Ekspresija gena crypt mijenja antioksidacijski odgovor transgenog korijenja ukrasne koprive (Coleus Blumei Benth.) na solni stres

Viljanac, Branka

Master's thesis / Diplomski 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:181:961036

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

Branka Viljanac

Ekspresija gena *crypt* mijenja antioksidacijski odgovor transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.) na solni stres

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2016.

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

Ekspresija gena *crypt* mijenja antioksidacijski odgovor transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.) na solni stres

Branka Viljanac

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek
Mentor: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent
Neposredni voditelj: dr. sc. Rosemary Vuković

Sažetak: Solni stres je vrlo važan ograničavajući abiotički čimbenik, koji predstavlja sve veći problem današnjice za mnoge biljke. Solni stres dovodi do prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih tvari (ROS) koje dovodi do je pojave okidacijskog stresa u biljaka. U borbi protiv oksidacijskog stresa sudjelujuenzimski i neenzimski antioksidacijski sustav biljke. Za povećanje otpornosti biljaka na biotički i abiotički stres često se koriste tretmani biotičkim elicitorima. *β*-Kriptogein je biotički elicitorkoji izlučuje fitopatogena oomiceta *Phythophthora cryptogea*, koji kod biljaka izaziva hipersenzitivni odgovor i sustavno stjecanje otpornosti naneke izvore stresa. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj inducibilne ekspresije gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-kriptogein, na oksidacijski i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.) izloženog solnom stresu. Kako bi se utvrdio oksidacijski status transgenog korijenja mjerene su koncentracije vodikovog peroksida (H_2O_2) i produkata lipidne peroksidacije (LPO), dok je antioksidacijski status određen mjerenjem aktivnosti enzima katalaze (CAT) i gvajakol-perokidaze (GPOD). Inudcibilna ekspresija oomicetalnog elicitora *β*-kriptogeina ublažava učinak solnog stresa u transgenom korijenju ukrasne koprive povećanjem antioksidacijskog statusa tkiva. Stoga bi inducibilna ekspresija gena *crypt* mogla biti dobra strategija u obrani biljaka od različitih okolišnih stresova.

Broj stranica: 44
Broj slika: 10
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 111
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: solni stres, oksidacijski stres, antioksidacijski sustav, *β*-kriptogein, transgeno korijenje

Datum obrane:.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Ivna Štolfa Čamagajevac*, docent
2. dr. sc. *Ljiljana Krstin*, docent
3. dr. sc. *Dubravka Špoljarić Maronić*, docent

Rad je pohranjen u: 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

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

Expression of *crypt* gene changes antioxidative response oftransgenic roots *Coleus blumei* Benth. to salt stress

Branka Viljanac

Thesis performed at Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek
Supervisor: Ph. D. Ivna Štolfa Čamagajevac, Assistan Professor
Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

Abstract: Salt stress is a very important limiting abiotic factor thatnowadays presents a growing problem for many plants. Salt stress leads to excessive production of reactive oxygen species (ROS), resulting in the emergence oxidative stress in plants. In defense against oxidative stress participate enzymatic and non-enzymatic antioxidant system of plants. To improve plant resistance to abiotic and biotic stress often are used biotic elicitors treatments. *β*-Cryptogein is a biotic elicitor, secreted by oomycete *Phytophthora cyptogea*, that induces hypersensitive response and systemic acquired resistance againstin plants against some stress sources. The aim of this study was to estimate the impact of *β*-cryptogein on oxidative and antioxidative status of *Coleus blumei* Benth.transgenic roots exposed to salt stress. To determine oxidative status of transgenic roots, concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) and products of lipid peroxidation (LPO) were mesured. Antioxidative status was determined by measuring catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPOD) activities. Induced expression of oomycetal elicitor *β*-cryptogein reduce the effect of the salt stres in transgenic root of *C. blumei* by increasing antioxidative status. Induced expression of *crypt* gene might be potentialstrategy in plant defence against various environmental stresses.

Number of pages: 44
Number of figures: 10
Number of tables: 1
Number of references: 111
Original in: Croatian
Key words: salt stress, oxidative stress, antioxidative status, *β*-cryptogein, transgenic roots

Date of the thesis defence:.

Reviewers:

1. Ph. D. *Ivna Štolfa Čamagajevac*, Assistant Professor
2. Ph. D.*Ljiljana Krstin*, Assistant Professor
3. Ph. D. *Dubravka Špoljarić Maronić*, Assistant Professor

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

1. UVOD 1

1.1.*β*-Kriptogein – biotički elicitor 1

1.2. Reaktivne kisikove tvari i oksidacijski stres 3

1.2.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa 4

1.2.1.1. Vodikov peroksid 4

1.2.1.2. Lipidna peroksidacija 4

1.2.2. Pokazatelji antioksidacijskog statusa biljke 5

1.2.2.1. Katalaza 5

1.2.2.2. Gvajakol-peroksidaze 6

1.3. Biljke i solni stres 6

1.4. Cilj rada 8

2. MATERIJALI I METODE 9

2.1. Materijali 9

2.1.1. Biljni materijal 9

2.1.2. Hranjiva podloga za uzgoj transgenog korijenja 10

2.1.3. Uređaji 11

2.1.4 Kemikalije i otopine 11

2.2. Metode 12

2.2.1. Održavanje kulture kosmatog korijenja 12

2.2.2.Solni stres i indukcija sinteze *β*-kriptogeina u transgenom korijenju 12

2.2.3. Određivanje količine H_2O_2 13

2.2.4. Određivanje količine reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline 14

2.2.5. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina 14

2.2.6. Određivanje koncentracije proteina 14

2.2.7. Određivanje aktivnosti katalaze 15

2.2.8. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaza 15

2.3. Statistička obrada podataka 15

3. REZULTATI 17

3.1. Količina vodikovog peroksida u transgenom korijenju ukrasne koprive 17

3.2. Razina lipidne peroksidacije u transgenom korijenju ukrasne koprive 20

3.3. Aktivnost katalaze u transgenom korijenju ukrasne koprive 23

3.4. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u transgenom korijenju ukrasne koprive 26

