UČINAK TRANSGENA ZA KRIPTOGEIN NA AKTIVNOST FENILALANIN-AMONIJ-LIJAZE U KOSMATOM KORIJENJU UKRASNE KOPRIVE (Coleus blumei BENTH.)

Pavičić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2013

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:181:455635

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

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU
Diplomski znanstveni studij biologije

Martina Pavičić

Učinak transgena za kriptogein na aktivnost fenilalanin-amonij-lijaze u kosmatom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.)

Diplomski rad

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UČINAK TRANSGENA ZA KRIPTOGEIN NA AKTIVNOST FENILALANIN-AMONIJ-LIJAZE U KOSMATOM KORIJENJU UKRASNE KOPRIVE (*Coleus blumei* BENTH.)

Martina Pavičić

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
Mentor: Dr. sc. Elizabeta Has-Schön, redovita profesorica
Neposredni voditelj: Dr. sc. Rosemary Vuković

Kratak sažetak diplomskog rada: Akumulacija ružmarinske kiseline (RA) u biljkama se često javlja kao dio obrambenog odgovora biljke na stres i napad patogena. Prvi korak biosinteze RA, neoksidativnu deaminaciju L-fenilalanina pri čemu nastaje trans-cimetna kiselina, katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza (PAL). U staničnoj kulturi ukrasne koprive pojačanoj sintezi RA prethodi pojačana aktivnost PAL. Cilj ovog rada da bio je istražiti utjecaj endogeno sintetiziranog oomicetalnog elicitora *β*-kriptogeina na aktivnost enzima PAL i biosintezu ružmarinske kiseline. U tu svrhu uzgojeno je transgeno korijenje ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.), u kojem se sintetički gen *cryp*t nalazi pod kontrolom inducibilnog alkoholnog promotora, te tretirano etanolom kako bi se inducirala sinteza *β*-kriptogeina. Ekspresija *β*-kriptogeina povećala je aktivnost enzima PAL, ali je uzrokovala značajno smanjenje sadržaja ružmarinske kiseline u linijama transgenog korijenja.

Broj stranica: 38
Broj slika: 13
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 93
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: *Coleus blumei*, fenilalanin-amonij-lijaza, kosmato korijenje, *β*-kriptogein, ružmarinska kiselina

Datum obrane: 25. listopada 2013.
Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Dr. sc. Ivna Štolfa, docentica
2. Dr. sc. Elizabeta Has-Schön, redovita profesorica
3. Dr. sc. Ljiljana Krstin, docentica

Rad je pohranjen u:
U knjižnici Odjela za biologiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

BASIC DOCUMENTACION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Graduate study of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

EFFECT OF *β*-CRYPTOGEIN TRANSGENE ON PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE ACTIVITY IN PAINTED NETTLE (*Coleus blumei* BENTH.) HAIRY ROOTS

Martina Pavičić

Thesis performed at: Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek
Supervisor: Ph. D. Elizabeta Has-Schön, Full Professor
Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

Short abstract: The accumulation of rosmarinic acid (RA) in plants often occurs as part of the plant defense response to stress and pathogen attack. The first step of RA biosynthesis, non-oxidative deamination of L-phenylalanine to trans-cinnamic acid, is catalyzed by the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme. In cell culture of painted nettle enhanced synthesis of RA precedes to increased PAL activity. The aim of this study was to investigate the effect of endogenously synthesized oomycetal elicitor *β*-cryptogein on the PAL enzyme activity and rosmarinic acid biosynthesis. For this purpose transgenic roots of painted nettle (*Coleus blumei* Benth.) were grown, in which a synthetic gene *crypt* was under the control of alcohol inducible promoter and treated with ethanol to induce synthesis of *β*-cryptogein. Expression of *β*-cryptogein increased the activity of PAL enzyme but caused a significant decrease of rosmarinic acid content in the genetic lines of transgenic roots.

Number of page: 38
Number of figures: 13
Number of tables: 1
Number of reference: 93
Original in: Croatian
Key words: *Coleus blumei*, *β*-cryptogein, hairy roots, phenylalanine ammonia-lyase, rosmarinic acid

Date of the thesis defence: 25th October 2013.
Reviewers:
1. Ph. D. Ivna Štolfa, Assistant Professor
2. Ph. D. Elizabeta Has-Schön, Full Professor
3. Ph. D. Ljiljana Krstin, Assistant Professor

Thesis deposited in:
Library of Department of Biology, University of J.J.Strossmayer in Osijek

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Elizabeti Has-Schön na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Od srca se zahvaljujem asistentici dr. sc. Rosemary Vuković na ukazanom povjerenju, strpljenju, korisnim savjetima i velikoj pomoći u eksperimentalnom radu te pregledu cjelokupnog diplomskog rada. Hvala Vam što ste nesebično prenijeli na mene svoje znanje i potaknuli me da napredujem u daljnjem znanstvenom radu. Veliko hvala i na prijateljskim razgovorima zbog kojih mi je izrada ovog diplomskog rada bila puno jednostavnija.

Hvala svim kolegama i prijateljima bez kojih studij ne bi prošao tako zabavno.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima koji su mi svojim velikim odricanjima omogućili studiranje, te bratu i sestri koji su me podržavali kroz sve godine studiranja i proživljavali samnom sve moje ispite. Uvijek ste mi u životu bili uzor, potpora, motivacija i najveća snaga, stoga je ovaj rad i napravljen za ponos vama i meni.

Posebno se zahvaljujem mojem Christianu što mi je bio najveća moguća motivacija da svoj studij privedem kraju. Hvala na neizmjernoj ljubavi, beskrajnoj podršci i vjeri u moj uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Ukrasna kopriva (*Coleus blumei* Benth.) 1
1.2. Ružmarinska kiselina 1
1.2.1. Svojstva ružmarinske kiseline 2
1.2.2. Proizvodnja ružmarinske kiseline 2
1.2.3. Biosinteza ružmarinske kiseline 3
1.3. Fenilalanin-amonij-lijaza 5
1.4. Kultura kosmatog korijenja 6
1.5. Biotički elicitori 7
1.5.1. Beta-kriptogein 8
1.6. Inducibilni promotor reguliran alkoholom 10
1.7. Cilj istraživanja 11
2. MATERIJALI I METODE 12
2.1. Materijali 12
2.1.1. Kemikalije 12
2.1.2. Uređaji 13
2.1.3. Biljni materijal 13
2.1.4. Hranjive podloge 16
2.2. Metode 17
2.2.1. Kultura biljnog tkiva 17
2.2.2. Indukcija sinteze *β*-kriptogeina u transgenom korjenju 17
2.2.3. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina 18
2.2.4. Određivanje aktivnosti fenilalanin-amonij-lijaze 18
2.2.5. Određivanje koncentracije proteina 19
2.2.6. Priprema etanolnog ekstrakta tkiva kosmatog korijenja ukrasne koprive 19
2.2.7. Određivanje sadržaja ružmarinske kiseline direktnom UV metodom 19
2.2.8. Određivanje sadržaja ružmarinske kiseline metodom po Öztürku 20
2.3. Statistička obrada podataka 20
3. REZULTATI 21
3.1. Aktivnost fenilalanin-amonij-lijaze u transgenom korijenju ukrasne koprive 21
3.2. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive određen direktnom UV metodom 23

3.3. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive određen metodom po Öztürku 25
4. RASPRAVA 27
5. ZAKLJUČAK 31
6. LITERATURA 32

1. UVOD

1.1. Ukrasna kopriva (*Coleus blumei* Benth.)

Rod *Coleus* pripada porodici usnača (Lamiaceae) i obuhvaća više od 300 vrsta koje su karateristične za tropska i suptropska područja Afrike, Australije, istočne Indije, indonezijskog arhipelaga i Filipina (Lebowitz, 1985), a jedna od njih je i ukrasna kopriva (*Coleus blumei* Benth.). U Europu, a kasnije i u Ameriku donešena je u 17. st. putem trgovaca i botaničara. Ime roda potječe od grčkog "koleus" što znači plašt, a odnosi se na građu cvjetova dok je pridjev "blumei" ova vrsta dobila u čast nizozemskog pisca Karla Ludwiga Blumea. Prema novijoj klasifikaciji ukrasna je kopriva smještena u rod *Solenostemon*, s latinskim nazivom vrste *Solenostemon scutellarioides*. Ukrasna kopriva je ukrasna biljka koja se uzgaja diljem svijeta u velikom broju različitih kultivara koji se razlikuju prema boji i obliku listova, a koristi se i kao ljekovita biljka u Indiji, Indoneziji i Meksiku. Jedan od najznačajnijih sekundarnih metabolita koji proizvodi ukrasna kopriva je ružmarinska kiselina koja predstavlja važan dio obrambenog sustava biljke u borbi protiv predatora te gljivičnih i bakterijskih infekcija (Petersen, 1994).

1.2. Ružmarinska kiselina

Ružmarinska kiselina (RA) je ester kavine kiseline i 3,4-dihidroksifenilmliječne kiseline te pripada skupini fenolnih sekundarnih metabolita. Kemijska struktura je utvrđena 1958. kada su dvojica talijanskih kemičara, Scarpati i Oriente, prvi puta izolirali RA kao čisti spoj i nazvali ga prema biljci iz koje je prvi put izoliran – ružmarinu (*Rosmarinus officinalis*). Prije nego što je kemijska struktura bila razjašnjena, RA i njoj slični spojevi bili su poznati kao "Labiatengerbstoffe", a riječ je o tipu tanina koji je zastupljen u većine vrsta koje pripadaju porodici Lamiaceae (Scarpati i Oriente, 1958). Osim u ružmarinu, aktivni je sastojak mnogih drugih biljaka iz porodice Lamiaceae i Boraginaceae (Litvinenko i sur., 1975) koje se primjenjuju u medicini i prehrani kao što su matičnjak (*Melissa officinalis*), kadulja (*Salvia officinalis*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), lavanda (*Lavandula vera*), origano (*Origanum vulgare*), timijan (*Thymus vulgaris*) i dr. (Lu i Foo, 1999; Kochan i sur., 1999; Zheng i Wang, 2001).

1.2.1. Svojstva ružmarinske kiseline

Ružmarinska kiselina ima višestruko biološko djelovanje poput antivirusnog, antibakterijskog, protuupalnog, antioksidativnog, antialergijskog i antimutagenog djelovanja, stoga njezino prisutstvo u ljekovitom bilju i začinima daje blagotvoran i pozitivan učinak na zdravlje čovjeka, dok ju biljke prvenstveno sintetiziraju da bi sebe zaštitile od napada raznih mikrooganizama, parazita i od biljojeda. RA u prvom redu predstavlja spoj koji sudjeluje u konstitutivnoj obrani biljke. Zbog svog protuvirusnog djelovanja ekstrakti matičnjaka koji sadrže RA se koriste u terapijama infekcija uzrokovanih herpesom. Protuupalna svojstva RA se temelje na njenoj inhibiciji djelovanja lipooksigenaza i ciklooksigenaza te na inhibiciji ekspresije proupalnih citokina. Ne pokazuje štetne učinke na ljudski organizam, nije toksična, brzo se odstranjuje iz cirkulacije nakon intravenske primjene, ne utječe na kratkoročno i dugoročno pamćenje, ne uzrokuje oštećenje DNA, apoptozu niti smanjuje staničnu vijabilnost (Parnham i Kesselring, 1985). Antioksidativno djelovanje jače je i od vitamina E, stoga fenolni spojevi poput RA naročito pomažu u sprečavanju oštećenja stanica uzrokovanih slobodnim radikalima, čime se smanjuje rizik za rak i aterosklerozu, a kao jaki antioksidans našla je primjenu i u kozmetičkoj industriji (D'Amelio, 1999). Kineski bosiljak (*Perilla ocymoides*), bogat RA, koristi se ponajviše zbog njenog antialergijskog djelovanja. Istraživanja su pokazala kako je oralno uzimanje RA učinkovito pri intervenciji za alergijske astme (Sanbogi i sur., 2004) te da potiskuje sinovitis u miševa i koristan je za liječenje reumatoidnog artritisa (Youn i sur., 2003). Za razliku od anithistaminika, RA sprječava aktivaciju odgovora imunoloških stanica koje uzrokuju oticanje i stvaranje tekućine.

