Utjecaj gena crypt na ekspresiju izoenzima superoksid-dismutaze u transgenom korijenju ukrasne koprive (Coleus blumei Benth)

Čavčić, Dalma

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:181:152504

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Dalma Čavčić

Utjecaj gena *crypt* na ekspresiju izoenzima superoksid-dismutaze u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* BENTH)

Završni rad

Mentor: dr.sc.Elizabeta Has-Schon, redoviti profesor

Osijek, 2016. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Završni rad
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj gena *crypt* na ekspresiju izoenzima superoksid-dismutaze u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* BENTH)

Dalma Čavčić

Rad je izrađen u: Laboratoriju za biokemiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: dr.sc.Elizabeta Has-Schon, redoviti profesor

Neposredni voditelj: dr.sc.Rosemary Vuković, viši asistent

Kratak sažetak završnog rada:

β-kriptogein je proteinski elicitor oomicete *Phytophthora cryptogea* koji pripada skupini *β*-elicitina. Elicitori su tvari biološkog ili nebiološkog podrijetla koji, u doticaju sa stanicama viših biljaka, mogu izazvati fiziološke i morfološke promjene, između ostalog induciraju proizvodnju reaktivnih kisikovih tvari te potiču antioksidacijsku obranu biljke. Cilj ovog rada bio je odrediti učinak inducibilne ekspresije gena *crypt*, koji kodira *β*-kriptogein, na ekspresiju i aktivnost različitih izoenzima superoksid-dismutaze (SOD) u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.). U transgenom korijenju gen *crypt* se nalazi pod kontrolom alkoholnog inducibilnog promotora, tako da je njegova ekspresija inducirana tretmanom s 0,1%-tnim i 1%-tnim etanolom. Korijenje je uzorkovano 3., 7. i 14. dan nakon tretmana. U transgenom korijenju eksprimirane su tri izoenzima SOD-a, dok je izoenzim naveće molekulske mase, SOD 1, eksprimiran samo u korijenju u kome je ekspresija gena *crypt* inducirana 1%-tnim etanolom. Ekspresija gena *crypt* uzrokovala je smanjenje aktivnosti izoenzima SOD 3, dok je aktivnost izoenzima SOD 4 bila povećana u odnosu na kontrolu. Izoenzim SOD 4 po zastupljenosti u tkivu odgovara izoenzimu Cu, Zn SOD, koji je inače u biljnom tkivu najzastupljeniji.

Broj stranica: 19
Broj slika: 4
Broj tablica: 2
Broj literaturnih navoda: 41
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: *β*-kriptogein, transgeno korijenje, *Coleus blumei*, superoksid-dismutaza, izoenzim, Cu,Zn SOD

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Biology
Bachelor's thesis
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

Influence of crypt gene on superoxide dismutase isozyme expression pattern in roots painted nettle transgenic roots (*Coleus blumei* Benth)

Dalma Čavčić

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Ph. D. Elizabeta Has-Schon, Full Professor
Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković, Senior Assistant

Short abstract: *β*-cryptogein is the protein elicitor of Oomycetes Phytophthora cryptogea who belongs to the group of β-elicitors. Elicitors can be of biological or non-biological origin and, in contact with the cells of higher plants, can cause physiological and morphological changes. Among other things, they can induce the production of reactive oxygen species and stimulate antioxidant defense of plants. The purpose of this study was to determine the effect of inducible gene expression *crypt*, which is encoded by *β*-cryptogein, on the expression and activity of different isoenzymes of superoxide dismutase (SOD) in transgenic roots decorative nettle (*Coleus blumei* Benth.). In the transgenic roots gene *crypt* is under the control of an inducible promoter of alcohol, so that its expression is induced by treatment with 0.1 and 1% ethanol. The roots were sampled 3, 7 and 14 days after the treatment. In the transgenic roots expressed three SOD isoenzymes, while the isoenzyme with the biggest molecular weight SOD 1 is expressed only in the roots in which the gene expression was induced by 1% ethanol. *Crypt* gene expression caused a decrease in the activity of SOD isoenzymes 3, while the activity of SOD isoenzymes 4 was increased compared to the control. According to its concentration in the tissue SOD isoenzyme 4 responds to the isoenzyme Cu, Zn SOD, which is normally the most common isoenzyme of SOD in a plant tissue.

Number of pages: 18
Number of figures: 4
Number of tables: 2
Number of references: 43
Original in: Croatian
Key words: *β*-cryptogein, transgenic roots, *Coleus blumei*, superoxid dismutase, isoenzymes, Cu,Zn SOD

Thesis deposited in:
Library of Department of Biology, University of J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

1. Uvod 5
1.1 Oksidacijski stres i reaktivne kisikove tvari 5
1.2 Superoksid-dismutaza 5
1.2 Beta-kriptogein kao biotički elicitor 7
1.3 Cilj rada 8
2. Materijali i metode 8
2.1 Biljni materijal 8
2.2 Održavanje kulture transgenog korijenja 9
2.3 Indukcija sinteze β-Kriptogeina u transgenom korijenju 9
2.4 Ekstrakcija proteina 9
2.5 Određivanje koncentracije proteina 10
2.6 Poliakrilamid gel elektroforeza u nativnim uvjetima 10
2.7 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze na gelu 10
3. Rezultati 10
3.1 Izooblici i aktivnost superoksid-dimutaze u transgenom korijenju 10
4. Rasprava 13
5. Zaključak 15
6. Literatura 15