4. RASPRAVA 29

5. ZAKLJUČCI 33

6. LITERATURA 34

1. UVOD

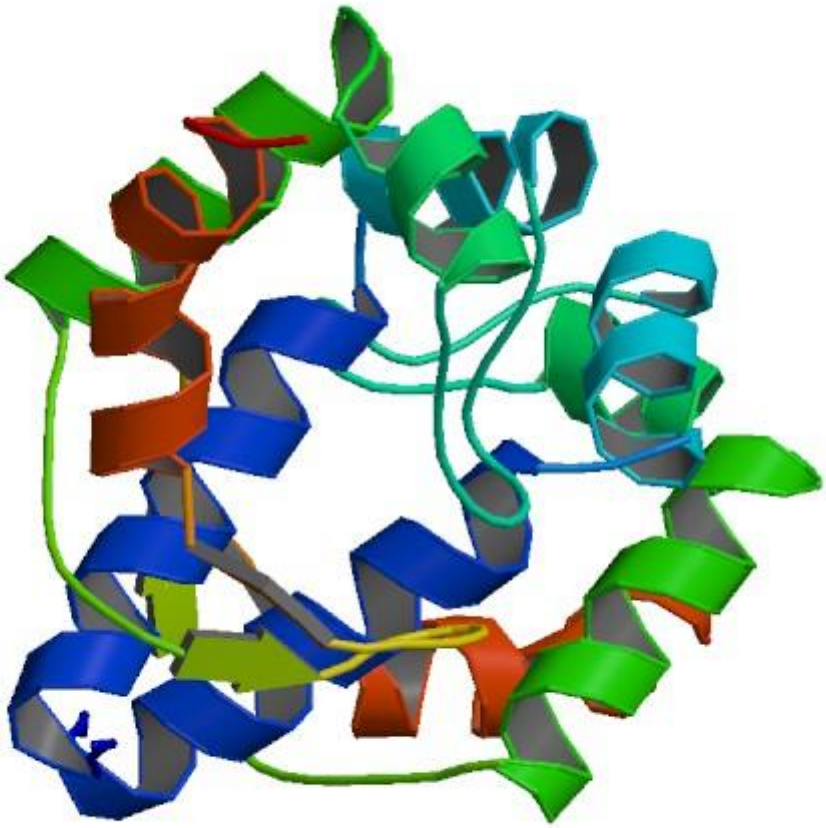
1.1.*β*-Kriptogein – biotički elicitor

Pojam elicitor korišten je isključivo za tvari koje su poticale sintezu fitoaleksina, no sada se koristi za sve tvari koje potiču obrambeni odgovor biljke (Ebel i Cosio 1994). Indukcija obrambenog odgovora biljaka elicitorima može dovesti do pojačanog otpora biljke. Elicitori su klasificirani kao biotički ili abiotički, ovisno o njihovom podrijetlu i strukturi molekule (Boller 1995, Ebel i Cosio 1994). Abiotički elicitori su tvari koje nisu biološkog podrijetla, a podrazumjevaju kemijske, fizičke i hormonalne čimbenike. Biotički elicitori su tvari biološkog podrijetla te uključuju razne plijesni, bakterije, viruse, fitokemikalije te komponente stanične stijenke koje se otpuštaju na mjestu napada patogena ili biljojeda (Naik i Al-Kayri 2016, Radman i sur. 2003). Oni induciraju obrambeni odgovor biljke, te se koriste pri proizvodnji sekundarnih metabolita (Zhao i sur. 2005).Općenito tretmani biotičkim elicitorima se koriste za povećanje otpornosti biljke na patogene te i na druge okolišne čimbenike. Elicitori su jedan od važnih faktora koji djeluju kao prekidači za povećanje sinteze sekundarnih metabolita, korisnih bioaktivnih spojeva u kulturama stanica (Gaid i sur. 2011), te je elicitacija je jedna od najznačajnijih metoda za povećanje proizvodnje sekundarnih metabolita. Elicitor igra važnu ulogu u poticanju kaskadnih puteva prijenosa signala koji pokreće povećanu ekspresiju gena potrebnih za sintezu sekundarnih biljnih metabolita (Shinde i sur. 2009, Verma i sur. 2014). Jednako tako, primjenom elicitora u biljkama se aktiviraju signalni putevi unutarstanične obrane (Odjacova i Hadjiivanova 2001, Garcia-Brugger i sur. 2006). Koncentracija elicitora igra važnu ulogu u procesu elicitacije. Pri visokim dozama potiče se hipersenzitivni odgovor, što dovodi do stanične smrti, dok je samo optimalna razina potrebna za indukciju (Mukandan i Hjorosto 1987, Collinge i Susarenka 1990).

Elicitini su skupina malih proteina, tzv. proteinski elicitori koje luče vrste roda *Phytophthora*. To su vrlo konzervirani holoproteini veličine 10 kDa. Smatraju se glavnim odrednicama u obrambenom odgovoru duhana protiv oomiceta, jer pročišćeni elicitini, sami i pri niskim koncentracijama, mogu izazivati snažne obrambene reakcije. Nazivaju se još i oomicetalni fitopatogeni. Dvije su strukturne skupine elicitina, *α* i *β*-elicitini (Lloyd 1995). *α*-Elicitini su kiseli proteini koji imaju valinski aminoskiselinski ostatak na 13. mjestu, dok su

β-elicitini bazični proteini te na istom mjestu sadrže lizinske ili treoninske ostatke. Aminokiselinski ostatak na 13. mjestu je aktivno ili regulatorno mjesto ključno za toksičnost (Fefeu i sur. 1997). *β*-Elicitini uzrokuju više nekroza i samim time pružaju bolju zaštitu od napada patogena (Lloyd 1995).

β-Kriptogein pripada skupini elicitina koji sadrže sterole i svojstva za prijenos lipida tekoji su sposobni izazvati obrambenu reakciju na patogene, uključujući ekspresiju obrambenih gena i sustavno stečenu otpornost (SAR) (Ponchet i sur 1999, Osman i sur. 2001, Blein i sur. 2002, Buhot i sur. 2004, Garcia-Brugger i sur. 2006). Proizvodi ga oomiceta *Phytophthora cryptogea*,a sastoji se od 5 konzerviranih *α*-petlji, a s druge strane nalazimo kljunastu strukturu koju oblikuju 2 antiparalelne β-ploče i Ω-petlje (Bourque i sur. 1999) (Slika 1). Istraživanja na suspenziji duhanskih stanica pokazala su kako *β*-kriptogein inducira fosforilaciju proteina, protok kalcija, efluks klora i kalcija, depolarizaciju membrane, aktivaciju membranske NADPH-oksidaze, aktivaciju protein-kinaza, te ekspresiju obrambenih gena kao i stvaranje reaktivnih kisikovih tvari (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Viard i sur. 1994, Tavernier i sur. 1995, Pugin i sur. 1997, Lebrun-Garcia i sur. 1998, Kieffer i sur. 2000, Leborgne-Castel i sur. 2008). Do ovih događaja dolazi nakon vezanja *β*-kriptogeina na specifične receptore (glikozilirani heterodimerni proteini) smještene na plazma membrani stanice (Bourque i sur. 1999). Važan oblik biljne obrane je hipersenzitivni odgovor u kojem dolazi do brze stanične smrti oko mjesta infekcije kako bi se ograničio rast patogena. Jedan od najranijih odgovora biljaka na djelovanje *β*-kriptogeina je proizvodnja ROS-a. Provedena istraživanja pokazala su kako *β*-kriptogein uzrokuje brzu proizvodnju ROS-a u biljkama nekoliko minuta nakon percepcije patogena, dok daljnja akumulacija ROS-a u konačnici rezultira smrću stanice (Grant i Loake 2000).