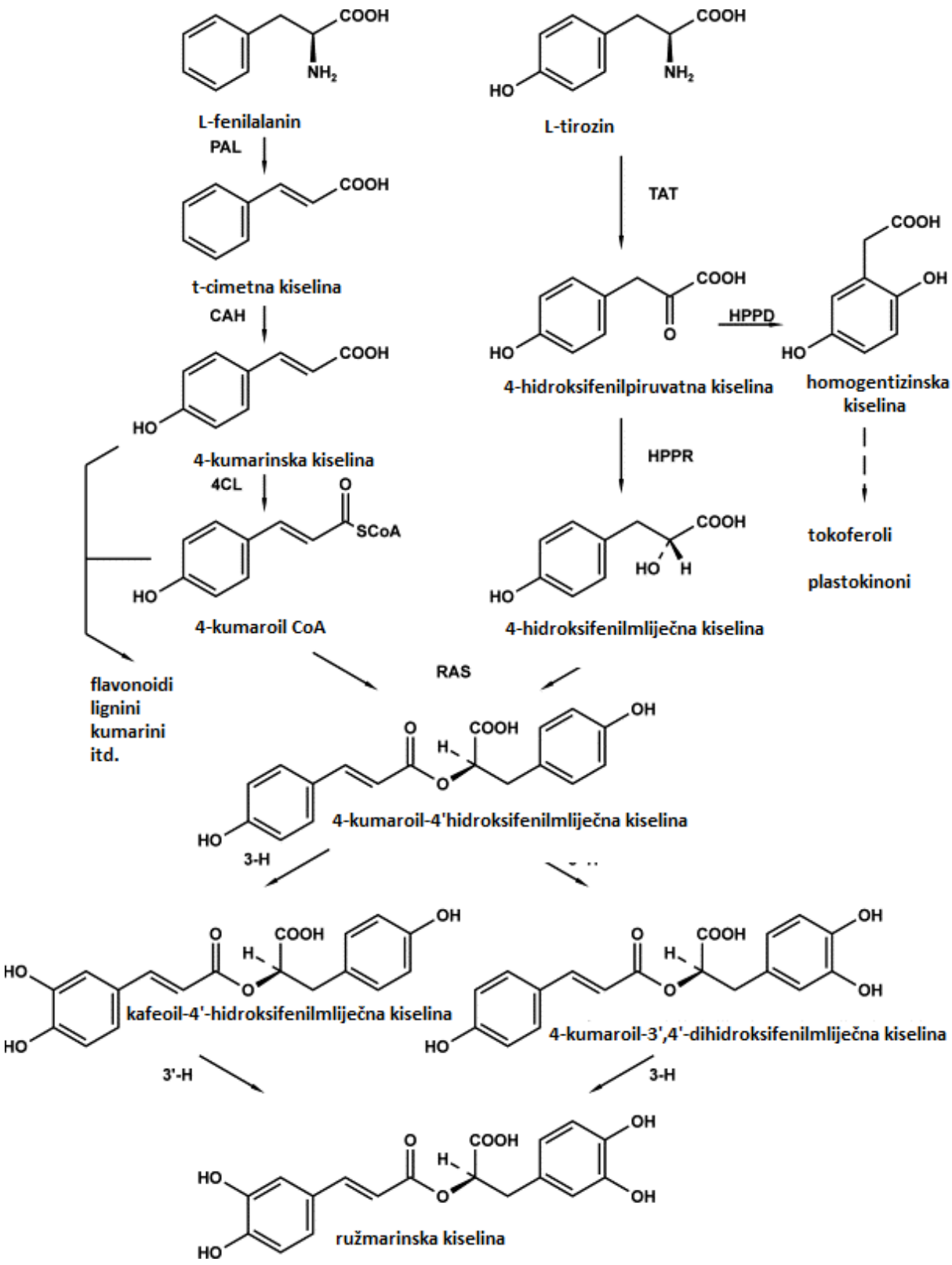
1.2.2. Proizvodnja ružmarinske kiseline

Ružmarinska kiselina se lako akumulira u nediferenciranim kulturama biljnih stanica i to u koncentracijama koje su u nekim slučajevima puno veće od onih koje se akumuliraju u samoj biljci. Pri prvim pokušajima biotehnološke proizvodnje RA korištene su suspenzijske kulture biljnih stanica ukrasne koprive (Razzaque i Ellis, 1977), jer je utvrđeno da mogu akumulirati i do 21% RA u suhoj tvari. Kasnije su u biotehnološkoj proizvodnji RA korištene i kulture biljnih stanica nekih drugih biljnih vrsta iz porodica Lamiaceae i Boraginaceae, kao što je kadulja (*S. officinalis*). U suspenzijskim kulturama stanica kadulje koje su uzgajane u hranjivoj podlozi niske osmolarnosti s 5% saharoze, izmjerena je najveća moguća količina akumulirane RA, a iznosila je čak 36% suhe tvari (Hippolyte i sur., 1992). Studije provedene na već spomenutim suspenzijskim kulturama ukrasne koprive su također pokazale da je

akumulacija RA između ostalog ovisna i o sadržaju saharoze u hranjivoj podlozi (Gertlowski i Petersen, 1993). Povećana koncentracija saharoze u hranjivoj podlozi pojačava akumulaciju RA, a stimulirajući učinak povećanih koncentracija saharoze osim u suspenzijskim kulturama stanica ukrasne koprive, zapažen je i u kulturama izdanka (Meinhard i sur., 1993). Nekoliko autora je pokazalo kako akumulacija RA može biti pojačana i dodatkom gljivičnih elicitora (ekstrakt kvasca) ili metil-jasmonatom (Szabo i sur., 1999). Osim toga, suspenzija stanica ukrasne koprive korištena je kao vrlo podoban sustav za istraživanje biosintetskog puta RA (Petersen, 1997).

1.2.3. Biosinteza ružmarinske kiseline

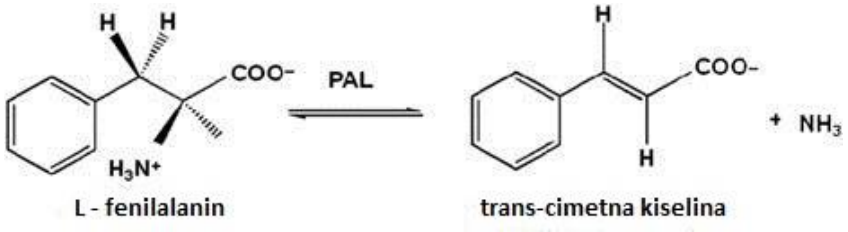
Ružmarinska kiselina se sintetizira iz aromatskih aminokiselina fenilalanina (Phe) i tirozina (Tyr) koji se odvojenim biosintetskim putevima prevode u međuprodukte 4-kumaroil-CoA i 4-hidroksifenilmliječnu kiselinu (Ellis i Towers, 1970). Enzimi uključeni u biosintezu RA otkriveni su u suspenzijskim kulturama volujka (*Anchusa officinalis*) i ukrasne koprive (Petersen i sur., 1993; Petersen, 1997). Phe prelazi u 4-kumaroil-CoA pomoću enzima općeg fenilpropanoidnog puta: fenilalanin-amonij-lijaze (PAL), cinamat-4-hidroksilaze (C4H) i 4-kumarat: koenzim A ligaze (4CL). Tyr se reakcijom transaminacije koju katalizira enzim tirozin-aminotransferaza (TAT) uz pomoć kosupstrata 2-oksoglutarata prevodi najprije u 4-hidroksifenilpiruvatnu kiselinu, a zatim se reducira u 4-hidroksifenilmliječnu kiselinu djelovanjem enzima hidroksifenilpiruvat-reduktaze (HPPR). Spajanjem 4-kumaroil-CoA i 4-hidroksifenilmliječne kiseline dolazi do formiranja estera 4-kumaroil-4-hidroksifenilmliječne kiseline uz izdvajanje koenzima A, a reakciju katalizira enzim sintaza ružmarinske kiseline (RAS). Pomoću citokrom P450 monooksigenaza hidroksiliraju se 3 i 3' mjesto aromatskih prstena estera 4-kumaroil-4-hidroksifenilmliječne kiseline te nastaje RA (Slika 1). U biosintezi sudjeluje osam enzima, no samo četiri enzima su specifično vezani za biosintezu RA. Biosinteza RA je detaljno istraživana iz dva razloga. Prvi razlog je taj što se pokazao korisnim spojem zbog svojih ljekovitih svojstava i kao dodatak hrani u svakodnevnoj prehrani te zbog sudjelovanja u konstituiranoj obrani biljke protiv mikroba (Szabo i sur., 1999). Drugi razlog predstavlja izazov za razjašnjavanjem ove zanimljive biosinteze koja se sastoji od dvaju paralelnih biosintetskih putova reguliranih na koordinirani način (Matsuno, 2002).



Slika 1. Biosinteza ružmarinske kiseline. Modificirano prema Petersen i Simmonds, 2002.

1.3. Fenilalanin-amonij-lijaza

Fenilalanin-amonij-lijaza (PAL, EC 4.3.1.24) je enzim koji katalizira spontanu, neoksidativnu deaminaciju L-fenilalanina pri čemu nastaje trans-cimetna kiselina i amonijak (Koukol i Conn, 1961; Slika 2).

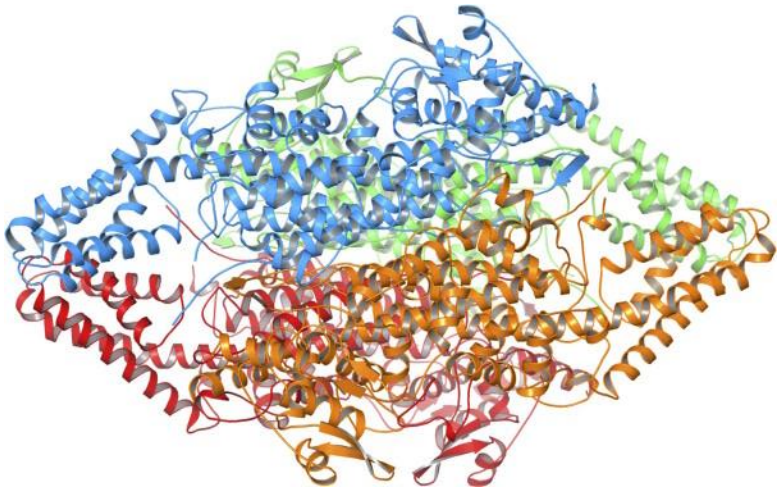


Slika 2. Neoksidativna deaminacija L-fenilalanina katalizirana enzimom L-fenilalanin-amonij-lijazom. Izvor: Web 1.

Široko je rasprostranjen u višim biljkama (Koukol i Conn, 1961; Whetten i Sederoff, 1992), nekim gljivama (Sikora i Marzluff, 1982), kvascu (Marusich i sur., 1981; Orndorff i sur., 1988) i nekim prokariotima (*Streptomyces*, Bezanson i sur., 1970). PAL je tetramerni homoprotein sastavljen od četiri identične podjedinice uglavnom sastavljene od alfa zavojnica (Calabrese i sur., 2004; Slika 3). Parovi monomera formiraju protomer s jednim aktivnim mjestom koje je sastavljeno od sedam alfa zavojnica te sadrži kofaktor metiliden-imidazolon (MIO). Kofaktor MIO smješten je na pozitivnom polu triju polarnih zavojnica u aktivnom mjestu enzima što dodatno povećava njegovu elektrofilnost (Alunni i sur., 2003). Prostetički elektrofil MIO u aktivnom mjestu enzima napada aromatski prsten L-Phe u Friedel-Craftsovom tipu reakcija što dovodi do aktivacije i kidanja ugljik-vodik veze (Schuster i Retey, 1995; Gloge i sur., 1998; Langer i sur., 2001) uz izdvajanje karbanionskog intermedijarnog produkta koji je stabiliziran djelomičnim pozitivnim regijama u aktivnom mjestu (Alunni i sur., 2003).