1. Uvod

1.1 Oksidacijski stres i reaktivne kisikove tvari

Reaktivne kisikove tvari (ROS) su produkti normalnog metabolizma stanice. Kao glavni izvori ROS-a u biljnim stanicama navode se kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi, odnosno organeli u kojima se odvijaju različiti metabolički procesi oksidacije ili je prisutan veliki protok elektrona (Gill i Tuteja, 2010). Fotosinteza je jedan od glavnih izvora stvaranja ROS-a u biljkama. Transport elektrona u fotosintezi se odvija u aerobnim uvjetima pri čemu nastaju velike količine ROS-a koje mogu znatno oštetiti vitalne makromolekule i promijeniti njihove funkcije. Nemogućnost organizma da održava ravnotežu između nastanka i uklanjanja ROS-a rezultira nastankom oksidacijskog stresa. Kao obranu, biljke su razvile antioksidacijski sustav koji katabolizira ROS i regulira njihovu koncentraciju u stanici. Uklanjanje ROS-a u biljnim stanicama odvija se pomoću različitih komponenata enzimskog ili neenzimskog antioksidacijskog obrambenog sustava (Alscher i sur, 2002). Glavni antioksidacijski enzimi za obranu biljne stanice od oksidacijskog oštećenja su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza i askorbat-peroksidaza. Ekspresija ovih enzima je genetički kontrolirana, a može biti aktivirana razvojnim i okolišnim podražajima kako bi se nastali ROS uklonio. ROS su i važne signalne molekule uključene u rast i razvoj biljke, programiranu smrt stanice, važna su komponenta odgovora biljke na abiotičke čimbenike kao i na snažan odgovor biljke na infekciju patogenima (Jones, 2006; Foyer, Noctor, 2005, 2009). Vodikov peroksid (H_2O_2) je najstabilniji ROS koji ima fiziološku ulogu u stanici. On nastaje prijenosom elektrona u mitohondrijima, fotorespiracijom u peroksisomima, te Mehler-ovom reakcijom u kloroplastima. Do povećanja koncentracije H_2O_2 dolazi uslijed djelovanja stresnih čimbenika. H_2O_2 može nastati i djelovanjem enzima, kao npr. peroksidaznom aktivnošću u staničnoj stijenci ili aktivnošću amin-oksidaze i ksantin-oksidaze (Apel i Hirt, 2004). Može se slobodno kretati stanicom zahvaljujući peroskiporinima i akvaporinima, te zbog toga služi kao signalna molekula za pokretanje mehanizama prilagodbe i otpornosti na različite biotičke i abiotičke stresne čimbenike, dok pri višim koncentracijama dovodi do apoptoze (Wojtazsek, 1997). Također ima važnu ulogu u obrani organizma protiv patogena (Torres i sur. 2002). Iz organizma ga uklanjaju različiti enzimi, od kojih su najvažniji katalaza i različite peroksidaze koje nastali H_2O_2 uklanjanju prevođenjem u vodu.

1.2 Superoksid-dismutaza

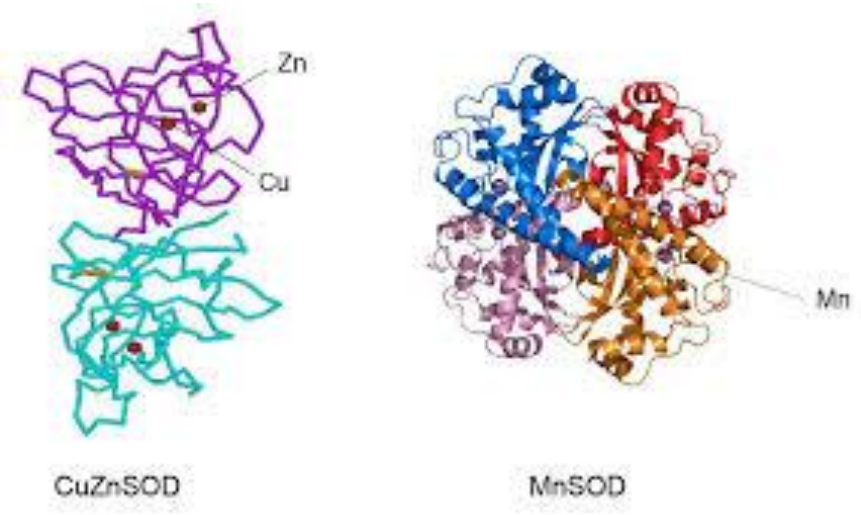
SOD pripada skupini metaloenzima a katalizira uklanjanje superoksidnog radikala, prvog produkta redukcije molekule kisika. Enzim SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala

na molekulu kisika (oksidacija) i H_2O_2 (redukcija). Ovom reakcijom nastaje manje reaktivni H_2O_2 kojeg potom uklanja katalaza. Dismutacija superoksida enzimom SOD prikazana je reakcijama (1) i (2).