Slika 1. Struktura *β*-kriptogeina. (Izvor: Web 1)

1.2. Reaktivne kisikove tvari i oksidacijski stres

Jedna od najvažnijih funkcija biljnih stanica je sposobnost da reagiraju na promjene u svojoj okolini. Različiti okolišni čimbenici kao što su npr. promjena temperature, salinitet, suša, poplave i drugo mogu uzrokovati oksidacijski stres u stanici. Oksidacijski stres se definira kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko - redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja velike količine ROS-a, kao što su superoksidni radikal ($O_2^{\cdot}$), hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$), perhidroksil radikal ($HO_2^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) i peroksil ($RO_2^{\cdot}$) radikal, vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($^1O_2$) i ozon (O_3) (Arora i sur. 2002, Halliwell 1996), pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica. ROS su reaktivne molekule koje djeluju tako da stupaju u interakciju sa

različitim staničnim molekulma i samim time smanjuju ili potpuno uništavaju njihovu funkciju (Foyer i Noctor 2001, Vranova i sur. 2002). U normalnim uvjetima, ROS se pojavljuju u stanicama kao štetni nusprodukti, nastali kao rezultat uzastopne redukcije molekularnog kisika. Pri povećanju razine ROS-a u stanici uključuje se enzimski i neenzimski antioksidacijski sustav koji ih učinkovito uklanja (Cassells i Curry 2001).

1.2.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa

1.2.1.1. Vodikov peroksid

H_2O_2 je reaktivni oblik kisika koji se aktivno stvara u stanici, a preteča je brojnim drugim radikalima. Relativno je stabilan spoj koji ima dug životni vijek te djeluje i kao signalna molekula jer prolazi kroz stanične membrane (Wojtaszek 1997). H_2O_2 ima važnu ulogu u nepovoljnim životnim uvjetima, omogućava biljci stjecanje otpornosti u stresnim uvjetima (Dat i sur. 2000). Sudjeluje u mnogim mehanizmima rezistencije, uključujući jačanje stanične stijenke, proizvodnju fitoaleksina, poboljšanje otpornosti na stres (Dempsey i Klessig 1995). Također je dokazano kako H_2O_2 djeluje kao ključni regulator u širokom rasponu fizioloških procesa kao što je senescencija (Peng i sur. 2005), fotorespiracija i fotosinteza (Noctor i Foyer 1998), otvaranje i zatvaranje puči (Bright i sur. 2006), stanični ciklus (Mittler i sur. 2004) te rast i razvoj (Foreman i sur. 2003).

Do pojačanog stvaranja H_2O_2 dolazi izlaganjem biljke stresnim uvjetima (Foyer i sur. 1997). U određenoj mjeri višak akumulacije H_2O_2 može dovesti do oksidacijskog stresa kod biljaka, koji potom aktivira staničnu smrt. Razina H_2O_2 u stanicama regulirana je širokim rasponom antioksidacijskih enzima od kojih su najvažniji katalaza (CAT) i različite peroksidaze (POD) koje uklanjaju H_2O_2 prevođenjem u vodu. Održavanje koncentracije H_2O_2 u stanici na odgovarajućoj razini može potaknuti razvoj biljke i povećati njezinu otpornost na okolišne stresore (Neill i sur. 2002).

1.2.1.2. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LPO) bioloških membrana je najočitiji simptom oksidacijskog stresa u biljaka (Labudda 2013). Peroksidacija lipida može se opisati kao proces u kojem oksidansi, kao što su slobodni radikali, napadaju lipide a ponajviše višestruko nezasićene

masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids,* PUFA). Glavna mjesta napada u molekulama fosfolipida su dvostruke veze između dva ugljikova atoma te esterska veza između glicerola i masne kiseline (Yin i sur. 2011). Kada razine ROS-a u stanicama postanu prevelike, biljka gubi sposobnost uklanjanja te se u biološkim membranama povećava razina LPO, što utječe nepovoljno na fiziološke procese u stanici. Osim ROS-a, oštećenja membrana peroksidacijom PUFA-e mogu pokrenuti i lipidni radikali ili se može potaknuti enzimskim djelovanjem lipooksigenaze (LOX). LOX je ključni enzim LPO-a koji proizvodi hidroperokside, uvodeći molekularni kisik u linolnu (LA) i linolensku kiselinu (LnA) (Rosahl, 1996). Završni produkti LPO su reaktivni aldehidi. To su 4-hidroksialkenali i drugi srodni nezasićeni aldehidi koji se smatraju „drugim toksičnim glasnicima" primarnih slobodnih radikala (Esterbauer i sur. 1991). Kao pokazatelji oksidacijskog stresa najčešće se mjere krajnji produkti lipidne peroksidacije (npr. malondialdehid). Malodialdehid (MDA) je jedan od krajnih produkata oksidacijske modifikacije lipida, te je on odgovoran za oštećenja staničnih membrana, uključujući promjene svojstava membrane kao što je propusnost, transport iona, gubitak enzimske aktivnosti i sl. Ove promjene u konačnici dovode do stanične smrti (Sharma i sur. 2012).

1.2.2. Pokazatelji antioksidacijskog statusa biljke

Ukoliko se razina ROS-a poveća, u biljkama se inducira obrambeni mehanizam koji uključuje enzimski i neenzimski antioksidacijski sustav koji ih učinkovito uklanja. Međutim, kada stanica izgubi kontrolu nad stvaranjem i razgradnjom ROS-a, nastupaju velika stanična oštećenja (Cassells i Curry 2001). Najvažniji antioksidacijski enzimi su superoksid-dismutaza (SOD), POD, CAT, askorbat-peroksidaza (APX) i glutation-reduktaza (GR) (Allen 1995). Neenzimski antioksidansi uključuju one topive u vodi (askorbat, glutation, fenolni spojevi i flavonoidi) i topive u lipidima (a-tokoferol, b-karoten, likopen) (Rao i sur. 1996).

1.2.2.1. Katalaza

CAT je enzim koji se nalazi u svim aerobnim eukatiotima a važan je pri uklanjanju H_2O_2 pohranjenog u peroksisomima nastalog djelovanjem oksidaza u procesu *ß*-oksidacije masnih kiselina, glikoksilatnog ciklusa i transporta mitohondrijskih elektrona. Lokalizirana je

u mitohondrijima, peroksisomima i citoplazmi viših biljaka (Bray i sur. 2000). CAT je tetramerni enzim koji sadrži hem skupine koji katalizira razgradnju H_2O_2navodu i kisik, prema jednadžbi: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (Scandalias 1990, Willekens 1997).

CAT ima važnu ulogu u obrani biljke, starenju i scenescenciji. U biljkama izloženim stresu, dolazi do značajanog porasta aktivnosti CAT pri čemu katalaza štiti biljku od LPO membranskih sustava i oksidacijskog oštećenja uklanjanjem H_2O_2 (Mafakheri i sur. 2011). Za razliku od POD, CAT ima znatno manji afinitet za H_2O_2 (Willekens i sur. 1995).