PAL može obavljati različite funkcije u različitim vrstama. U mikroorganizmima ima kataboličku ulogu omogućujući im da koriste L-Phe kao jedini izvor ugljika i dušika (Fritz i sur., 1976), a u višim biljkama ima ulogu ključnog biosintetskog enzima fenilpropanoidnog biosintetskog puta koji katalizira prvi korak u sintezi fenolnih sekundarnih metabolita kao što su flavonoidi, fenilpropanoidi i lignini (Fritz i sur., 1976; Tanaka i sur., 1989). Aktivnost PAL je inducirana odgovorom na različite podražaje kao što su ranjavanje tkiva, napadi patogena, UV zračenje, svjetlo, niske temperature, niska razina dušika, fosfata ili željeza, te utjecaj hormona (Dixon i Paiva, 1995). Istraživanja su pokazala da uvođenje L-Phe u fermentacijski

medij značajno potiče aktivnost PAL. Nakamichi i sur. (1983) su istražili da i druge aminokiseline, kao što su D-izoleucin i L-izoleucin, D-leucin i L-leucin, L-metionin, L-triptofan i L-Tyr također induciraju PAL aktivnost kod crvenog kvasca (*Rhodotorula glutinis*).



Slika 3. Struktura enzima fenilalanin-amonij-lijaze. Izvor: Web 2.

1.4. Kultura kosmatog korijenja

Fitopatogene vrste roda *Agrobacterium* uzrokuju bolesti mnogih dikotiledonih biljaka, a patološke promjene ispoljavaju se najčešće u vidu tumora vrata korijena (engl. *crown gall*, *Agrobacterium tumefaciens*) ili kosmatosti korijenja (engl. *hairy root*, *A. rhizogenes*). Kosmato korijenje je biljna bolest uzrokovana gram negativnom bakterijom tla *A. rhizogenes* (Riker i sur., 1930). Bakterija inficira biljno tkivo na ranjenim stanicama te dovodi do stvaranja adventivnog korijenja poznato kao kosmato korijenje. Nastanku kosmatosti prethodi prijenos i integracija T-DNA regije velikoga Ri (eng. root inducing) plazmida iz bakterije u biljni genom, dovodeći do genetičke transformacije biljne stanice. T-DNA Ri-plazmida nosi onkogene za sintezu auksina i *rol* gene čiji produkti povećavaju osjetljivost transformirane biljne stanice na djelovanje auksina. Ekspresijom ovih gena dolazi

do disbalansa biljnih hormona što dovodi do masovne proliferacije transformiranih stanica korijena. Kosmato korijenje ima jedinstveno svojstvo da bude sposobno rasti *in vitro* bez dodatka egzogenih biljnih regulatora rasta (Collier i sur, 2005). Njihov brz rast, nisko vrijeme udvostručavanja, jednostavno održavanje i sposobnost sinteze niza kemijskih spojeva nudi dodatnu prednost kao kontinuirani izvor proizvodnje vrijednih sekundarnih metabolita. Povećana sinteza sekundarnih metabolita zabilježena je u Ri-transformiranim biljkama tilofore (*Tylophora indica*) gdje je sadržaj tiloforina bio 20-60% viši nego u kontroli (Chaudhuri i sur., 2006). Budući da ovo korijenje može sintetizirati više od jednog metabolita pokazali su svoju ekonomičnost u svrhu komercijalne proizvodnje (Giri i Narasu, 2000). Kultura kosmatog korijenja vrijedan je izvor fitokemikalija koje se koriste kao lijekovi, kozmetika i aditivi u prehrani.

1.5. Biotički elicitori

Elicitori su tvari biološkog ili nebiološkog podrijetla koji, u doticaju sa stanicama viših biljaka, mogu izazvati fiziološke i morfološke promjene koje uključuju povećanu sintezu i/ili de novo sintezu sekundarnih metabolita (Benhamou, 1996). Pojam elicitor je u početku korišten za molekule koje potiču proizvodnju fitoaleksina, ali se sada obično koristi za spojeve koji potiču bilo koju vrstu biljnog obrambenog mehanizma. Prema Radman i sur. (2003) elicitori se klasificiraju kao biotički i abiotički, ovisno o njihovom podrijetlu i molekularnoj strukturi. Biotički elicitori su elicitori biološkog podrijetla (plijesni, bakterije, virusi ili herbivori) što uključuje i komponente stanične stijenke biljaka te fitokemikalije koje se otpuštaju na mjestu napada biljke s patogenima i herbivorima. Elicitacija predstavlja efektivnu strategiju za indukciju i povećanje proizvodnje sekundarnih metabolita (Zhao i sur., 2005). Indukcija biosinteze fitoaleksina je dobila posebnu važnost u biotehnološkom pristupu za poboljšanje proizvodnje sekundarnih metabolita, od kojih su mnogi važni terapeutici. Akumulacija RA može biti pojačana gljivičnim elicitorima (Bais i sur., 2002; Kim i sur., 2006). Gljivični elicitori (kvasac) i metil-jasmonat povećavaju aktivnost PAL koji je ključni enzim za biosintezu RA (Petersen i sur., 1993). Metil-jasmonat inducira povećanu biosintezu RA u biljkama kao što su bosiljak (*O. Basilicum*, Kim i sur., 2006), u staničnoj suspenziji ukrasne koprive (Szabo i sur., 1999) i biljke *Lithospermum erythrorhizon* (Tsuruga i sur., 2006) te kulturi dlakavog korijenja biljke *Coleus forskohlii* (Li i sur., 2005). Tretman kvascem potiče biosintezu RA u suspenzijskim kulturama korejske mente (*Agastache rugosa*; Kim i sur., 2001), biljke *L. erythrorhizon* (Tsuruga i sur., 2006) te biljke *Orthosiphon aristatus*

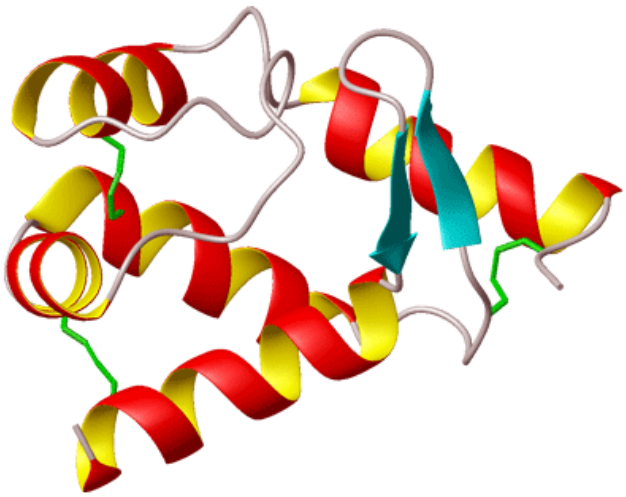
(Sumaryono i sur., 1991) i u kulturama dlakavog korijenja kineske kadulje *(Salvia miltiorrhiza*; Yan i sur., 2006) i biljke *C. forskohlii* (Li i sur., 2005). U nekim slučajevima kvasac i metil-jasmonat nisu utjecali na sadržaj RA ili ga čak smanjuju. Rezultati istraživanja Bauer i sur. (2009) su pokazali da metil-jasmonat stimulira akumulaciju RA u 6 od 11 testiranih klonova, dok ekstrakt kvasca potiče akumulaciju RA u dva klona i smanjenje u pet od ukupno jedanaest testiranih klonova.

Skupini proteinskih elicitora pripadaju i oomicetalni fitopatogeni, tzv. elicitini. Elicitini su obitelj malih visoko konzerviranih holoproteina koje izlučuju vrste fitopatogenih mikroorganizama koji pripadaju rodu *Phytophthora* i *Pythium*. Poznati su kao toksični proteini odgovorni za induciranje nekrotičnog i sustavnog hipersenzitivnog odgovora u biljkama iz obitelji *Solanaceae* i *Cruciferae*. Nekroza lista pruža neposrednu kontrolu nad gljivičnom invazijom i izaziva sustavnu stečenu otpornost, a oba odgovora posreduju osnovnoj zaštiti protiv patogena nakon inokulacije. Članovi ove obitelji se dijele u dvije skupine (α i β-elicitini; Yu, 1995). Alfa-elicitini su vrlo kiseli, s valinskim ostatkom na položaju 13, dok su β-elicitini bazični, s lizinom na istom mjestu. Poznato je da je aminokiselinski ostatak na položaju 13 uključen u kontrolu nekroze, te u vezanju liganada na receptore (Fefeu i sur., 1997). Fenotipski se ove dvije klase elicitora razlikuju i po svojim nekrotičnim svojstvima: β-elicitini su 100 puta više otrovni i osiguravaju bolju zaštitu tijekom naknadnog napada patogena (Yu, 1995).

1.5.1. Beta-kriptogein

Beta-kriptogein (Slika 4) je mali hidrofilni protein veličine 10 kDa kojeg izlučuje fitopatogena oomiceta *Phytophthora cryptogea*. Pripada skupini proteinskih elicitora (elicitina) koji induciraju nekrotični hipersensitivni odgovor u kulturi stanica duhana (*Nicotiana tabacum*, Ricci i sur., 1989, Binet i sur., 2001) i sustavno stjecanje otpornosti kod biljke duhana prema fitoftori *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* i drugim patogenima (Keller i sur., 1996). Pomoću kristalografije i nuklearne magnetske rezonancije utvrđena je trodimenzionalna struktura β-kriptogeina koja otkriva 3 disulfidna mosta, 5 slabije konzerviranih α-petlji na jednoj strani, dok je na drugoj strani visoko konzervirana kljunasta struktura formirana pomoću 2 antiparalelne β-ploče i Ω-petlje (Boissy i sur., 1996; Fefeu i sur., 1997). Istraživanja na suspenzijskim stanicama duhana izvješćuju o postojanju specifičnih visoko afinitetnih mjesta na plazmatskoj membrani duhanskih stanica sa karakteristikama receptora za koje se vežu elicitini (Wendehenne i sur., 1995). Vezanje β-

kriptogeina na receptore izaziva niz metaboličkih događaja u stanicama duhana kao što su nakupljanje fitoaleksina, proizvodnja etilena, promjene u strujanju iona kroz plazmatsku membranu, ekstracelularnu alkalizaciju, acidifikaciju citosola, depolarizaciju potencijala plazmatske membrane, fosforilaciju proteina, aktivaciju NADPH-oksidaze i protein-kinaze, kao i stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki (Bourque i sur., 1998; Lebrun-Garcia i sur., 1998; Tavernier i sur., 1995; 1998; Simon-Plas i sur., 1997). Beta-kriptogein kao protein također posjeduje karakteristike proteinskih nosača lipida jer je u stanju prenositi sterole iz otopine ili sterole umetnute u liposomalne membrane. Poznavanje sekvence aminokiselina *β*-kriptogeina omogućilo je sintezu *crypt* gena čija je ekspresija u *Escherichia coli* vodila ka sintezi biološki aktivnog *β*-kriptogeina koji pokazuje nekrotičnu aktivnost povezanu sa obrambenim odgovorom (O'Donohue i sur., 1995). Genetička transformacija duhana ovim sintetičkim genom pod kontrolom 35S CaMV promotora rezultirala je dvjema neovisnim linijama duhana rezistentnim prema *P. parasitica* var. *nicotianae* (Tepfer i sur., 1998). Osim postizanja otpornosti na napad patogena i abiotički stres, nekoliko istraživanja opisuje transformaciju genom *crypt* u svrhu povećanja sinteze sekundarnih metabolita. U nastojanju da se genetski oponašaju učinci kriptogeina, Chaudhuri i sur. su pomoću bakterije *A. rhizogenes* ugradili sintetički *crypt* gen u transgeno korijenje zimske trešnje (*Withania somnifera*), ladoleža *(Calystegia sepium*) i tilofore (*Tylophora tanakae*). Pokazalo se da je ova genetska preobrazba u korelaciji sa povećanom proizvodnjom sekundarnih metabolita i rasta korijenja u prvih dviju vrsta, i rasta korijenja u trećem, a stimulirala je i akumulaciju kalistegina u transgenom poljskom slaku (*Convolvulus arvensis*), te flavonoida u sjemenu transgenog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*, Chaudhuri i sur., 2009).