$$M^{(n+1)+}\text{-SOD}+O_2^{\bullet-} \longrightarrow M^{n+}\text{-SOD}+O_2 \quad (1)$$

$$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2 \quad (2)$$

SOD je prisutan u tri izooblika koji se međusobno razlikuju prema smještaju u stanici i vrsti metalnog iona koji sadrže u svom aktivnom centru. Izoenzim Cu, Zn-SOD se nalazi u citosolu (peroksisomi), po građi je dimer, a u aktivnom središtu sadrži ione Cu ili Zn (Slika 1). Mn-SOD se nalazi u matriksu mitohondrija, a svaka od četiri podjedinice tetramera sadrži jedan atom Mn (Slika 1). Ekstracelularni SOD je izoenzim koji štiti izvanstanični prostor od štetnog učinka superoksidnog radikala, građen je od četiri podjedinice, a sadrži ione Cu i Zn (Alscher i sur. 2002). Ovakvom raspodjelom izoenzima unutar stanice i izvan nje omogućeno je brzo i učinkovito uklanjanje superoksidnog radikala na mjestu njegova nastanka. Izooblici SOD-a razlikuju se u osjetljivosti prema H_2O_2, a sve tri skupine kodirane su genima u jezgri (Mittler, 2002). Brojna istraživanja pokazuju kako se koncentracija SOD-a povećava kada je organizam izložen stresnim čimbenicima kao npr. niskim i visokim temperaturama (Gechev i sur. 2003) ili porastom saliniteta okoliša kod halofitnih biljaka (Long i sur. 2008). U istraživanju reakcije bijele djeteline (*Trifolia repens*) na deficit vode, pronađene su poveće koncentracije SOD-a (Lee i sur. 2009). SOD je izrazito stabilan enzim koji ostaje aktivan u organizmu i u stanju anoksije i hipoksije (Biemelt i sur. 2000).



Slika 1. Izoenzimi superoksid-dismutaze imaju u aktivnom centru različite atome - Cu, Zn ili Mn. Nalaze se u različitim odjeljcima stanice i u različitim koncentracijama.

1.2 Beta-kriptogein kao biotički elicitor

Elicitori su tvari biološkog ili nebiološkog podrijetla koji, u doticaju sa stanicama viših biljaka, mogu izazvati brojne fiziološke i morfološke promjene u biljkama (Benhamou, 1996). Elicitori se klasificiraju kao biotički i abiotički, ovisno o njihovom podrijetlu i molekularnoj strukturi (Radman i sur., 2003.). Biotički elicitori su biološkog podrijetla poput plijesni, bakterija, virusa ili biljojeda, ali također mogu biti i komponente stanične stijenke biljaka te fitokemijalije koje se otpuštaju na mjestu obrane biljke od različitih patogena i biljojeda. Kako je povećana sinteza sekundarnih metabolita jedan od odgovora biljke na kontakt s elicitorima, elicitacija se u biotehnologiji koristi za indukciju i povećanje proizvodnje sekundarnih metabolita u biljkama i kulturi biljnog tkiva (Zhao i sur., 2005). Biotehnološki najvažnija je biosinteza taksola pomoću različitih elicitora jer je njegova sinteza prilično skupa. Tretman metil-jasmonatom uzrokuje povećanje sinteze ružmarinske kiseline u staničnoj suspenziji ukrasne koprive (Szabo i sur. 1999), kao i akumulaciju ružmarinske kiseline u kulturi kosmatog korijenja biljke *C. forskohlii* (Li i sur. 2005). Osim toga, elicitori induciraju proizvodnju ROS-a i potiču antioksidacijsku obranu biljke, a također izazivaju hipersenzitivni odgovor (Ebel i Cosio, 1999). Ubrzo nakon što se biljka ili kultura biljnih stanica tretira elicitorima, aktivira se NADPH-oksidaza odgovorna za proizvodnju ROS-a (Lebrun-Garcia i sur, 1999) te se promijeni tok strujanja iona preko stanične membrane (Mathieu i sur, 1991).

Elicitini su oomicetalni fitopatogeni, mali visoko konzervirani holoproteini koje izlučuje vrste roda Phytophthora i Pythium. Oni su odgovorni za induciranje nekrotičnog i hipersenzitivnog

odgovora u biljkama iz porodica Solanaceae i Cruciferae. Dijele se u dvije skupine: *α*- elicitine koji su kiseli, te imaju valinski ostatak na položaju 13 i *β*-elicitine koji su bazični, te sadrže lizin na položaju 13. Prema Fefeu i suradnicima aminokiselinski ostatak na položaju 13 uključen je u kontrolu nekroze, te u vezanju liganada na receptore. *β*-elicitini su 100 puta više otrovni i osiguravaju bolju zaštitu tijekom napada patogena (Yu, 1995).

Beta kriptogein (*β*-kriptogein) je proteinski elicitor oomicete *Phytophthora cryptogea* koji pripada skupini *β*-elicitina. *β*-kriptogein na jednoj strani ima 5 slabije konzerviranih α-petlji, dok je na drugoj strani visoko konzervirana kljunasta struktura koju oblikuju 2 antiparalelne β-ploče i Ω-petlje. Glikozilirani heterodimerni proteini smješteni na plazma membrani su receptori za *β*- kriptogein (Bourque i sur. 1999). Ovaj elicitor uključen je u mnoge biokemijske reakcije kao što su promjene u strujanju iona, fosforilaciju proteina, aktivacija NADPH-oksidaze i protein-kinaze, kao i nastanak ROS-a (Viard i sur. 1994, Lebrun-Garcia i sur. 1999). Istraživanja su pokazala da nedugo nakon infekcije patogenima dolazi do brze proizvodnje ROS-a u biljnim stanicama te daljnja akumalacija ROS-a uzrokuje smrt stanice (Grant i Loake, 2000). Nekoliko istraživanja opisuju transformaciju genom *crypt* radi postizanja rezistencije na napad patogena. Istraživanjima je pokazano da transformacija sintetičkim genom *crypt* pod kontrolom CaMV 35S promotora uzrokuje povećani rast i sintezu sekundarnih metabolita u kulturi transgenog korijenja zimske trešnje (povećanje vitanolida) i transgenom poljskom slaku (*Convolvulus arvensis*). Transformacija genom *crypt* stimulirala je i akumulaciju flavonoida u sjemenu transgenog uročnjaka (Chaudhuri i sur. 2009).