Zanimljivo je napomenuti da je CAT vrlo osjetljiva na svjetlost te ima visoku stopu fluktuacije (Hertwig i sur. 1992). To može biti rezultat apsorpcije svjetla od strane hem skupine ili inaktivacije H_2O_2. Stresni uvjeti kojima se smanjuje stopa prometa proteina, kao što su salinitet i promjena temperature, uzrokuju smanjenje aktivnosti CAT (Hertwig i sur 1992, Feirabend i sur. 1992).

1.2.2.2. Gvajakol-peroksidaze

U obrani biljaka od štetnog djelovanja ROS-a važnu ulogu imaju POD. To su glikoproteini koji sadrže hem skupinu te su uključeni u mnoge fiziološke cikluse u biljaka (npr. katabolizam auksina, lignifikaciju, suberinizaciju, obranu biljke, zarastanje rana) (Gaspar i sur. 1991, Asada 1992). POD također sudjeluju u kontroli razine H_2O_2 i tako štite stanice koje su izložene stresnim uvjetima (Del Rio i sur. 1998).

Gvajakol-peroksidaza (GPOD) pripada biljnim peroksidazama skupine III koje su uključene u regulaciju mnogih fizioloških procesa te u antioksidacijskom odgovoru u uvjetima stresa (Hiraga u sur. 2001, Mathe i sur. 2010). Budući da GPOD imaju veći afinitet za H_2O_2 od CAT, imaju važniju ulogu od CAT u uklanjanju ROS-a tijekom oksidacijskog stresa (Gill i Tuteja 2010, Tayefi-Nasrabadi 2011). Za redukciju H_2O_2 peroksidaza koristi organski supstrat kao donor elektrona prema jednadžbi: $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + H_2O$.

1.3. Biljke i solni stres

Stres je svako stanje nekog sustava ili organizma koje odstupa od optimuma. Do stresa dolazi utjecajem različitih čimbenika, vanjskih ili unutrašnjih. Biljke su tijekom svog životnog perioda izložene različitim stresnim uvjetima koji djeluju nepovoljno na njihov

razvoj. Stresni čimbenici se dijele na abiotičke (fizikalno- kemijske) i biotičke (biološke) (Vukadinović 2016).

Abiotički stres se definira kao negativan utjecaj neživih čimbenika na žive organizme u nekom okruženju. Biljke su posebno ovisne o okolišnim čimbenicima, tako da svaki negativni utjecaj ovih čimbenika ima velike posljedice na rast i produktivnost usjeva u svijetu. Čimbenici koji uzrokuju abiotički stres su temperatura, svjetlost, količina vode te koncentracija mineralnih tvari.Kako bi preživjele stresne uvjete biljke su razvile sposobnost prilagodbe, u koje se ubraja i veliki broj fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena.

Solni stres spada u jedan od glavnih ograničavajućih abiotičkih čimbenika te utječe na ograničenu produktivnost i rast usjeva (Flowers 2004, Jaleel i sur. 2007, Athar i sur. 2008). Salinitet uzrokuju razni prirodni procesi ili ljudski postupci koji rezultiraju nakupljanjem otopljenih soli u suprstratu u tolikoj mjeri da dolazi do inhibicije rasta biljaka (Hayat i sur. 2011). Prekomjerna koncentracija soli u tlu uzrokuje nakupljanje soli u korijenju biljaka (Schuch i Kelly 2008). Visok salinitet djeluje na biljke na nekoliko načina: pojava vodnog stresa, toksičnost iona, izmjena metaboličkih procesa, smanjenje stanične diobe, širenje genotoksičnosti, poremećaji u ishrani biljke (Hasegawai sur. 2000, Munns 2002, Zhu 2007). Solni stres uzrokuje inhibiciju rasta biljaka redukcijom dostupnosti vode, akumulacijom iona natrija i neravnotežom minerala, što dovodi do uništavanja biljke na staničnoj i molekularnoj razini u vidu razaranja proteina, membranskih lipida, nukleinskih kiselina i klorofila (Silva-Ortega i sur. 2008). Izlaganje biljaka solnom stresu rezultira masovnim promjenama u profilu genske ekspresije pod čijom su kontrolom višestruki stanični putevi. Geni kontrolirani stresom kontrolna su točka odgovora biljaka na stres (Bray 1997, Hasegawa i sur. 2000, Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2000). Odgovor na solni stres genski je reguliran, a očituje se u svim aspektima biljnih funkcija i metabolizma, kao što su npr. prijenos signala, metabolizam ugljikohidrata, ionska homeostaza, metabolizam dušika, fotosinteza, rast i razvoj biljke (Kalifa i sur. 2004). Solni stres uzrokuje toksičnost ionima koji se nalaze u solima, tako ioni Na^+ mogu zamjeniti iona Ca^{2+} čime dolazi do promjene permeabilnosti membrane. Na^+ i Cl^- vrše direktnu inhibiciju fotosinteze, također djeluju na sve druge metaboličke procese. Kao sekundarni odgovor na solni stres javlja se oksidacijski stres. Aktivnost antioksidacijskih enzima povećava se pod utjecajem solnog stresa te je usko povezana s tolerancijom na solni stres u mnogih biljaka (Azevedo Neto i sur. 2006, Koca i sur. 2007, Athar i sur. 2008).

1.4. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj inducibilne ekspresije gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-kriptogein, na oksidacijski i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.) izloženog solnom stresu.

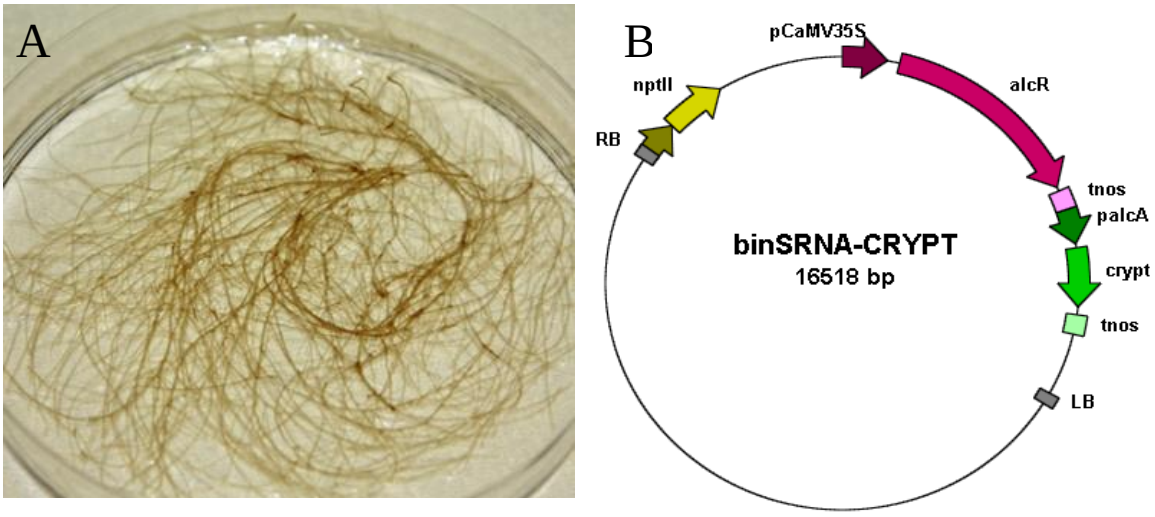
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Biljni materijal