Slika 4. Struktura *β*-kriptogeina. Izvor: Web 3.

1.6. Inducibilni promotor reguliran alkoholom

Inducibilni promotori su genski promotori čija je aktivnost izazvana prisutnošću ili odsutnošću biotičkih ili abiotičkih čimbenika i vrlo su moćan alat u genetičkom inženjeringu, jer ekspresija gena koja je vezana za takve promotore može biti uključena ili isključena u određenim fazama razvoja organizma ili u određenom tkivu. Kako bi se omogućila ekspresija ciljanog gena koji će se uključivati i isključivati dodavanjem ili uklanjanjem određene kemikalije razvijeni su kemijski regulirani inducibilni ekspresijski sustavi koji nude velike prednosti i za proučavanje gena *in vivo* i za biotehnološke primjene (Gatz, 1996; Gatz i Lenk, 1998). Aktivnost ovakvih kemijski reguliranih inducibilnih promotora može biti regulirana alkoholom, tetraciklinima, steroidima, metalima ili nekim drugim spojevima.

Inducibilni alkoholni ekspresijski sustav izveden iz filamentozne gljivice *Aspergillus nidulans* kontrolira stanične odgovore na etanol i njemu slične kemikalije (Felenbok, 1991). Temelji se na alc regulonu kojeg čine AlcR transkripcijski čimbenik kojeg kodira alcR gen pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S promotora i promotor alcA gena. ALCR kontrolira aktivaciju gena AlcA koji kodira alkohol dehidrogenazu. U odsutnosti etanola, ALCR protein je neaktivan. Kada se etanol doda, ALCR i etanol stupaju u interakciju i aktivira se ALCR. ALCR se zatim veže na promotor ciljnog gena, kao što su AlcA i izaziva ekspresiju gena. Etanolom inducirani ekspresijski sustav pogodan je za regulaciju ekspresije transgena ili gena koji su prirodno prisutni u genomu biljke, ima visoku specifičnost i učinkovitost, karakterizira ga jednostavnost jer je sastavljen od samo dva čimbenika, a koristi i etanol kao induktor koji je biorazgradiv, jeftin, siguran i jednostavan za laboratorijsku i terensku primjenu (Sweetman i sur., 2002). Uspješno je primjenjen u regulaciji ekspresije gena u uročnjaku (*A. thaliana*, Roslan i sur., 2001), duhanu (*N. tabacum*, Caddick i sur., 1998; Salter i sur., 1998, Sweetman i sur., 2002), krumpiru (*Solanum tuberosum*, Sweetman i sur., 2002), uljanoj repici (*Brassica napus*, Sweetman i sur., 2002) i drugim biljnim vrstama.

1.7. CILJ RADA

Cilj ovog rada je odrediti učinak inducibilne ekspresije gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-kriptogein, na aktivnost enzima fenilalanin-amonij-lijaze i biosintezu ružmarinske kiseline u kosmatom korijenju ukrasne koprive (*C. blumei* Benth.).

U literaturi je opisano nekoliko spektrofotometrijskih metoda za mjerenje koncentracije ružmarinske kiseline, stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi koja je metoda preciznija i pouzdanija za analizu sadržaja ružmarinske kiseline u kosmatom korijenju ukrasne koprive.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

Pri izradi ovoga rada upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- Albumin goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Anorganske soli za pripremu MS hranjive podloge (Tablica 1. Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Boratni pufer, 0.2 M (pH 8.8)
- Boratni pufer, 0.5 M (pH 8.8)
- Boratni pufer, 1 M (pH 8.8)
- Borna kiselina, 1M (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Cirkonij (IV) oksid klorid oktahidrat, 98% (Acros Organics, Belgija)
- Coomassie briljant plavo G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Etanol, 1% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 2% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 70% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 96% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Fosforna kiselina, 85% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Glicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- L-fenilalanin, 0.001 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2-Merkaptoetanol, 0.005 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Mio-inozitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Natrijev hidroksid, 1 M (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Nikotinska kiselina (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Pirodoksin-HCl (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Polivinil-polipirolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ružmarinska kiselina (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Saharoza (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Tiamin-HCl (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)

2.1.2. Uređaji

Za održavanje kulture kosmatog korijenja, određivanje aktivnosti PAL, sadržaja ružmarinske kiseline te koncentracije proteina korišteni su sljedeći uređaji:

- Analitička vaga AB54 (Mettler Toledo, Švicarska)
- Autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- Hladnjak sa zamrzivačem (Gorenje, Slovenija)
- Inkubator (Sutjeska, Jugoslavija)
- Laminar BH 800 (Klimaoprema, Samobor)
- Magnetska mješalica CB162 (Stuart, USA)
- pH metar FE20 – FiveEasy™ (Mettler Toledo, Švicarska)
- UV/VIS spektrofotometar Lamda 2 (Perkin Elmer, USA)
- Stolna centrifuga Z 2233 MK-2 (Hermle, Njemačka)
- Vibracijska mješalica Mini Shaker MS2 (IKA, Njemačka)
- Vodena kupelj WNB (Memmert, Njemačka)

2.1.3. Biljni materijal

U istraživanju je korišteno transgeno korijenje ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.). Šareni hibrid ukrasne koprive (Slika 5) korišten za genetičku transformaciju uzgajan je *in vitro*. Genetička transformacija lisnih eksplantata ukrasne koprive izvedena je pomoću bakterija *A. rhizogenes*, soja A4, koji sadrži binarni vektor pBinSRNA-CRYPT (Slika 6). Binarni vektor sadrži gen *alcR*, koji je pod kontrolom CaMV 35S promotora i *nos* terminatora, te sintetički gen *crypt* (O'Donohue i sur, 1995), koji se nalazi pod kontrolom *alcA* promotora i *nos* terminatora. U odnosu na sekvencu prirodnog *crypt* gena, promijenjena je nukleotidna sekvenca sintetiziranog *crypt* gena tako da uključuje restrikcijska mjesta, dok aminokiselinski slijed elicitora nije promijenjen.

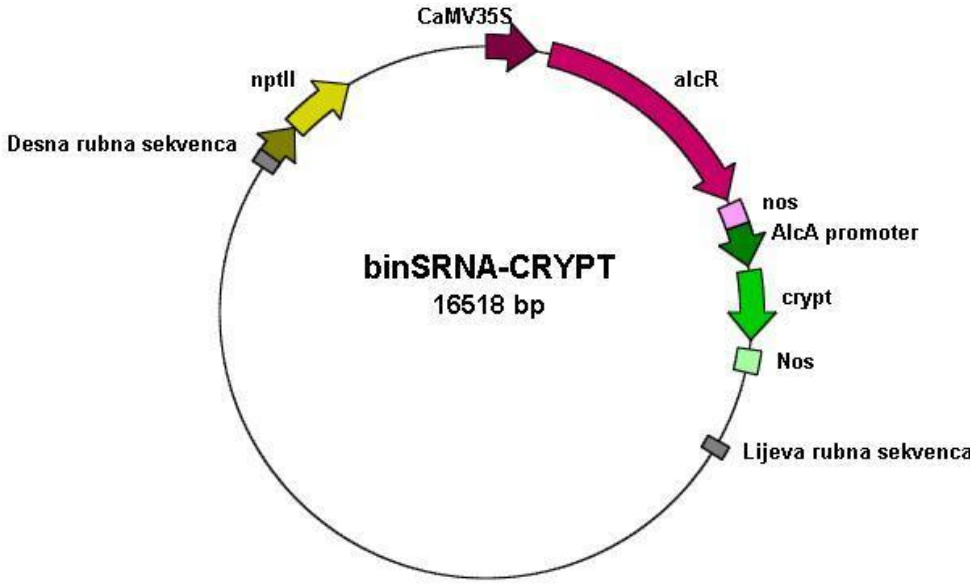
Transformacija ukrasne koprive i indukcija dlakavog korijenja obavljena je prema Bauer i sur. (2002). Agrobakterije s plazmidima poslužile su kao vektori za transformaciju lisnih eksplantata ukrasne koprive. Lisni eksplantati veličine 1 cm^2 inkubirani su u suspenziji agrobakterije *A. rhizogenes*, kako bi se oštećene stanice na rezanim površinama transformirale. Nakon inkubacije lisni eksplantati su kultivirani na krutom MS hranjivom mediju bez hormona tijekom 2 tjedna, nakon čega na rubovima eksplantata izraste transgeno korijenje. Izrezano korijenje dužine 0.5 cm preneseno je na na kruti MS medij na 25 °C u

tamu. Kako bi se eliminirala kontaminacija agrobakterijama korijenje je određeno vrijeme raslo na MS podlozi koja sadrži kanamicin.

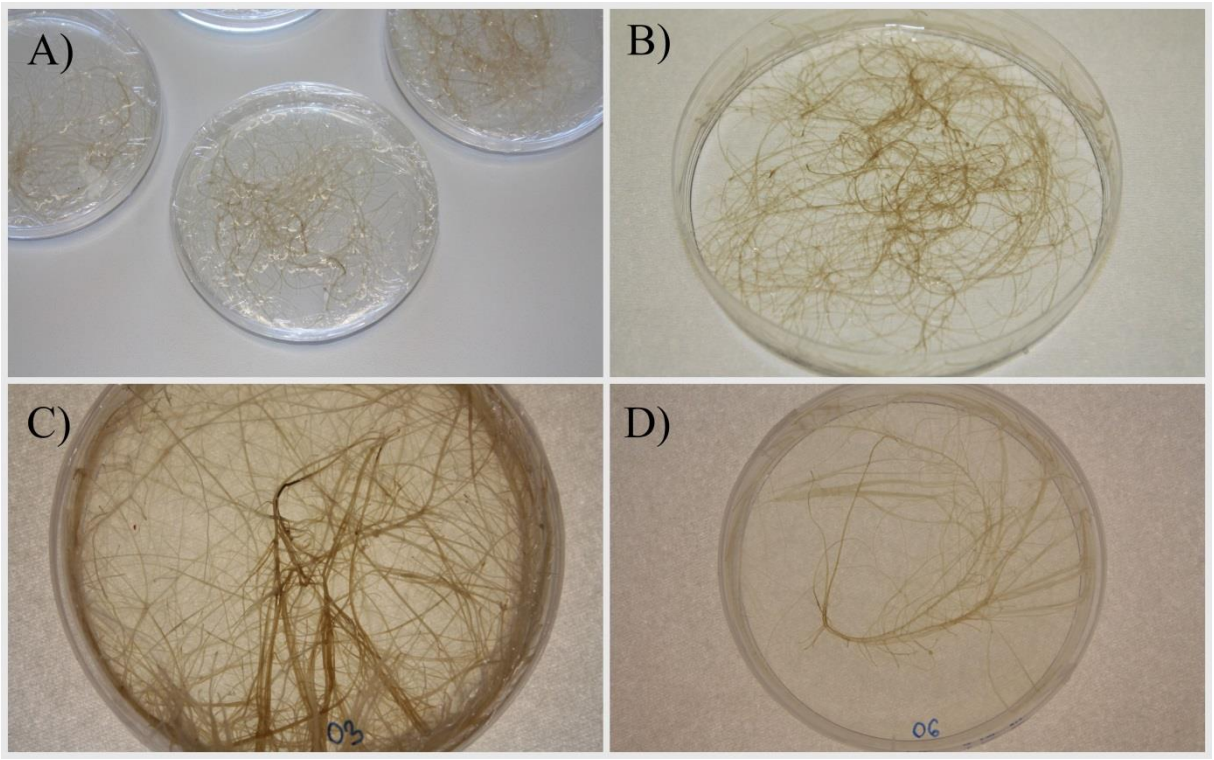
Za istraživanje učinka transgena za kriptogein na aktivnost fenilalanin-amonij-lijaze i sintezu RA odabrane su dvije linije transgenog korijenja, linija O3 i linija O6, koje sadrže gen *crypt* (Slika 7). PCR analizom (Vuković i sur., 2013) je potvrđeno da ispitivane transgene linije O3 i O6 sadrže *crypt* i *orf* gen. RT-PCR-om je potvrđeno postojanje *crypt* transkripta, te je bioinformatičkim predikcijskim programima pokazano moguće izlučivanje endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina izvan stanice (Vuković i sur., 2013).