1.3 Cilj rada

Cilj ovog rada bio je odrediti učinak inducibilne ekspresije gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-Kriptogein, na ekspresiju i aktivnost različitih izoenzima SOD-a u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.).

2. Materijali i metode

2.1 Biljni materijal

U istraživanju smo koristili transgeno korijenje ukrasne koprive (*C. blumei*) iz porodice Lamiaceae, koje je uzgojeno *in vitro*. Genetička transformacija izvedena je pomoću bakterije *Agrobacterium rhizogenes*, soja A4, koji sadrži binarni vektor p BinSRNA-*CRYPT*, u kome se gen *crypt* nalazi pod kontrolom alkoholom reguliranog inducibilnog (*alcA*) promotora.

2.2 Održavanje kulture transgenog korijenja

Rad s kulturom kosmatog korijenja odvijao se u sterilnim uvjetima, uključujući sav laboratorijski pribor i posuđe, otopine i hranjive podloge. Tkivo je presađivano u laminaru u sterilnim uvjetima, čija je radna površina dezinficirana 70% -tnim etanolom i sterilizirana UV svjetlom. Transgeno korijenje ukrasne koprive uzgajano je u Petrijevim zdjelicama (Ø 9 cm) na tekućoj (8 mL) Murashige i Skoog (MS) hranjivoj podlozi u inkubatoru u tami pri +28 °C i krutoj (20 mL) MS podlozi pri +25 °C, bez dodatka regulatora rasta. Kultura transgenog korijenja je na krutoj podlozi održavana subkultiviranjem svakih 6 tjedana, dok je na tekućoj podlozi održavana subkultiviranjem svaka 2 tjedna na svježu podlogu. Budući da korjenčići rastom pregrađuju odjeljke, tijekom uzgoja sadržaj je u Petrijevim zdjelicama potrebno jednom dnevno promiješati kako bi se homogenizirao sastav podloge.

2.3 Indukcija sinteze *β*-Kriptogeina u transgenom korijenju

Do stavljanja u pokus korjenčići su subkultivirani svaka 2 tjedna. Tijekom pokusa, korjenčići su rasli u dvije faze. U prvoj fazi rasta je oko 200 mg korjenčića subkultivirano na tekuću hranjivu MS podlogu. U ovoj fazi (dva tjedna) induciran je rast korjenčića, nakon čega su izrasli korjenčići (oko 1g tkiva) presađeni u 8 mL svježe tekuće MS hranjive podloge. Presađivanjem korjenčića u svježu podlogu započinje 2. faza rasta, odnosno faza u kojoj se u biotehnologiji inducira sinteza sekundarnih metabolita. Četvrti dan subkulture (0. dan tretmana) tkivo je, nakon što se prilagodilo novoj hranjivoj podlozi, tretirano etanolom u konačnoj koncentraciji 0.1% i 1% kako bi se inducirala ekspresija gena *crypt*. Tkivo je uzorkovano 3., 7. i 14. dan od tretmana. Kontrolno je tkivo tretirano odgovarajućom količinom sterilne dH_2O, volumenom koji odgovara volumenu etanola.

2.4 Ekstrakcija proteina

Korjenčiće za ekstrakciju ukupnih proteina smo uzorkovali u određenim vremenskim intervalima: prije tretmana etanolom, 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom. Uzorkovane korjenčiće smo isprali u destiliranoj vodi, te ih potom usitnjavali tučkom u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinilpolipirolidona koji služi za uklanjanje fenolnih spojeva iz ekstrakta. Usitnjeno tkivo (oko 0.3 g) vagali smo u tubice te smo proteine ekstrahirali 15 min na ledu uz dodatak 1 mL ohlađenog pufera za ekstrakciju. Homogenate smo zatim centrifugirali 10 minuta pri 18 000 g i +4 °C. Dobivene supernatante smo prebacili u čiste tubice i čuvali na ledu kako bi proteini zadržali svoju aktivnost.

2.5 Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina smo odredili metodom po Bradfordu, koja se temelji na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 na proteine. Slobodna boja postoji u više različitih ionskih oblika; anionski oblik (plavi) veže se na proteine i maksimalno apsorbira na valnoj duljini 595 nm. Razrijeđeni je proteinski ekstrakt (100 µL) pomiješan s 1 mL Bradford reagensa (100 mg CBB G-250, 50 mL etanola, 100 mL 85% fosforne kiseline, dH_2O do 1 L) te inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Koncentracija proteina određuje se prema baždarnom dijagramu albumina goveđeg seruma (BSA). Potom smo intenzitet naših uzoraka mjerili pri 595 nm na spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 2 (PerkinElmer, Waltham, SAD).

2.6 Poliakrilamid gel elektroforeza u nativnim uvjetima

Kako bi sačuvali interakcije među proteinskim podjedinicama i njihovnu nativnu konformaciju, odnosno kako bismo analizirali aktivnost našeg enzima primijenili smo elektroforezu u nativnim uvjetima (PAGE). Izooblici enzima imaju različit ukupan neto naboj i masu te se mogu razdvojiti ovom metodom. Ovisno o smjeru kretanja u električnom polju razlikujemo anionske (kisele) i kationske (bazične) izoenzime. Nakon razdvajanja izoenzima nativnom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, u smjeru anode, pri niskoj temperaturi (elektroforezu smo izvodili u hladnjaku s ohlađenim puferom), slijedi bojanje gela.