U istraživanju je korišteno transgeno korijenje vrste *C. blumei* iz porodice Lamiaceae (Slika 2A). Transformacija ukrasne koprive i indukcija kosmatog korijenja obavljena je prema metodi koju su opisali Bauer i suradnici (2002). Genetička transformacija lisnih eksplantata ukrasne koprive izvedena je pomoću bakterije *Agrobacterium rhizogenes*, soja A4, koji sadrži binarni vektor pBinSRNA-*CRYPT*. 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 (Slika 2B).

U istraživanju su korištene dvije linije transgenog korijenja: linija O3 i linija O6. Navedene linije sadrže gen *crypt* koji se u tkivu eksprimira te secernira van stanice (Vuković i sur. 2013).



Slika 2. A) Transgeno korijenje ukrasne koprive na tekućoj MS hranjivoj podlozi. Foto: R.Vuković; B) Mapa binarnog vektora pBinSRNA-*CRYPT*. pCaMV 35S: konstitutivni promotor gena za 35S RNA virusa mozaika cvjetače; *alcR*: gen za transkripcijski faktor AlcR; tnos: nos terminator; palcA: promotor alkohol-dehidrogenaze; *crypt*: gen za *β*-kriptogein; *nptII*: gen za neomicin-fosfotransferazu II (otpornost na aminoglikozidne antibiotike); RB: desna granična sekvenca; LB: lijeva granična sekvenca.

2.1.2. Hranjiva podloga za uzgoj transgenog korijenja

Transgeno korijenje ukrasne koprive je uzgajano na tekućoj hranjivoj Murashige i Skoog podlozi (Murashige i Skoog 1962, MS; Tablica 1), bez dodatka hormona, u inkubatoru u tami.

Nakon pripreme, hranjivoj je podlozi podešen pH na 5.7, te je potom sterilizirana u autoklavu 15 min na 121 °C.

Tablica 1. Sastav MS hranjive podloge

Sastav	**Koncentracija (mg × L^{-1})**
MAKROELEMENTI	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2$× $2H_2O$	755
$MgSO_4$× $7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
MIKROELEMENTI	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4$× H_20	16.9
$ZnSO_4$×H_2O	8.6
KI	0.83
Na_2MoO_4× $2H_2O$	0.25
$CuSO_4$× $5H_2O$	0.025
$CoCl_2$× $6H_2O$	0.025
$FeSO_4$× $7H_2O$	27.8
Na_2EDTA × $2H_2O$	37.3
ORGANSKI DODACI	
m – Inozitol	100
Nikotinska kiselina	1
Tiamnin HCl	10
Piridoksin HCl	1
Glicin	2
Saharoza	20000

2.1.3. Uređaji

Za održavanje kulture kosmatog korijenja, određivanje količine H_2O_2, količine TBARS-a, aktivnosti CAT i GPOD korišteni su slijedeći uređaji:

- Magnetna mješalica
- pH metar
- Autoklav
- Laminar
- Inkubator
- Stolna centrifuga
- Vodena kupelj
- Vibracijska mješalica
- Hladnjak sa zamrzivačem
- Spektrofotometar

2.1.4 Kemikalije i otopine

Pri izradi ovoga rada upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- Aceton, 80%
- Albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA), $1 mg \times mL^{-1}$
- Bradford reagens
- H_2SO_4, 2M
- H_2O_2, 30%
- NH_4OH, 25%
- KH_2PO_4, 1 M
- K_2HPO_4, 1M
- Pufer za ekstrakciju proteina (pH 7.0): 100 mM kalij-fosfatni (KP) pufer (pH 7.0), 1 mM EDTA
- Polivinil-polipirolidon (PVPP)
- Pufer za mjerenje aktivnosti GPOD: 50 mM KP-pufer (pH 7.0), 18 mM gvajakol, 5 mM H_2O_2
- Pufer za mjerenje aktivnosti CAT: 50 mM KP-pufer (pH 7.0), 10 mM H_2O_2

- Reagens za određivanje količine malondialdehida: 0.5% tiobarbituratna kiselina (TBA) u 20% trikloroctenoj kiselini (TCA)
- Trikloroctena kiselina (TCA), 0.1%
- Titanov reagens (komercijalni reagens)

2.2. Metode

2.2.1. Održavanje kulturekosmatog korijenja

Transgeno korijenje ukrasne koprive uzgajano je u Petrijevim zdjelicama,promjera 9 cm, na 8 mL tekuće MS podloge, u tami u inkubatoru na temperaturi od 28°C. Kultura je presađivana svaka 2 tjedna na novu, svježu hranjivu podlogu. Presađivanje kulture kosmatog korijenja odvijalo se u laminaru, u sterilnim uvjetima uz upotrebu sterilnog pribora i posuđa. Tijekom uzgoja korijenja jednom dnevno je bilo potrebno promiješati sadržaj u Petrijevci kako bi se hranjiva podloga dodatno aerirala i homogenirala. Nakon što je prikupljena dovoljna količina tkiva, korijenje je stavljeno u pokus.

2.2.2.Solni stres i indukcija sinteze *β*-kriptogeina u transgenom korijenju

Nakon dva tjedna rasta, tkivo (oko 1 g) je subkultivirano na 8 mL svježe tekuće MS hranjive podloge, te je nakon 4 dana subkulture tretirano 100 i 200 mM otopinom NaCl kako bi se izazvao solni stres. Dio Petrijevki s korijenjem koje je izloženo različitim koncentracijama NaCl, dodatno je tretirano s 1%-tnim etanolom kako bi se inducirala sinteza *β*-kriptogeina. U eksperimentu su korištene dvije linije tkiva, linija O3 i linija O6. Tkivo je za analize uzorkovano 7. i 14. dan nakon tretmana otopinom NaCl i indukcije etanolom. Eksperimentalne skupine transgenog korijenja su:

- Linija O3:
    - Tretman 100 mM NaCl-om
    - Tretman100 mM NaCl-om i 1%-tnim etanolom (indukcija sinteze *β*-kriptogeina)
    - Tretman200 mM NaCl-om

        - Tretman200 mM NaCl-om i 1%-tnim etanolom (indukcija sinteze β-kriptogeina)
- Linija O6:
        - Tretman100 mM NaCl-om
        - Tretman100 mM NaCl-om i 1%-tnim etanolom (indukcija sinteze β-kriptogeina)
        - Tretman200 mM NaCl-om
        - Tretman200 mM NaCl-om i 1%-tnim etanolom (indukcija sinteze β-kriptogeina)

Nakon uzorkovanja tkivo je od ostatka medija oprano u dH_2O te je posušeno papirnatim ubrusom. Kao pokazatelji oksidacijskog stresa u transgenom su korijenju spektrofotometrijski određivani količina H_2O_2 i razina LPO. Navedeni pokazatelji oksidacijskog stresa mjereni su neposredno nakon uzorkovanja korijenčića. Antioksidacijski status određen je spektrofotometrijski, mjerenjem aktivnosti CAT i nespecifičnih GPOD u proteinskim ekstraktima. Sva spektrofotometrijska mjerenja provedena su na UV-VIS spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 2 (PerkinElmer, Waltham, SAD).