Slika 5. Šareni kultivar ukrasne koprive *Coleus blumei* Benth. Foto: R. Vuković.



Slika 6. Binarni transformacijski vektor - pBinSRNA-CRYPT. Izvor: Vuković, R., 2013.



Slika 7. Uzgoj kosmatog korijenja ukrasne koprive na tekućoj hranjivoj podlozi (A i B) i na na krutoj hranjivoj podlozi (C - linija O3; D - linija O6). Foto: R. Vuković.

2.1.4. Hranjive podloge

Transgeno korijenje ukrasne koprive je uzgajano na krutoj i tekućoj hranjivoj Murashige i Skoog podlozi (Murashige i Skoog, 1962; MS), bez dodatka hormona (Tablica 1). U krutu hranjivu podlogu dodan je agar. Nakon pripreme medija potrebno je podesiti pH na 5.7. Hranjiva podloga se sterilizira u autoklavu 15 min. na 121 °C.

Tablica 1. Sastav MS hranjive podloge

Sastav	Koncentracija (mg × L^{-1})
Makroelementi	
NH_4NO	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \times 2H_2O$	755
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Mikroelementi	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \times H_2O$	16.9
$ZnSO_4 \times H_2O$	8.6
Kl	0,83
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0.025
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	37.3
Organski dodaci	
Mio-inozitol	100.0
Nikotinska kiselina	1
Tiamin-HCl	10
Pirodoksin-HCl	1
Glicin	2.0
Saharoza	20000

2.2. Metode

2.2.1. Kultura biljnog tkiva

Svi postupci i rad sa staničnim kulturama moraju biti izvedeni u sterilnim uvjetima, stoga su sav pribor (skalpeli, pincete), laboratorijsko posuđe, otopine i hranjive podloge prije početka rada sterilizirani u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C. Tkivo je presađivano u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka, čija se radna površina dezinficira 70%-tnim etanolom prije i nakon svake upotrebe, te sterilizira UV svjetlom.

Transgeno korijenje ukrasne koprive je uzgajano na krutoj i tekućoj hranjivoj Murashige i Skoog podlozi (Murashige i Skoog, 1962; MS), bez dodatka hormona u inkubatoru u tami. Nakon pripreme podloge, podešen je pH na 5.7 pomoću 1 M NaOH. Hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C. Kruta hranjiva podloga je pripremljena dodatkom agara u tekuću hranjivu podlogu. Nakon sterilizacije izlijevano je 8 mL tekućeg medija te 20 mL krutog medija u Petrijeve zdjelice. Kultura transgenog korijenja na krutoj podlozi održavana je subkultiviranjem svakih 6 tjedana, dok je kultura na tekućoj podlozi presađivana svaka 2 tjedna na svježu hranjivu podlogu jer su korjenčići na tekućoj podlozi rasli puno brže nego na krutoj podlozi. Kulture transgenog korijenja u tekućim podlogama su uzgajane u inkubatoru, u tami pri +28 °C, a na krutim podlogama u tami u klimatiziranoj prostoriji pri +25 °C. Tijekom uzgoja korijenja na tekućoj podlozi potrebno je jednom dnevno promješati sadržaj u petrijevci, kako bi se dodatno aerirao i homogenizirao sastav podloge.

2.2.2. Indukcija sinteze *β*-kriptogeina u transgenom korjenju

U eksperimentu su korištene dvije linije transgenog korijenja ukrasne koprive, linija O3 i linija O6, koje sadrže gen *crypt.* Do stavljanja u pokus korjenčići su subkultivirani svaka 2 tjedna. Za provođenje eksperimenta, korijenčići su rasli u dvije faze. U prvoj fazi koja je trajala dva tjedna induciran je rast korijenčića, nakon čega su izrasli korijenčići (oko 1 g tkiva) prebačeni na 8 mL svježe tekuće MS hranjive podloge. Prebacivanjem korijenčića na svježu podlogu započinje druga faza rasta, odnosno faza indukcije sekundarnih metabolita. Četvrti dan subkulture tkivo je, nakon što se prilagodilo novoj hranjivoj podlozi, tretirano etanolom u koncentraciji 1% i 2% kako bi se inducirala ekspresija gena *crypt*. Kontrolno je tkivo tretirano odgovarajućom količinom sterilne dH_2O, volumenom koji odgovara volumenu

etanola. Tkivo je za analize uzorkovano neposredno prije tretmana etanolom, zatim 7., 14. i 21. dan nakon indukcije etanolom.

2.2.3. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Uzorkovani korijenčići oprani su u destiliranoj vodi, posušeni papirnatim ubrusom te usitnjavani u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinil-polipirolidona (PVPP, služi za uklanjanje fenolnih spojeva iz biljnog ekstrakta). Iz usitnjenog su svježeg tkiva (0.3 g) proteini ekstrahirani 10 minuta na ledu uz dodatak 2 mL hladnog pufera za ekstrakciju (0.2 M boratni pufer s dodatkom 0.005 M 2-merkaptoetanola, pH 8.8). Homogenati su zatim centrifugirani 30 minuta na 22 000 g i +4 °C. Dobiveni supernatanti su filtrirani na koloni punjenoj sa Sephadex G-25 medijem (PD-10 Desalting Column). Prije upotrebe je kolona ekvilibrirana s 25 mL 0.2 M boratnog pufera, nakon čega je na kolonu dodano 2 mL proteinskog ekstrakta i 0.5 mL 0.2 M boratnog pufera. Proteinska frakcija skupljena je u 3.5 mL eluensa koji je čuvan na ledu do određivanja aktivnosti enzima PAL. Puferi za izolaciju topljivih proteina i mjerenje aktivnosti enzima PAL (0.5 i 0.2 M boratni pufer) priređeni su razrjeđivanjem 1 M boratnog pufera s dH_2O. 1 M boratni pufer pripremljeni su otapanjem 1 M borne kiseline kojoj se pH podesi s granulama NaOH na 8.8.

2.2.4. Određivanje aktivnosti fenilalanin-amonij-lijaze

Aktivnost PAL (EC 4.3.1.24) u proteinskim ekstraktima određena je spektrofotometrijskom metodom koju su u svojem radu opisali Bauer i sur. (2009). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti PAL priređena je od 0.5 mL 0.5 M boratnog pufera, 1.3 mL proteinskog ekstrakta te 0.2 mL vodene otopine 0.01 M L-fenilalanina (L-Phe). Temperatura reakcijske smjese održavana je na +40 °C u vodenoj kupelji. Budući da PAL deaminira L-Phe pri čemu nastaje cimetna kiselina, nastajanje cimetne kiseline prati se mjerenjem apsorbancije svjetlosti valne duljine 300 nm u reakcijskoj smjesi svakih 10 minuta tijekom 60 minuta. Iz baždarne krivulje cimetne kiseline određen je molarni ekstinkcijski koeficient na 300 nm 5084.75 M^{-1} cm^{-1}. Specifična aktivnost PAL izražena je kao količina cimetne kiseline (μmol) oslobođene u minuti po gramu proteina (μmol × min^{-1} × g^{-1} proteina), odnosno u jedinicama aktivnosti PAL po miligramu proteina (U PAL × g^{-1} proteina; U = μmol × min^{-1}).

2.2.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (1967). Metoda se temelji na pomaku maksimuma apsorbancije, od 465 nm na 595 nm, do kojeg dolazi u kiseloj otopini, kada se boja Coomassie briljant plavo (CBB) veže na proteine pri čemu nastaje zeleno-smeđe do plavo obojenje. Proteinski ekstrakt (100 μL) pomiješan je s 1 mL Bradford reagensa, te inkubiran 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije mjerena je apsorbancija pri 595 nm. Za pripremu Bradford reagensa potrebno je 100 mg CBBG-250, 50 mL etanola i 100 mL 85% fosforne kiseline. Nakon što je boja otopljena snažnim miješanjem u etanolu dodaje se fosforna kiselina, smjesa se razrijedi do 1 L s dH_2O i filtrira. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (*Bovin Serum Albumin*, BSA). Na temelju vrijednosti apsorbance poznatih koncentracija BSA se dobiva standardna krivulja iz koje se ekstrapolira koncentracija proteina u uzorku. Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, mjereni su u duplikatu.

2.2.6. Priprema etanolnog ekstrakta tkiva kosmatog korijenja ukrasne koprive

Za određivanje sadržaja RA uzorkovani su korijenčići prije tretmana etanolom, zatim 7., 14. i 21. dan nakon tretmana etanolom. Uzorkovani korijenčići oprani su u destiliranoj vodi, posušeni papirnatim ubrusom te usitnjavani u fini prah pomoću tarionika i tučka, uz opetovano zalijevanje tekućim dušikom. Ukupni topljivi fenoli ekstrahirani su iz 100 mg svježeg tkiva pomoću 1 mL 70% (*v/v*) etanola 30 minuta u kupelji pri +80 °C. Ekstrakti su zatim vorteksirani i centrifugirani 15 minuta na 15 000 g, a dobiveni je supernatant odvojen u 1.5 ml epice i čuvan u hladnjaku na -20 °C za određivanje sadržaja ružmarinske kiseline.

2.2.7. Određivanje sadržaja ružmarinske kiseline direktnom UV metodom

Sadržaj RA u proteinskim ekstraktima određena je direktnom UV spektrofotometrijskom metodom. Reakcijska smjesa za određivanje sadržaja RA sadržavala je 900 μL 70% etanola i 100 μL etanolnog ekstrakta, a apsorbancija je mjerena trenutno pri valnoj duljini od 330 nm. Sadržaj RA izražen je u postocima (%) svježe tvari.

2.2.8. Određivanje sadržaja ružmarinske kiseline metodom po Öztürku

Sadržaj RA u etanolnim ekstraktima tkiva određen je spektrofotometrijskom metodom po Öztürk i sur. (2010). Metoda se temelji na kompleksaciji RA sa Zr^{4+} ionima u čijoj prisutnosti RA daje karakterističnо svjetložuto obojenje. Reakcijska smjesa za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja RA sadržavala je 2.3 mL 96%-tnog etanola, 100 μL ekstrakta i 100 μL otopine 0.5 M cirkonij (VI) oksid klorida. Nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 362 nm. Sadržaj RA izračunat je iz standardne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama RA te su konačni rezultati izraženi u μM po gramu svježe tvari (μM RA × g^{-1} sv.tv.).