2.7 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze na gelu

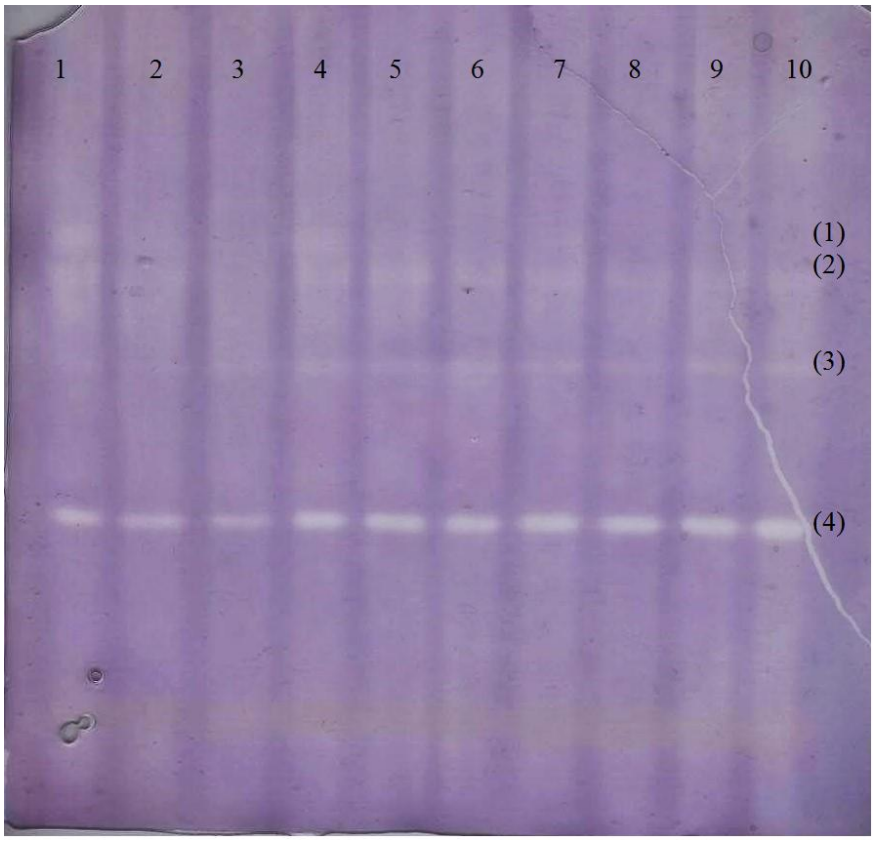
Nakon elektroforeze gel smo prvo inkubirali 25 min u 50 mL otopine kalijev-fosfatnog pufera (KF 7,8 pH), u mraku 15 min u 100 mL 28 mM matične otopine riboflavina. Nakon inkubacije gel smo držali pod flourescentnom lampom sve dok nam se na ljubičastoj podlozi nisu pojavile prugice. Nakon toga smo gel držali u destiliranoj vodi kao bi nam se podloga obezbojila i prugice postale vidljivije.

3. Rezultati

3.1 Izooblici i aktivnost superoksid-dimutaze u transgenom korijenju

Nakon provedene elektroforeze i inkubacije gela u odgovarajućim reagensima za mjerenje aktivnosti SOD-a, na gelu su se pojavile 4 vrpce različitih veličina, koje odgovaraju različitim izooblicima SOD-a (Slika 2). Četiri vrpce se međusobno razlikuju po svojem intenzitetu. Izooblik 2, 3, i 4 (SOD 1, 2, i 4) prisutan je kod svih skupina korjenčića (kontrolnog korijenja tretiranog vodom i korijenja tretiranog različitim koncentracijama etanola). Izooblik SOD 1 uočen je samo kod transgenog korijenja gdje je ekspresija gen *crypt* inducirana 1%-tnim etanolom. Najintenzivnija je bila 4. vrpca najmanje molekulske mase (SOD 4), čiji smo

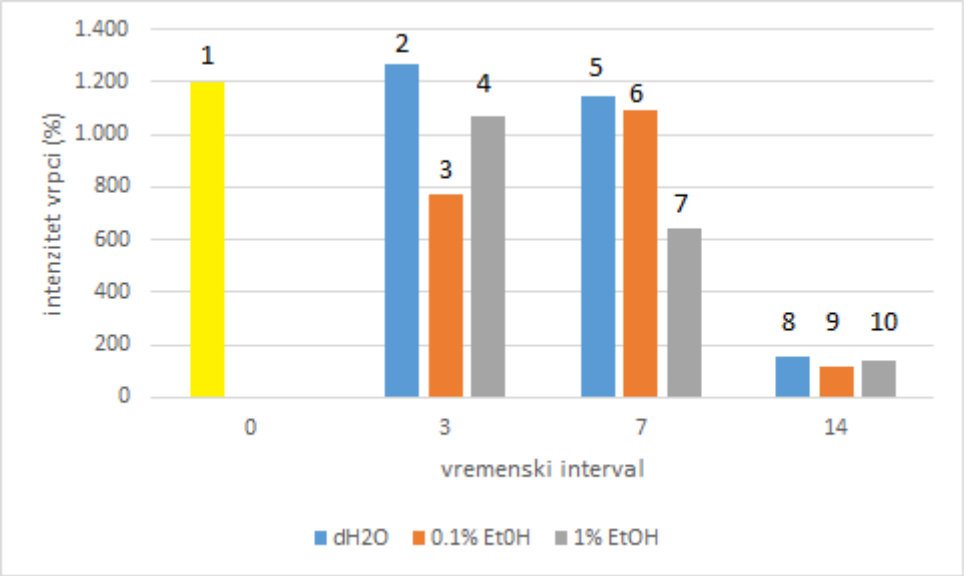
intenzitet kvantificirali, dok se ostale vrpce, iako prisutne, slabo uočavaju (Slika 2). Napravili smo i kvantifikaciju vrpce broj 3 (SOD 3), dok preostale dvije nismo uspjeli kvantificirati. Kako u biljkama ima najviše izoenzima Cu-Zn SOD-a, pretpostavljamo da vrpca broj 4 pripada ovom izoenzimu.



