilemu u razvoju te u kulturi tkiva tijekom procesa lignifikacije (Koutanemi i sur., 2015). Dakle, budući da je u našim uzorcima izmjerena aktivnost lakaza, možemo zaključiti da su one prisutne i u stabljici ječma te na specifičan način sudjeluju u sintezi lignina.

5. ZAKLJUČCI

Peroksidaze i lakaze ključni enzimi u lignifikaciji staničnih stijenki živih stanica, a svaki od enzima uključen je u ovaj proces nekom svojom specifičnom aktivnošću i ulogom. Svojim zajedničkim djelovanjem ovi enzimi omogućuju stvaranje lignina, koji je pak ključna makromolekula u održavanju mehaničke čvrstoće biljne stabljike.

Iz dobivenih rezultata možemo izvesti sljedeće zaključke:

1. Sadržaj lignina se mijenja duž stabljike: stariji, razvijeniji internodiji stabljike ječma sadrže veću količinu lignina, a sadržaj se smanjuje prema najmlađim dijelovima stabljike.
2. Ukupna aktivnost peroksidaza i lakaza najveća je u prvom internodiju, a najmanja u trećem internodiju. Aktivnost ovih enzima raste s razvojem stabljike ječma.
3. Aktivnost peroksidaza i lakaza podudara se s ukupnim sadržajem lignina u određenim internodijima ječma (*Hordeum vulgare L.*).

6. LITERATURA

Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E. (2015) The cell biology of lignification in higher plants. Annals of Botany 15: 1053-1074.

Begović, L. (2013) Anatomski, fiziološki i molekularni biljezi lignifikacije u razvoju stabljike jarog ječma (*Hordeum vulgare* L.). Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Begović, L., Ravlić, J., Lepeduš, H., Leljak-Levanić, D., Cesar, V. (2015) The pattern of lignin deposition in the cell walls of internodes during barley (*Hordeum vulgare* L.) development. Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica 57: 55-66.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003) Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 54: 519-546.

Cesarino, I., Araujo, P., Sampaio Mayer, J. L., Paes Leme, A. F., Mazzafera, P. (2012) Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. Plant Physiology and Biochemistry 55: 66-76.

Denffer, D.,Ziegler, H., (1982) Morfologija i fiziologija. Školska knjiga, Zagreb

Fagerstedt, K. V., Kukkola, E. M., Koistinen, V. V. T., Takahashi, J., Marjamaa, K. (2010) Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce. Journal of Integrative Plant Biology 52: 186-194.

Gavnholt, B., Larsen, K. (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. Physiologia Plantarum 116: 273-280.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. Plant and Cell Physiology 42: 462-468.

Kirk, T.K., Obst, J.R. (1988) Lignin determination. U: Wood, W., Kellogg, S., Abelson, J., M. Simon (ur.) Methods in enzymology – Biomass, part B: lignin, pectin and chitin. Academic Press. Inc., San Diego, str. 87-101.

Koutaniemi, S., Malmberg, H.A., Simola, L.K., Teeri, T.H., Kärkönen, A. (2015) Norway spruce (*Picea abies*) laccases: Characterization of a laccase in a lignin-forming tissue culture. Journal of Integrative Plant Biology 57: 341-348.

Liu, C.J. (2012) Deciphering the enigma of lignification: Precursor transport, oxidation, and the topochemistry of lignin assembly. Molecular Plant 5: 304-317.

Ros Barcelo, A., Gómez Ros, L.V., Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Carrión, J.S., Pedreño, M.A. (2004) Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? Phytochemistry Reviews 3: 61-84.

Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., Fu, C., Yun, J., Shao, H., Wang, X., Wang, Z.-Y., Dixon, R.A. (2013) Laccase Is Necessary and Nonredundant with Peroxidase for Lignin Polymerizatin during Vascular Development in *Arabidopsis*. The Plant Cell 25: 3976-3987.

Sharma, K.K., Kuhad, R.C. (2008) Laccase: enzyme revisited and function redefined. Indian Journal of Microbiology 48: 309-316.

Whetten, R., Sederoff, R. (1995) Lignin biosynthesis. The Plant Cell 7: 1001-1013.