2.2.3. Određivanje količine H_2O_2

Količina H_2O_2 u transgenom korijenju određena je metodom po Mukherejee i Choudhouri (1983). Tkivo transgenog korijenja usitnjeno je u tarioniku pomoću tekućeg dušika.Oko 0.2 g usitnjenog praha alikvotira se u tubicu čemu se doda 1 mL hladnog acetona. Tubicu s homogenatom potrebno je promiješati na vibracijskoj miješalici, nakon čega je slijedilo centrifugiranje 5 min pri 6000 g na temperaturi od +4 °C. Dobiveni supernatant odvojen je u drugu tubicu te mu je dodano 400 µL titan-sulfata i 500 µL NH_4OH (konc.). Dodatkom NH_4OH i titan-sulfata dolazi do egzotermne reakcije te nastaje kompleks titan-peroksida. Titan-peroksid odvojen je centrifugiranjem tijekom 10 min na 15000 g pri temperaturi od +4 °C. Dobiveni talog je potom otopljen dodatkom 1 mL 2M H_2SO_4, te je ponovljeno centrifugiranje pri istim uvjetima kako bi se odvojile istaložene čestice. Apsorbancija supernatanta mjerena je pri valnoj duljini od 415nm. Količina ukupnog H_2O_2 izražena je u $\mu mol \times g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$.

2.2.4. Određivanje količine reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline

Razina LPO određena je metodom po Verma i Dubey (2003), mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), uglavnom malondialdehida (MDA). Tkivo transgenog korijenja usitnjeno je u tarioniku pomoću tekućeg dušika. Oko 0.2 g usitnjenog praha se alikvotira u tubicu čemu se doda 1 mL 0.1% TCA. Tkivo tretirano s TCA centrifugirano je pri 6000 g 5 min na 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojeno je 0.5 mL supernatanta te pomiješano sa 1 mL reagensa za određivanje TBARS-a, TCA/TBA. Kao slijepa proba korištena je smjesa od 0.5mL 0.1% TCA i 1 mL reagensa TCA/TBA. Reakcijska smjesa inkubirana je 30 min u vodenoj kupelji na temperaturi 95 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena hlađenjem u ledenoj kupelji 10min. Smjesa je zatim centrifugirana pri 18000 g 15 min na 4°C. Odvojenom supernatantu mjerena je apsorbancija na 532 nm i na 600nm. Apsorbancija pri 600 nm oduzima se od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a izračunata je na temelju ekstinkcijskog koeficienta ($\varepsilon = 155\ mM^{-1} \times cm^{-1}$) i izražena u nmol po gramu svježe tvari ($nmol \times g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.2.5. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Uzorkovano transgeno korijenje oprano je u destiliranjoj vodi, posušeno ubrusom te usitnjeno u tarioniku uz pomoć tekućeg dušika uz dodataka PVPP-a koji služi za uklanjanje fenolnih spojeva iz biljnog ekstrakta. Usitnjeno tkivo odvagano je (0.3 g) u tubice, te su proteini ekstrahirani 15 min na ledu u 1 mL hladnog pufera za ekstrakciju. Homogenat je potom centrifurgiran na 22000 g 15 min pri +4 °C. Dobiveni supernatant je prebačen u čiste tubice te je pohranjen na -80 °C do mjerenja aktivnosti enzima i određivanje koncentracije proteina.

2.2.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu (1967). Razrijeđeni proteinski ekstrakt pomiješan je s 1 mL Bradfordova reagensa, nakon čega je inkubiran 5 min

na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije mjerena je apsorbancija na 595 nm. Kao standard upotrjebljen je albumin goveđeg seruma (engl. *Bovin Serum Albumin*, BSA). Na temelju vrijednosti apsorbancije poznatih koncentracija BSA dobiva se standardna krivulja iz koje se ekstrapolira koncentracija proteina u uzorku.

2.2.7. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT mjerena je metodom po Aebiju (1984). Reakcijski pufer za mjerenje sastojao se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera i 10 mM H_2O_2. Reakcija je započeta dodavanjem 50 µL uzorka u 950 µL reakcijske smjese. Pad apsorbancije do kojeg dolazi uslijed razgradnje H_2O_2, mjeren je svakih 10 sek tijekom 2 min pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost CAT izražena je kao količina (µmol) razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina koristeći ekstincijski koeficijent (ε = 43.6 $M^{-1}\times cm^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ($U\times mg^{-1}_{proteina}$; U = $\mu mol\times min^{-1}_{proteina}$).

2.2.8. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaza

Aktivnost GPOD mjerena je metodom po Siegel i Galstonu (1967). Reakcijski pufer za mjernje aktivnosti GPOD sadržavao je 18mM gvajakola i 5 mM H_2O_2 u KP-puferu. Za mjerenje aktivnosti u 990 µL pufera dodano je 10µL uzorka te je apsorbancija mjerena svakih 10 sekudni tijekom 2 min na valnoj duljini od 470 nm. Porast apsorbancije događa se zbog oksidacije gvajakola pri čemu nastaje tetragvajakol. Aktivnost GPOD izražena je kao količina nastalog tetragvajakola u µmol po minuti po miligramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficient (ε = 26.6 $mM^{-1}\times cm^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GPOD po miligramu proteina ($U\ GPOD\times mg^{-1}_{proteina}$; U = $\mu mol\times min^{-1}$).