Slika 2. Aktivnost 4 različita izoenzima superoksid-dismutaze na gelu nakon elektroforeze u nativnim uvjetima. Brojevi od 1-4 desno označavaju broj vrpci, tj. broj izoenzima (SOD1, 2, 3, 4), a brojevi od 1-10 redom označavaju: 1) kontrolno tkivo uzorkovano prije tretmana, 2) tkivo tretirano H_2O 3. dan, 3) tkivo tretirano 0.1%-tnim etanolom 3. dan, 4) tkivo tretirano 1%-tnim etanolom 3. dan, 5) tkivo tretirano H_2O 7. dan, 6) tkivo tretirano 0.1%-tnim etanolom 7. dan, 7) tkivo tretirano 1%-tnim etanolom 7. dan, 8) tkivo tretirano H_2O 14. dan, 9) tkivo tretirano 0.1%-tnim etanolom 14. dan i 10) tkivo tretirano 1%-tnim etanolom 14. dan.

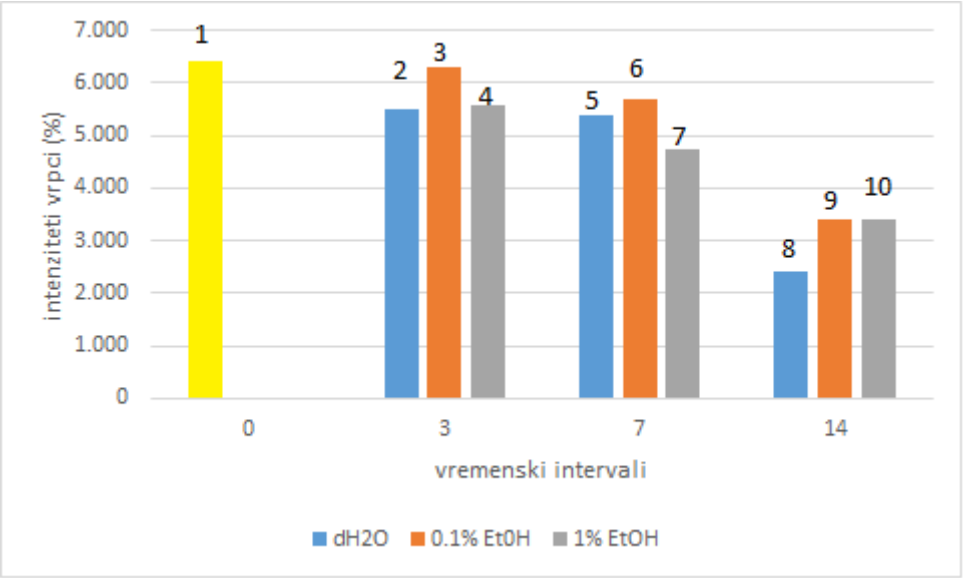
Korjenčići su tretirani 0,1 i 1%- tnim etanolom kako bi se inducirala ekspresija *β*-Kriptogeina, te su uzorkovani nakon 3, 7 i 14 dana. Treći dan nakon tretiranja 0,1 i 1%-tnim etanolom zabilježeno je smanjenje aktivnosti SOD-a 3 u odnosu na kontrolnu skupinu. Sedmi dan nakon tretiranja 0,1%-nim etanolom aktivnost izoenzima SOD 3 je bila neznatno manja u odnosu na kontrolu, dok je kod tretmana 1%-tnim etanolom zabilježeno smanjenje od 50% u odnosu na

kontrolnu grupu (Slika 3). Dva tjedna nakon tretmana objema koncentracijama etanola, aktivnosti izoenzima SOD 3 bile su neznatno manje u odnosu na kontrolu (Slika 3).



Slika 3. Aktivnost izoenzima SOD 3 (3. vrpca na gelu), u transgenom korijenju ukrasne koprive prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1% -tnim etanolom Kontrolno tkivo tretirano je vodom (dH_2O). Brojevi iznad stupića odgovaraju brojevima uzoraka na slici 2.

Treći dan nakon tretmana transgenog korijenja 0,1 i 1%-tnim etanolom uočeno je neznatno povećanje aktivnosti izoenzima SOD 4, koje je bilo izraženije kod tretmana s 0.1%-tnim etanolom. Sedmi dan nakon tretmana s 0,1%-tnim etanolom zabilježeno je malo povećanje aktivnosti, dok je kod tretmana s 1%-tnim etanolom aktivnost bila neznatno manja u odnosu na kontrolu (Slika 4). Dva tjedna nakon tretmana 0,1% i 1%-tnim etanolom aktivnost izoenzima SOD 4 je znatno porasla u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 4).