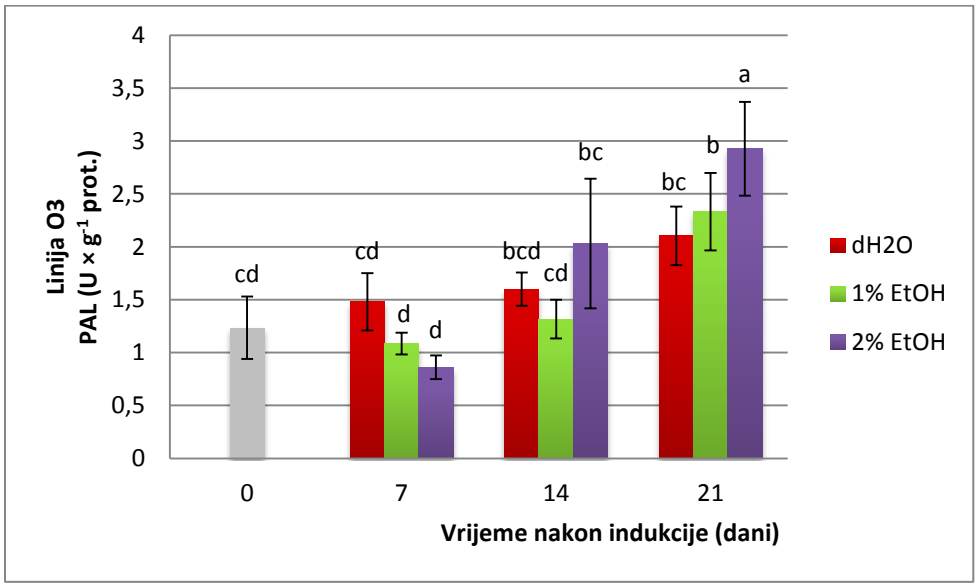
2.3. Statistička obrada podataka

Podatci dobiveni u ovom radu su obrađeni u statističkom programu STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti kontrole i tretmana uspoređene su pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (*one-way* ANOVA). *Post hoc* testiranje pomoću testa Newman-Keuls provedeno je kako bi odredili koje se skupine međusobno razlikuju. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

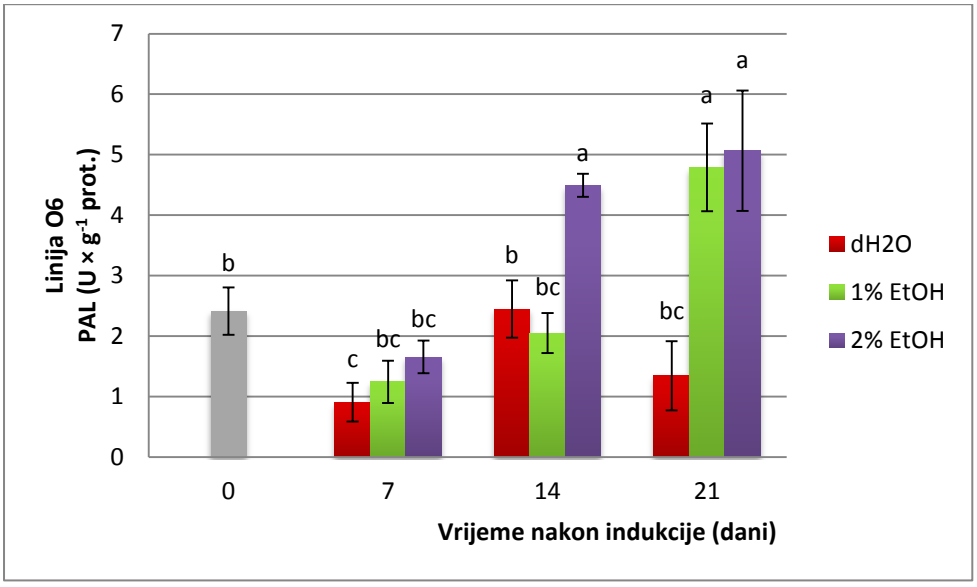
3.1. Aktivnost fenilalanin-amonij-lijaze u transgenom korijenju ukrasne koprive

Tjedan dana nakon tretmana etanolom kod O3 linije nema statistički značajnih razlika u aktivnosti enzima PAL između kontrolnog korijenja tretiranog vodom i korijenja tretiranog etanolom. Dva tjedna nakon tretmana etanolom kod iste linije i dalje nisu uočene statistički značajne razlike. Treći tjedan nakon indukcije 2%-tnim etanolom zabilježen je porast aktivnosti PAL za 39.15% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 6).



Slika 6. Aktivnost PAL, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1 i 2%-tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

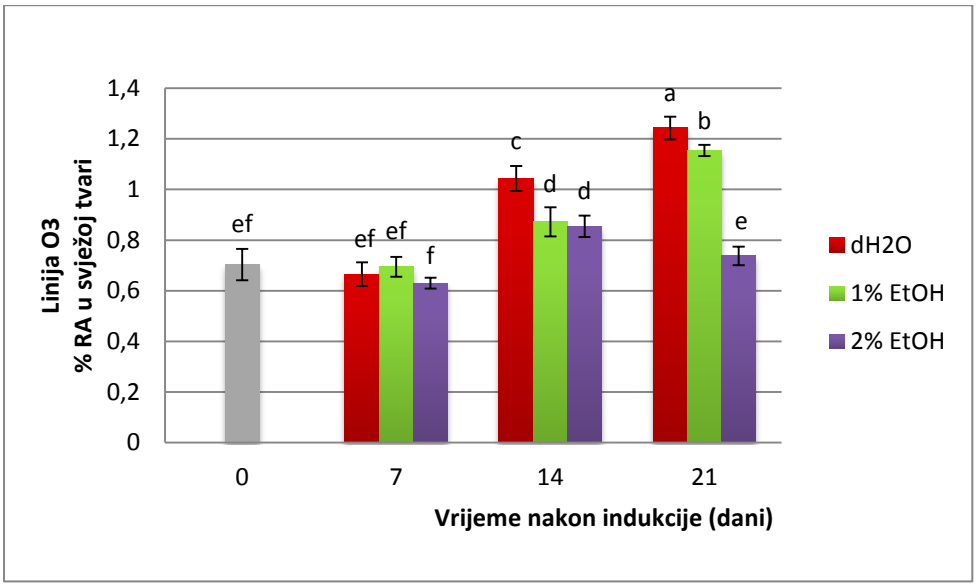
Kod linije O6 transgenog korijenja, tjedan dana nakon tretmana etanolom nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti PAL između kontrolnog korijenja tretiranog vodom i korijenja tretiranog etanolom. Dva tjedna nakon tretmana etanolom kod iste linije došlo je do porasta aktivnosti PAL u korijenju tretiranom 2%-tnim etanolom. Aktivnost PAL je u odnosu na kontrolno korijenje porasla za 83.52%. Treći tjedan nakon indukcije 1%-tnim etanolom aktivnost PAL u tretiranom korijenju bila je povećana za 256.68%, a nakon indukcije 2%-tnim etanolom bila je povećana za 277.35% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 7).



Slika 7. Aktivnost PAL, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1 i 2%-tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

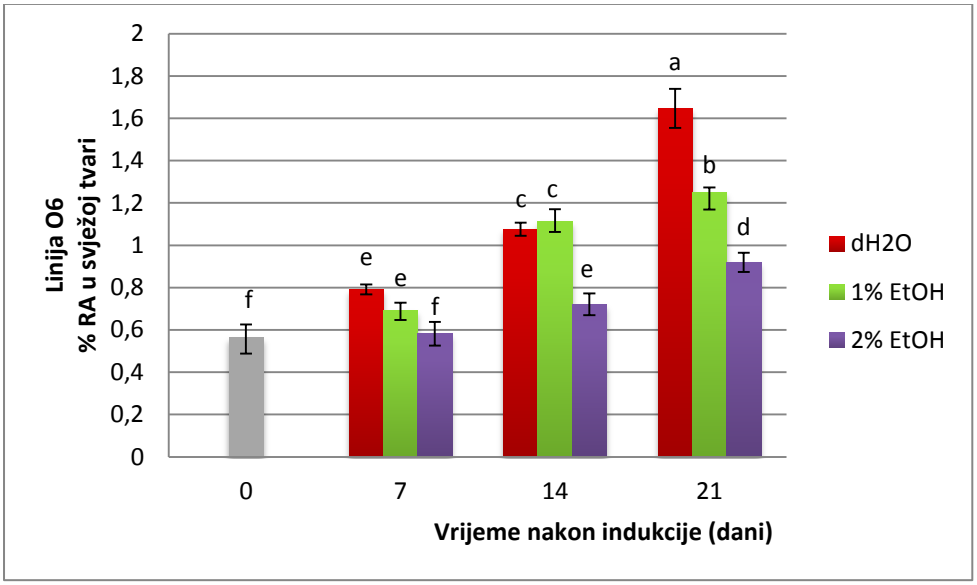
3.2. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive određen direktnom UV metodom

Tjedan dana nakon indukcije tkiva etanolom kod O3 linije nisu uočene statistički značajne razlike u sadržaju RA u tkivu korijenja tretiranog etanolom i kontrolnog korijenja tretiranog vodom. Dva tjedna nakon tretmana 1%-tnim etanolom, sadržaj RA smanjuje se za 16.43%, a nakon tretmana 2%-tnim etanolom smanjuje se za 18.10% u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom. Tri tjedna nakon tretmana 1%-tnim etanolom sadržaj RA u tkivu iste linije smanjen je za 7.11%, dok je tretman 2%-tnim etanolom uzrokovao smanjenje za 40.65% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 8).



Slika 8. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH), određen direktnom UV metodom. Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

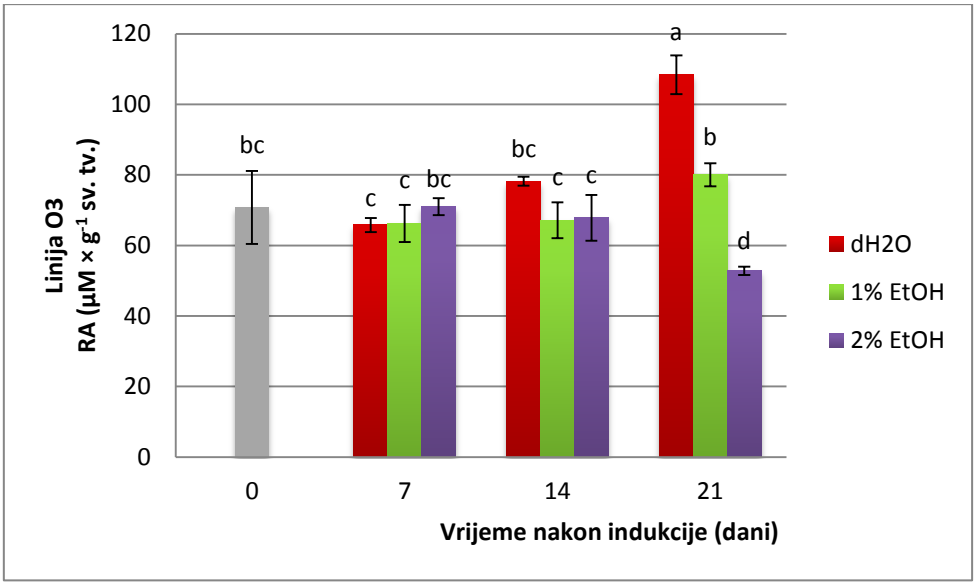
Kod O6 linije, 7. i 14. dan nakon tretmana 2%-tnim etanolom uočena je statistički značajna razlika u sadržaju RA u odnosu na kontrolno korijenje. Tjedan dana nakon tretmana 2%-tnim etanolom sadržaj RA u tkivu iste linije smanjen je za 26.52%, a dva tjedna nakon tretmana istom koncentracijom etanola, sadržaj RA smanjen je za 33.01% u odnosu na kontrolno korijenje. Tri tjedna nakon tretmana 1%-tnim etanolom sadržaj RA smanjen je za 24.07%, dok je tretman 2%-tnim etanolom uzrokovao smanjenje za 44.19% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 9).