2.3. Statistička obrada podataka

Svi su eksperimenti ponovljeni tri puta i svi uzorci uzimani u triplikatu. Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti pojedinih tretmana (više skupina podataka) utvrđene pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (*one-way* ANOVA). Nakon što je

utvrđeno postojanje razlika, provedeno je *post hoc* testiranje pomoću testa Newman-Keuls kako bi odredili koje se skupine međusobno razlikuju. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

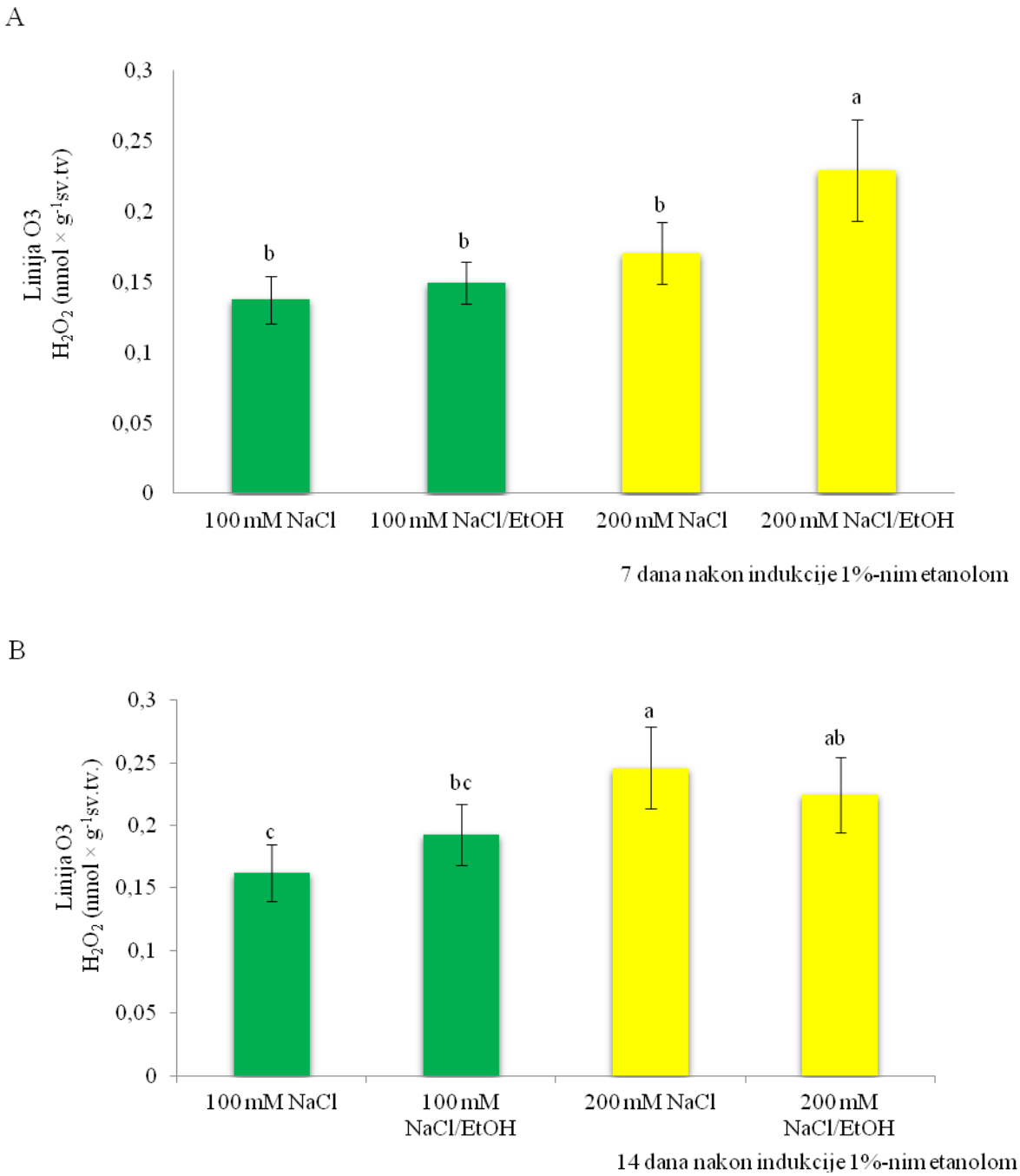
3. REZULTATI

3.1. Količina vodikovog peroksida u transgenom korijenju ukrasne koprive

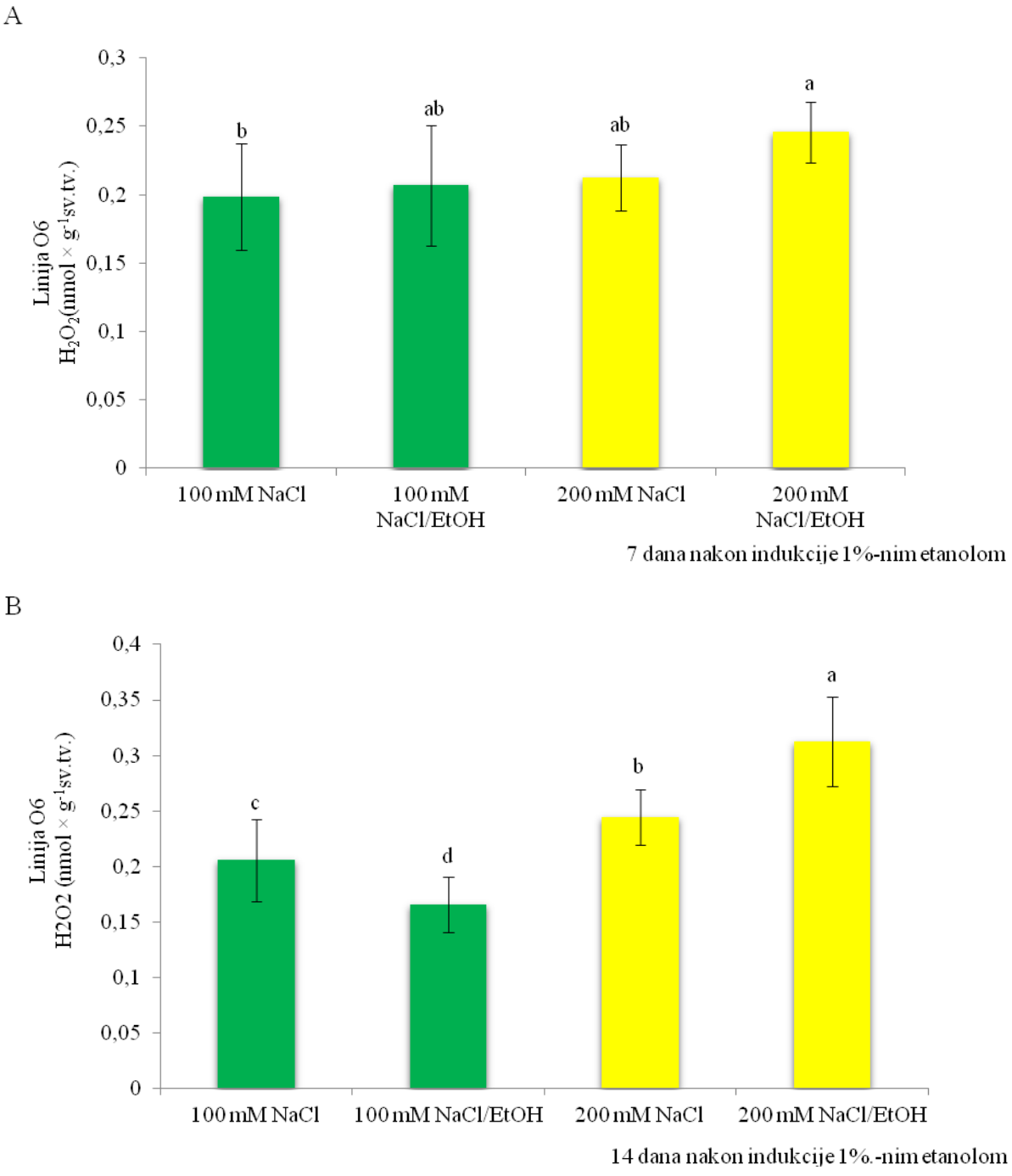
Jedan od pokazatelja oksidacijskog stresa je količina H_2O_2. Učinak endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina na količinu H_2O_2 nakon izazvanog solnog stresa određen je u tkivu transgenog korijenja 7. i 14. dan nakon induciranja ekspresije gena *crypt* 1%-tnim etanolom.