Slika 4. Aktivnost izoenzima SOD 4 (4. vrpca na gelu), u transgenom korijenju ukrasne koprive prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1% -tnim etanolom Kontrolno tkivo tretirano je vodom (dH_2O). Brojevi iznad stupića odgovaraju brojevima uzoraka na slici 2.

4. Rasprava

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona koji su zaslužni za nestabilnost i reaktivnost molekula. Ovisno o naboju oni mogu biti pozitivni, negativni ili neutralni. Slobodni radikali u organizmu obično su prisutni u vrlo niskoj koncentraciji, no i u niskim koncentracijama pokazuju štetne posljedice. Zbog visoke kemijske reaktivnosti lako stupaju u reakciju međusobno ili sa drugim molekulama. Većinu slobodnih radikala u organizmu čini ROS. ROS uključuju niz kemijski reaktivnih molekula nastalih metabolizmom kisika, koji mijenjaju svojstva tvari s kojima reagiraju mjenjajući njihovu funkciju što ih čini toksičnima (Gill i Tuteja, 2010). Nemogućnost organizma da održava ravnotežu između nastanka i uklanjanja ROS-a rezultira nastankom oksidacijskog stresa. Kao obranu, biljke su razvile antioksidacijski sustav koji katabolizira reaktivne kisikove spojeve i regulira njihovu koncentraciju u stanici. Glavni antioksidacijski enzimi za obranu biljne stanice od oksidacijskog oštećenja su SOD, katalaza i askorbat-peroksidaza. Regulacijom aktivnosti ovih enzima, te djelomičnim posredovanjem salicilne kiseline, može pridonijeti povećanju koncentracije ROS-a i na taj način aktivirati obranu nakon infekcije patogenom (Dorey i sur., 1998). Rezultati citiranog rada nam pokazuju da ROS ima važnu ulogu u obrambenom sustavu biljke. Postoje istraživanja koja pokazuju kako su ROS važne signalne molekule uključene u rast i razvoj biljke, programiranu smrt stanice, te kako su važna komponenta odgovora biljke

na abiotičke čimbenike kao i snažanog odgovora biljke na infekciju patogenima (Jones, 2006; Foyer, Noctor, 2005, 2009).

Elicitacija se u biotehnologiji koristi za indukciju i povećanje proizvodnje sekundarnih metabolita u biljkama i kulturi biljnog tkiva (Zhao i sur., 2005). Biotehnološki najvažnija je biosinteza taksola pomoću različitih elicitora jer je njegova sinteza prilično skupa.

Osim za proizvodnju biljnih sekundarnih metabolita, biotički elicitori mogu inducirati obrambeni odgovor, te se zbog toga često koriste i za stjecanje otpornosti biljke na patogene i druge okolišne utjecaje. Ubrzo nakon što se biljka ili kultura biljnih stanica tretira elicitorima, aktivira se NADPH-oksidaza odgovorna za proizvodnju ROS-a (Lebrun-Garcia i sur, 1999) te se promijeni tok strujanja iona preko stanične membrane (Mathieu i sur, 1991). Tretman *β*-Kriptogeinom stimulirao je rast kosmatog korijenja zimske trešnje kao i povećanu sintezu kalistegina u korijenju ladoleža (Chaudhuri i sur. 2009). Biokemijski mehanizmi na kojima se temelji zatvaranje stanica zapornica kod rajčice (*Lycopersicon esculentum* L.) i komeline (*Commelina communis* L.) , uslijed djelovanja elicitora, pokazuju da zaražene stanice zapornice mogu zatvoriti svoje puči povećanom proizvodnjom H_2O_2 i sukladno tome uzrokovanjem oksidacijskog stresa. Time se zapravo ometa infekcija patogena kroz pore puči (Lee i sur, 1999). Prema Toressu i sur. (2006), povećana koncentracija ROS-a u biljnim stanicama je jedan od prvih odgovora biljke na prepoznavanje infekcije patogenom. U ovome radu smo istraživali utjecaj gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-kriptogein na ekspresiju i aktivnost izoenzima SOD-a u transgenom korijenju ukrasne koprive. Nativnom elektroforezom smo na gelu uočili četiri vrpce, odnosno četiri izoenzima SOD-a. Izoenzimi SOD-a su prisutni u različitim odjeljcima stanice i u različitim koncentracijama. SOD pripada skupini metaloenzima, koji katalizira uklanjanje superoksidnog radikala uz nastanak molekule kisika i manje reaktivnog H_2O_2, kojeg potom uklanja katalaza. Prema našem istraživanju, genetičkom elicitacijom *β*-kriptogeinom se postiže povećanje ekspresije antioksidacijskih enzima što dovodi do smanjenja oksidacijskog stresa u stanicama biljke. Premda smo očekivali znatno veći postotak povećanja aktivnosti izoenzima koji stoje prvi u redu na putu antioksidacijske obrane. Drugi izoenzimi dokazani u našem istraživanju su pokazali smanjenje aktivnosti u odnosu na kontrolu i do 50%. Inducibilna ekspresija gena *crypt* je stimulirala povećanu aktivnost izoenzima SOD1 uslijed izlaganja 0.1 i 1%-tnim etanolom (Slika 4). Za razliku od izoenzima vrpce 4, na izoenzime vrpce 3 tretiranje etanolom nije stimuliralo povećanu aktivnost SOD-a. Očekivano je bilo da će najveća aktivnost izoenzima biti 14. dan tretiranja etanolom, no u ovom slučaju najveća aktivnost bila zabilježena nakon 3. dana. Obzirom na rezultate ovog

istraživanja, smatram da bi daljnja proučavanja inducibilne ekspresije gena crypt bili dobar način u stjecanja uvida u mehanizam obrane biljke od patogena i zaštite od okolišnog stresa.