Slika 9. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH), određen direktnom UV metodom. Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

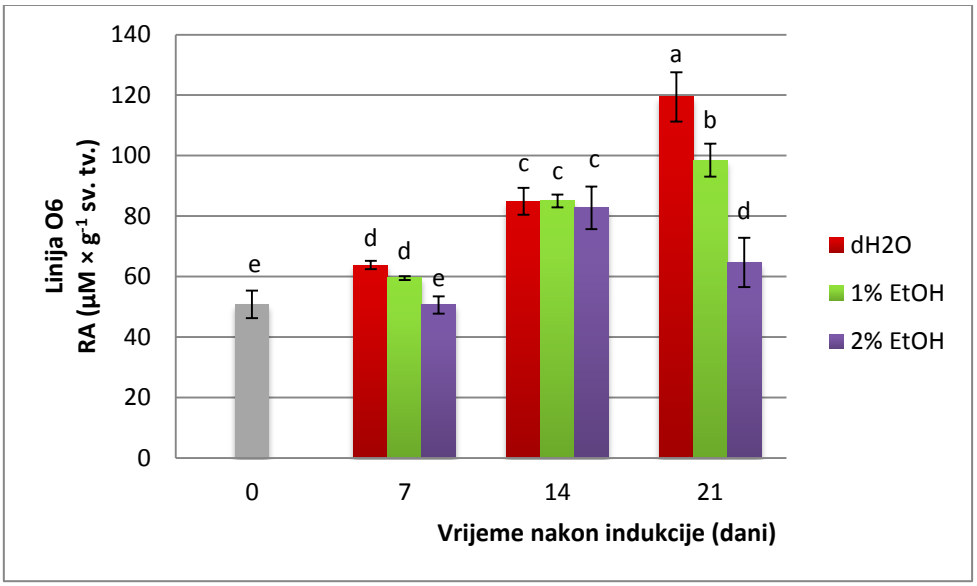
3.3. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive određen metodom po Öztürku

Tjedan dana nakon tretmana etanolom kod O3 linije nema statistički značajnih razlika između kontrolnog korijenja tretiranog vodom i korijenja tretiranog etanolom. Dva tjedna nakon tretmana etanolom kod iste linije i dalje nisu uočene statistički značajne razlike. Tri tjedna nakon indukcije etanolom uočen je značajno niži sadržaj RA u odnosu na kontrolu. Sadržaj RA u tkivu iste linije tretirane 1%-tnim etanolom smanjen je za 26.16%, dok je tretman 2%-tnim etanolom uzrokovao smanjenje za 51.31% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 10).



Slika 10. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH), određen metodom po Öztürku. Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

Sedam dana nakon tretmana etanolom kod O6 linije došlo je do smanjenja sadržaja RA u korijenju tretiranom 2%-tnim etanolom. Sadržaj RA je smanjen za 20.72% u odnosu na kontrolno korijenje. Dva tjedna nakon tretmana etanolom nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju RA između kontrolnog korijenja tretiranog vodom i korijenja tretiranog etanolom. Tri tjedna nakon tretmana 1%-tnim etanolom kod iste linije transgenog korijenja, sadržaj RA smanjuje se za 17.53%, a nakon tretmana 2%-tnim etanolom sadržaj RA smanjen je za 45.89% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 11).



Slika 11. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH), određen metodom po Öztürku. Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Iako nisu dio centralnog metabolizma biljaka, sekundarni metaboliti imaju značajnu ulogu u obrambenom odgovoru biljke na abiotički i biotički stres, a istovremeno njihovo prisutstvo u ljekovitom bilju i začinima daje blagotvoran i pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Velik interes farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije za višestrukim biološkim aktivnostima sekundarnih metabolita vodio je ka brojnim istraživanjima koja su usmjerena na razvijanje različitih strategija koje bi doprinijele povećanju njihove sinteze u biljkama. Posebno su značajne kulture kosmatog korijenja koje zbog svoje genetičke i biokemijske stabilnosti, visoke stope rasta te sinteze sekundarnih metabolita u istoj ili u većoj količini u odnosu na samu biljku, predstavljaju kontinuirani izvor proizvodnje vrijednih sekundarnih metabolita (Georgiev i sur., 2007). Budući da biotički elicitori potiču obrambeni odgovor biljke, a akumulacija sekundarnih metabolita u biljkama se često javlja kao dio obrambenog odgovora biljke na stres i napad patogena, elicitacija predstavlja efektivnu strategiju za indukciju i povećanje proizvodnje sekundarnih metabolita (Zhao i sur., 2005).

Kako bi istražili utjecaj oomicetalnog elicitora *β*-kriptogeina na aktivnost enzima PAL i biosintezu RA u tkivu ukrasne koprive, uzgojeno je kosmato korijenje genetičke linije O3 i O6, u kojima se sintetički gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog alkoholnog promotora. Upotrebom alkoholnog promotora može se kontrolirati vrijeme i razina ekspresije *crypt* gena.

Prvi enzim u biosintetskom putu RA je fenilalanin-amonij-lijaza i poticanje njegove aktivnosti posljedica je transkripcijske aktivnosti gena *PAL*. Prema istraživanju Lecourieux i sur. (2002), nakon tretmana suspenzije stanica duhana *β*-kriptogeinom dolazi do povećane akumulacije *PAL* transkripata koja je u direktnoj vezi sa sintezom fitoaleksina koji sudjeluju u obrani biljke od patogena. U ovom istraživanju kod O3 linije transgenog korijenja zabilježen je porast aktivnosti PAL u odnosu na kontrolno korijenje treći tjedan nakon indukcije 2%-tnim etanolom. Kod linije O6 transgenog korijenja do porasta aktivnosti PAL došlo je drugi tjedan nakon indukcije 2%-tnim etanolom te treći tjedan nakon indukcije 1 i 2%-tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje.

Nekoliko istraživanja opisuje transformaciju genom *crypt* s ciljem povećane sinteze sekundarnih metabolita (Donghua i sur., 2004; Chaudhuri i sur., 2009; Majumdar i sur., 2011). Povećana sinteza sekundarnih metabolita zabilježena je u Ri-transformiranim biljkama tilofore (*T. indica*) gdje je sadržaj tiloforina bio 20-60% viši nego u kontroli (Chaudhuri i sur., 2006), a sadržaj saponina u bakopi (*B. monnieri*) je bio i do četiri puta veći nego u

netransformiranim biljkama (Majumdar i sur., 2011). Naši rezultati pokazuju da se sadržaj RA u transgenom korijenju ukrasne koprive određen direktnom UV metodom u liniji O3 smanjuje dva i tri tjedna nakon tretmana 1 i 2%-tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom. Kod O6 linije smanjeni sadržaj RA zabilježen je prvi i drugi tjedan nakon tretmana 2%-tnim etanolom, te treći tjedan nakon tretmana 1 i 2%-tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje. Rezultati sadržaja RA određeni metodom po Öztürku pokazuju da je u liniji O3 do smanjenja sadržaja RA došlo tri tjedna nakon indukcije 1 i 2%-tnim etanolom, a u liniji O6 tjedan dana nakon tretmana 2%-tnim etanolom i tri tjedna nakon tretmana 1 i 2%-tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje. Pozitivna korelacija između aktivnosti PAL i biosinteze RA potvrđena je u nekoliko prijašnjih istraživanja na staničnim kulturama različitih vrsta porodice Boraginaceae i Lamiaceae. Prema istraživanju Mizukami i sur. (1992), tretman kvascem povećao je sintezu RA u staničnim kulturama biljke *L. erythrorhizon*, a maksimalna akumulacija RA zabilježena je šest dana nakon tretmana kvascem u eksponencijalnoj fazi rasta stanica. Tretman kvascem inducirao je povećanu akumulaciju RA u suspenzijskim kulturama korejske mente (*A. rugosa*; Kim i sur., 2001), biljke *O. aristatus* (Sumaryono i sur., 1991) i u kulturama dlakavog korijenja kineske kadulje *(S. miltiorrhiza*; Yan i sur., 2006). U svim istraživanjima autori navode da je pojačanoj sintezi RA prethodila pojačana aktivnost enzima PAL. Iako je prema literaturnim navodima povećana aktivnost enzima PAL bila u pozitivnoj korelaciji s povećanom sintezom RA, u našem istraživanju to nije bio slučaj, kao i u istraživanju koje su proveli Bauer i sur. (2011). Bauer i sur. su u svrhu povećanja sinteze RA u kulturi transgenog korijenja ukrasne koprive, transformirali tkivo ukrasne koprive genom *PAL1* iz uročnjaka (*A. thaliana*). Pojačana ekspresija gena *PAL1* vodila je ka povećanoj aktivnosti enzima PAL, ali i ka sniženju razine ukupnih fenola i RA. Negativna korelacija između aktivnosti PAL i sadržaja RA u transgenom korijenju ukrasne koprive može se objasniti preusmjeravanjem biosinteze sekundarnih metabolita. Pojačana aktivnost PAL uzrokuje nakupljanje cimetne kiseline. Dio cimetne kiseline može se prevesti u p-kumarinsku, kavinu i feruličnu kiselinu, koje sudjeluju u građi stanične stijenke povećavajući njenu čvrstoću. Povećanje čvrstoće stanične stijenke često se javlja kao odgovor biljke na napad patogena, odnosno kao odgovor na tretman elicitorima, a u našem slučaju kao odgovor na *β*-kriptogein.

Sadržaj RA može se kvalitativno i kvantitativno određivati primjenom različitih UV/VIS spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. Direktna UV spektrofotometrijska metoda se temelji na mjerenju apsorbancije svjetlosti RA pri valnoj duljini od 327 nm i omogućava brzu identifikaciju RA u velikom broju ekstrakata (De-Eknamkul i Ellis, 1984).

Preostale UV/VIS spektrofotometrijske metode temelje se na mjerenju apsorbancije kompleksa RA sa Fe^{2+} ionima (Lopez-Arnaldos i sur., 1995), te kompleksa RA sa Zr^{4+} ionima u čijoj prisutnosti RA daje karakterističnо svjetložuto obojenje (Öztürk i sur., 2010). Nadalje, identifikacija i kvantifikacija RA pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) pokazala se najtočnijom, ali kompliciranom i zahtjevnom laboratorijskom metodom za određivanje sadržaja RA (Whitaker i sur., 1985). U ovom istraživanju, sadržaj RA određen je direktnom UV metodom i spektrofotometrijskom metodom po Öztürk i sur. (2010). Öztürk i sur. su predstavili u svojem radu novu spektrofotometrijsku metodu za određivanje sadržaja RA koja se temelji na kompleksaciji RA sa Zr^{4+} ionima. Pomoću ove metode odredili su sadržaj RA u 11 različitih vrsta *Salvia* sa različitih lokaliteta i dobivene rezultate usporedili sa rezultatima mjerenja direktnom UV metodom i spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kompleksaciji sa Fe^{2+} ionima. Rezultati svih triju metoda su bili slični, ali autori su istaknuli svoju metodu zbog niza prednosti koje nudi u usporedbi sa ostalim metodama, a to su brzina, selektivnost, osjetljivost i točnost u određivanju RA u ekstraktima biljaka. Direktna UV metoda se pokazala pouzdanom i točnom, međutim, nepročišćeni metanolni ekstrakti iz biljaka pokazaju podudaranje UV spektra sa spektrom RA, što znači da ova metoda nije dala prave podatke za sadržaj RA. Iako su Öztürk i sur. ustanovili da je metoda sa Zr^{4+} ionima bolja, u našem istraživanju se boljom metodom pokazala direktna UV spektrofotometrijska metoda u usporedbi sa metodom koju su razvili Öztürk i sur. S obje metode je utvrđeno da se sadržaj RA smanjuje u korijenju tretiranom etanolom u odnosu na kontrolno korijenje, ali direktna UV metoda pokazala je da se sadržaj RA smanjio drugi i treći tjedan nakon tretmana 1 i 2%-tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom kod linije O3, a metodom po Öztürk samo treći tjedan nakon indukcije 1 i 2%-tnim etanolom. Kod O6 linije direktnom UV metodom smanjeni sadržaj RA zabilježen je prvi i drugi tjedan nakon tretmana 2%-tnim etanolom, te treći tjedan nakon tretmana 1 i 2%-tnim etanolom, a metodom po Öztürk to smanjenje je zabilježeno samo tjedan dana nakon tretmana 2%-tnim etanolom i tri tjedna nakon tretmana 1 i 2%-tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje. U istraživanju Vuković i sur. (2013), sadržaj RA u transgenom korijenju tretiranom etanolom analiziran je HPLC-om. Usporedimo li rezultate dobivene direktnom UV metodom u našem istraživanju sa rezultatima HPLC metode, UV metoda se pokazala osjetljivijom u određivanju sadržaja RA u transgenom korijenju ukrasne koprive u odnosu na metodu po Öztürku. Mogući razlog veće osjetljivosti UV-metode je jako velik sadržaj RA (80% svih sekundarnih metabolita) u kosmatom korijenju ukrasne koprive, te nema značajnih podudaranja UV spektra sa spektrom

drugih metabolita, te je moguće uočiti i manje promjene u sadržaju RA, koje je očito teže uočiti metodom po Öztürku.

Učinkovitost indukcije elicitora kao alata za poboljšanje proizvodnje sekundarnih metabolita je rezultat složenih interakcija između elicitora i biljne stanice na koju utječu mnogi čimbenici. Elicitori nemaju jednak učinak u svim biljnim vrstama i promjene u aktivnosti enzima koji sudjeluju u njihovoj sintezi nisu uvijek u korelaciji s promjenama u akumulaciji fenolnih spojeva.

5. ZAKLJUČCI

- Inducibilna ekspresija *β*-kriptogeina uzrokuje povećanje aktivnosti fenilalanin-amonij lijaze u dvije istraživane linije transgenog korijenja (O3 i O6).

- Inducibilna ekspresija gena *crypt* uzrokuje smanjenje sadržaja ružmarinske kiseline u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive.

- Iako enzim PAL katalizira prvi korak biosinteze RA, povećana aktivnost enzima PAL nije vodila ka povećanoj akumulaciji RA u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive.

- Direktna UV metoda pokazala se preciznijom i pouzdanijom metodom za analizu sadržaja ružmarinske kiseline u kosmatom korijenju ukrasne koprive u odnosu na metodu po Öztürku.

6. LITERATURA

Alunni S, Cipiciani A, Fioroni G, Ottavi L. 2003. Mechanisms of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by phenol inhibitors and phenol/glycine synergistic inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 412:170–175.

Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol Biochem* 40:983–995.

Bauer N, Fulgosi H, Jelaska S. 2011. Overexpression of phenylalanine ammonia-lyase in transgenic roots of *Coleus blumei* alters growth and rosmarinic acid synthesis. *Food Technol Biotechnol* 49:24–31.

Bauer N, Kiseljak D, Jelaska S. 2009. The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biolog Plant* 53:650–656.

Bauer N, Leljak-Levanic D, Mihaljevic S, Jelaska S. 2002. Genetic transformation of *Coleus blumei* Benth. using *Agrobacterium*. *Food Technol Biotechnol* 40:163–169.

Benhamou N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 1:233–240.

Bezanson GS, Desaty D, Emes AV, Vining LC. 1970. Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. *Can J Microbiol* 16:147–151.

Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A. 2001. Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol* 125:564-572.

Boissy G, De La Fortelle E, Kahn R, Heut JC, Bricogne G, Pernollet JC, Brunie S. 1996. Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* 4:1429–1439.

Bourque S, Binet MN, Ponchet M, Pugin A, Lebrun-Garcia A. 1999. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* 274:34699-34707.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, Krause KP, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schunch W, Sonnewald U, Tomsett AB. 1998. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat Biotechnol* 16:177–180.

Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, Sariaslani S, Vannelli T. 2004. Crystal structure of phenylalanine ammonia-lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry* 43:11403–11416.

Chaudhuri K, Das S, Bandyopadhyay M, Zalar A, Kollmann A, Jha S, Tepfer D. 2009. Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic Res* 18:121–134.

Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D, Jha S. 2006. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 25:1059–1066.

Collier R, Fuchs B, Walter N, Lutke WK, Taylor CG. 2005. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J* 43:449‑457.

D'Amelio FS. 1999. *Botanicals*: *A Phytocosmetic Desk Reference*. CRC Press, London, pp 361.

De-Eknamkul W, Ellis BE. 1984. Rosmarinic acid production and growth characteristics of *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Planta Med* 51:346–350.

Dixon RA, Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097.

Donghua J, Zejian G, Xujun C, Zhiqiang C, Zhong Z. 2004. Study on tobacco disease resistances mediated by the elicitor gene cryptogein from *Phytophthora cryptogea*. *Chin J Agr Biotechnol* 1:125–131.

Ellis BE, Towers GHN. 1970. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J* 118:291-297.

Fefeu S, Bouaziz S, Huet JC, Pernollet JC, Guittet E. 1997. Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci* 6:2279–2284.

Felenbok B. 1991. The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *J Biotechnol* 17:11–17.

Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW. 1976. Phenylalanine ammonia-lyase: induction and purification from yeast and clearance in mammals. *J Biol Chem* 251:4646–4650.

Gatz C, Lenk I. 1998. Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci* 3:352-358.

Gatz C. 1996. Chemically inducible promoters in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 7:168-172.

Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T. 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 74:1175–1185.

Gertlowski C, Petersen M. 1993. Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34:183-190.

Giri A, Narasu LM. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 18:1-22.

Gloge A, Langer B, Poppe L, Retey J. 1998. The behavior of substrate analogues and secondary deuterium isotope effects in the phenylalanine ammonia-lyase reaction. *Arch Biochem Biophys* 359:1–7.

Hippolyte I, Marin B, Baccou JC, Jonard R. 1992. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep* 11:109-112.

Keller H, Blein JP, Bonnet P, Ricci P. 1996. Physiological and molecular characteristics of elicitin-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology* 110:365-376.

Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. 2006. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agr Food Chem* 54:2327-2332.

Kim HK, Oh SR, Lee HK, Huh H. 2001. Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa*. *Biotechnol Lett* 23:55-60.

Kochan E, Wysokinska H, Chmiel A, Grabias B. 1999. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. *Z NaturforschI* 54:11-16.

Koukol J, Conn EE. 1961. Metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* 236:2692–2698.

Langer B, Langer M, Re´tey J. 2001. Methylidene-imidazolone (MIO) from histidine and phenylalanine ammonia-lyase. *Adv Protein Chem* 58:175–214.

Lebowitz R. 1985. The genetics and breeding of *Coleus*. *Plant Breeding* 3:343-360.

Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A. 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* 15:773–781.

Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugina A. 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14:2627–264.

Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T, Nikaido T. 2005. Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80:151–155.

Litvinenko VI, Popova TP, Simonjan AV, Zoz IG, Sokolov VS. 1975. "Gerbstoffe" und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Med* 27:372–380.

Lopez-Arnaldos T, Lopez-Serrano M, Ros-Barcelo A, Calderon AA, Zapata JM. 1995. Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe^{2+} ions. *Fresen J Anal Chem* 351:311–314.

Lu YR, Foo LY. 1999. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 51:91-94.

Majumdar S, Garai S, Jha S. 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Rep* 30:941–954.

Marusich WC, Jensen AR, Zamir LO. 1981. Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase during utilization of phenylalanine as a carbon or nitrogen source in *Rhodotorula glutinis*. *J Bacteriol* 146:1013–1021.

Matsuno M, Nagatsu A, Ogihara Y, Ellis BE, Mizukami H. 2002. CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-40-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. *FEBS Lett* 514:219–224.

Meinhard J, Petersen M, Alfermann AW. 1993. Rosmarinic acid in organ cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med* 59:649.

Mizukami H, Ogawa T, Ohashi H, Ellis BE. 1992. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell Rep* 11:480–483.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.

Nakamichi K, Nabe K, Yamada S, Chibata I. 1983. Induction and stabilization of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 18:158–162.

O'Donohue M, Gousseau H, Heut JC, Tepfer D, Pernollet JC. 1995. Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding *ß*-cryptogein an elicitin produced by *Phytophthora cryptogea. Plant Mol Biol* 27:577-586.

Orndorff SA, Constantino N, Stewart D, Durham DR. 1988. Strain improvement of *Rhodotorula graminis* for production of a novel L-phenylalanine ammonia-lyase. *Appl Environ Microbiol* 54:996–l002.

Öztürk M, Duru M, Ince B, Harmandar M, Topçu G. 2010. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chem* 123:1352–1356.

Parnham MJ, Kesselring K. 1985. Rosmarinic acid. *Drugs of the Future* 10:756–757.

Petersen M, Hausler E, Karwatzki B, Meinhard J. 1993. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189:10–14.

Petersen M, Simmonds MSJ. 2003. Molecules of Interest: rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62:121-125.

Petersen M. 1994. *Coleus* spp: *In vitro* culture and the production of forskolin and rosmarinic acid. *Biotehnol Agr Forest* 26:69–92.

Petersen M. 1997. Cytochrome P-450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* 45:1165–1172.

Radman R, Saez, T, Bucke C, Keshavarz T. 2003. Elicitation of plant and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Bioc* 37:91–102.

Razzaque A, Ellis BE. 1977. Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137:287–291.

Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* 183:555–563.

Riker AJ, Banfieled WM, Wright WH, Keitt GW, Sagen HE. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J Agr Res* 41:507.

Roslan HA, Salter MG, Wood CD, White MRH, Croft KP, Robson F, Coupland G, Doona J, Laufs P, Tomsett AB, Caddick MX. 2001. Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 28:225–235.

Salter MG, Paine JA, Riddell KV, Jepson I, Greenland AJ, Caddick MX, Tomsett AB. 1998. Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant J* 16:127–132.

Sanbogi C, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R, Inoue KI, Sadakane K, Ichinose T, Yoshikawa T. 2004. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin Exp Allergy* 34:971-977.

Scarpati ML, Oriente G, 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric Sci* 28:2329–2333.

Schuster B, Retey J. 1995. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8433–8437.

Sikora LA, Marzluff GA. 1982. Regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 150:1287–1292.

Simon-Plas F, Rustérucci C, Milat ML, Humbert C, Montillet JL, Blein JP. 1997. Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ* 20:1573–1579.

Sumaryono W, Proksch P, Hartmann T, Nimtz M, Wray V. 1991. Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. *Phytochemistry* 30:3267-3271.

Sweetman JP, Chu C, Qu N, Greenland AJ, Sonnewald U, Jepson I. 2002. Ethanol vapor is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and crop plant species. *Plant Physiol* 129:943–948.

Szabo E, Thelen A, Petersen M. 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep* 18:485–489.

Tanaka Y, Matsuoka M, Yamanoto N, Ohashi Y, Kano-Murakami Y, Ozeki Y. 1989. Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant physiol* 90:1403–1407.

Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A. 1995. Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol* 109:1025–1031.

Tepfer D, Boutteaux C, Vigon C, Aymes S, Perez V, Donohue MJO, Huet JC, Pernollet JC. 1998. *Phytophthora* resistance through production of a fungal protein elicitor (*β*-cryptogein) in tobacco. *Mol Plant Microbe Inter* 11:64-67.

Tsuruga A, Terasaka K, Kamiya K, Satake T, Mizukami H. 2006. Elicitor-induced activity of isorinic acid 3-hydroxylase, an enzyme catalyzing the final step of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Biotechnol* 23:297-301.

Vuković R, Bauer N, Curković-Perica M. 2013. Genetic elicitation by inducible expression of *β*-cryptogein stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots. *Plant Sci* 199-200:18-28.

Wendehenne D, Binet MN, Blein JP, Ricci P, Pugin A. 1995. Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* 374:203–207.

Whetten RW, Sederoff RR. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine: Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiol* 98:380–386.

Whitaker R J, Hashimoto T, Evans DA. 1984. Production of the secondary metabolite, rosmarinic acid, by plant cell suspension cultures. *Ann NY Acad* 435:364–366.

Yan Q, Shi M, Ng J, Wu J. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci* 170:853-858.

Youn J, Lee KH, Won J, Huh SJ, Yun HS, Cho WG, Paik DJ. 2003. Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. *J Rheumatol* 30:1203-1207.

Yu LM. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4088–4094.

Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y. 1992. Metabolic engineering of medicinal plants: ransgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11799-11803.

Zhao J, Davis LT, Verpoort R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23:283–333.

Zheng W, Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenoli compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49:5165-5170.

Internet stranice korištene u pisanju diplomskog rada:

Web 1: http://www.mycobiology.or.kr/ArticleImage/0184MB/mb-39-257-g001-l.jpg, pristupljeno 9.9.2013.

Web 2: http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1096719207001357-gr1.sml, pristupljeno 9.9.2013.

Web 3: http://www.icsn.cnrs-gif.fr/spip.php?article579&lang=fr#agro, pristupljeno 9.9.2013.