5. Zaključak

U transgenom korijenju ukrasne koprive eksprimirane su tri izooblika SOD-a, dok je izooblik najveće molekulske mase SOD 1, eksprimiran samo u korijenju gdje je ekspresija gena *crypt* inducirana 1%-tnim etanolom.

Ekspresija gena *crypt* uzrokovala je smanjenje aktivnosti izooblik SOD 3, dok je aktivnost izooblika SOD 4 bila povećana u odnosu na kontrolu.

Izooblik SOD 4 po zastupljenosti u tkivu odgovara izoenzimu Cu, Zn – SOD, koji je u biljnom tkivu najzastupljeniji.

6. Literatura

Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, *53*(372), 1331-1341.

Bauer N, Leljak-Levanić D, Mihaljević S, Jelaska S. 2002. Genetic transformation of Coleus blumei Benth. using Agrobacterium. *Food Technology and Biotechnology*, *40*(3), 163-169.

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

Bourque S, Binet M-N, Ponchet M, Pugin A, Lebrun-Garcia A (1999) Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. J Biol Chem 274:34699–34705

Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Jefferson RA. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, *433*(7026), 629-633.

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.

Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J. 1982. Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295, 432 – 434.

Demidchik V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, *109*, 212-228.

Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B, Kauffmann S**,** 1999 Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor.

Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. Int Rev Cytol 148:1–36.

Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM. 1997. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, *100*(2), 241-254.

Gayler KR, Popa KM, Maksel DM, Ebert DL, Grant BR. 1997. The distribution of elicitin-like gene sequences in relation to elicitin protein secretion within the class Oomycetes. *Mol. Plant Pathology On-Line:[http://www. bspp. org. uk/mppol/]*.

Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of plant physiology*, *160*(5), 509-515.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930.

Goel MK, Goel S, Banerjee S, Shanker K, Kukreja AK. 2010. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformed roots of Rauwolfia serpentina for reserpine biosynthesis. *Med Aromat Plant Sci Biotech*, *4*, 8-14.

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. Plant J 23:441–450.

Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen, RD. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(4), 1629-1633.

Kamoun S, Hraber P, Sobral B, Nuss D, Govers F. 1999. Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen Phytophthora infestans based on expressed sequences. *Fungal Genetics and Biology*, *28*(2), 94-106.

Knezevic J. 1990. Susceptibility of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench.) to Agrobacterium tumefaciens and A. rhizogenes. *Fagopyrum:* 10 57-61.

Krizek DT, Semeniuk P, Moline HE, Mirecki RM, Abbott JA. 1985. Chilling injury in coleus as influenced by photosynthetically active radiation, temperature and abscisic acid pretreatment. I. Morphological and physiological responses. *Plant, Cell & Environment*, *8*(2), 135-142.

Lee BR, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avice JC, Ourry A, Kim TH. 2009. Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. *Biologia Plantarum*, *53*(3), 505-510.

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.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, *7*(9), 405-410.

Nedelkoska TV, Doran PM. 2000. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of Thlaspi caerulescens. *Biotechnology and Bioengineering*, *67*(5), 607-615.

Nilsson O, Olsson O. 1997. Getting to the root: the role of the Agrobacterium rhizogenes rol genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*, *100*(3), 463-473.

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, *49*(1), 249-279.

Old RW, Primrose SB. 1989. *Gene transfer to plants, Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK pp 222-252

Perelman A, Dubinsky Z, Martínez R. 2006. Temperature dependence of superoxide dismutase activity in plankton. *Journal of experimental marine biology and ecology*, *334*(2), 229-235.

Polle A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, *126*(1), 445-462.

Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, *101*(1), 7.

Torres, MA., Jones, JD., & Dangl, JL. 2006 Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*, *141*(2), 373-378.

Van Larabeke N, Gentello C, Schell J, Schilperoort RA, Hermans AK, Hernalsteens JP, Van Montagu M. 1975. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability, Nature, 225: 742-743.

Vuleta A, Tucić B. 2009. Thermal dependence of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in foliage of Iris pumila L. *Arch. Biol. Sci*, *61*(3), 441-446.

Watson B, Currier TC, Gordon MP, Chilton MD, Nester EW. 1975. Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens.*Journal of Bacteriology*, *123*(1), 255-264.

Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, *322*(3), 681-692.

Xiao-Hua L, Mehta SK, Zhao-Pu L. 2008. Effect of NO^- 3-N enrichment on seawater stress tolerance of jerusalem artichoke (helianthus tuberosus). *Pedosphere*, *18*(1), 113-123.

Yuan YJ, Li C, Hu Z D, Wu JC, Zeng AP. 2002. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of Taxuschinensis var. mairei for taxol production. *Process Biochemistry*, *38*(2), 193-198.

Yu LM. 1995. Elicitins from Phytophthora and basic resistance in tobacco.*Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(10), 4088-4094.

Zaninotto F, La Camera S, Polverari A, Delledonne M. 2006. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology*, *141*(2), 379-383.

Web 1. http://iosrjournals.org/