Kod linije O3,tjedan dana nakon tretmana tkiva 100 mM NaCl-om, u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* nije došlo do promjene količine H_2O_2 u odnosu na kontrolno tkivo bez indukcije etanolom, dok je količina H_2O_2 značajno porasla u tkivu tretiranom 200 mM NaCl-om u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo (Slika 3A). Dva tjedna nakon indukcije gena *crypt* etanolom, i dalje nije bilo značajne razlike kod tretmana 100 mM NaCl-om između tkiva u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina i kontrolnog tkiva u kome sinteza nije inducirana. Jednako tako kod tretmana 200 mM NaCl-om nije bilo značajne razlike u količini H_2O_2 između tkiva induciranog etanolom i kontrolnog tkiva bez indukcije ekspresije gena *crypt*, iako se uočava trend smanjenja H_2O_2 kod tkiva s induciranom sintezom *β*-kriptogeina (Slika 3B).

Kod linije O6, tjedan dana nakon indukcije tkiva etanolom nije uočena značajna promjena u količini H_2O_2 kod oba tretmana NaCl-om (100 i 200 mM) između tkiva u kome je potaknuta sinteza *β*-kriptogeina i odgovarajućeg kontrolnog tkiva bez inducirane sinteze *β*-kriptogeina. Dva tjedna nakon tretmana 100 mM NaCl-om, količina H_2O_2 značajno je opala (19.32%) u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* u odnosu na kontrolno tkivo bez inducirane ekspresije.Kod tkiva tretiranog 200 mM NaCl-om, ekspresija gena *crypt* uzrokovala je značajno povećanje količine H_2O_2 za 28.17%. u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 4.)



Slika 3. Količina H_2O_2 u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls*post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).



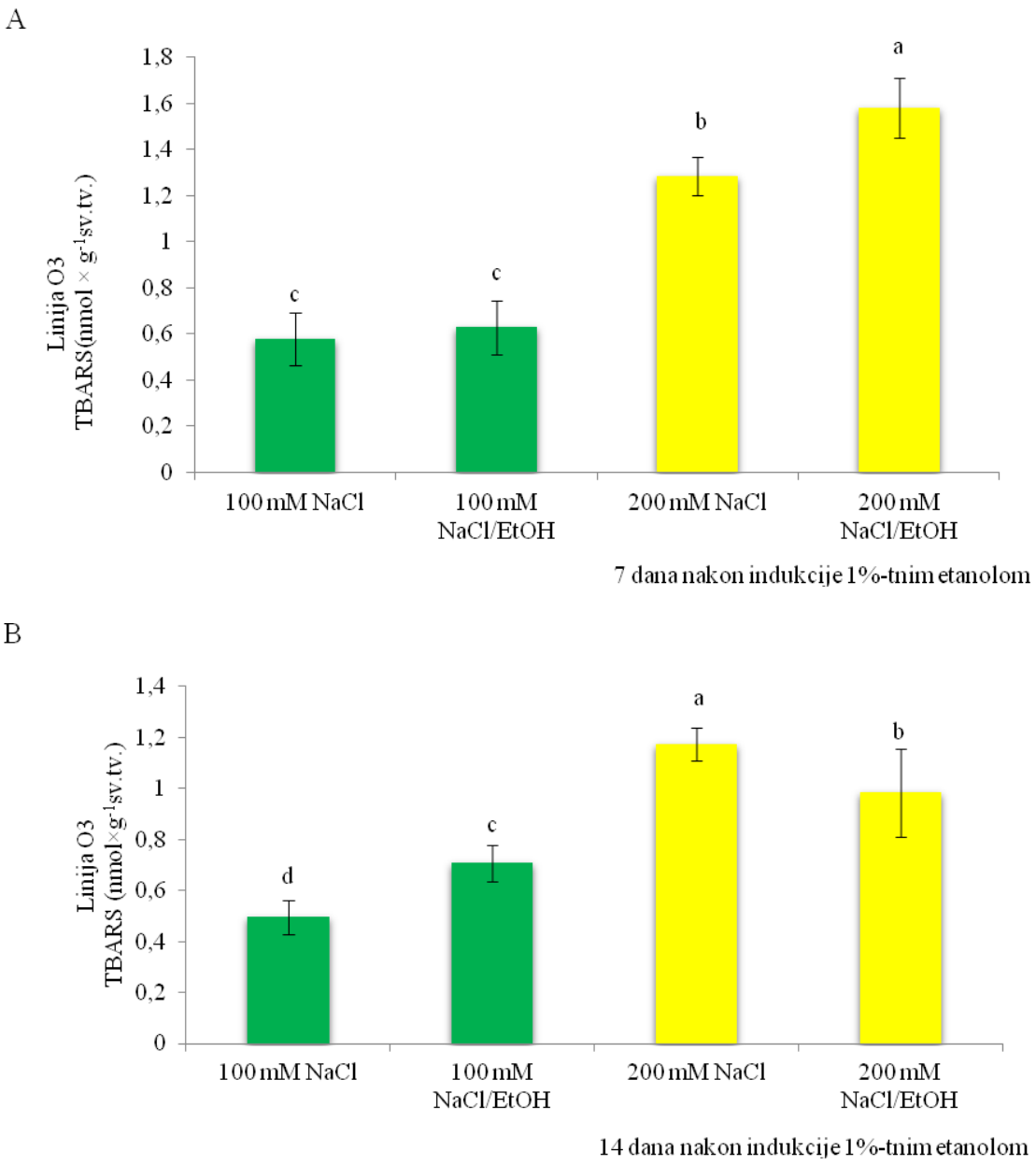
Slika 4. Količina H_2O_2 u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls*post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.2. Razina lipidne peroksidacije u transgenom korijenju ukrasne koprive

Još jedan od pokazatelja oksidacijskog stresa je razina LPO. Učinak endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina na količinu TBARS-a nakon izazvanog solnog stresa određen je u tkivu transgenog korijenja 7. i 14. dan nakon induciranja ekspresije gena *crypt* 1%-tnim etanolom.

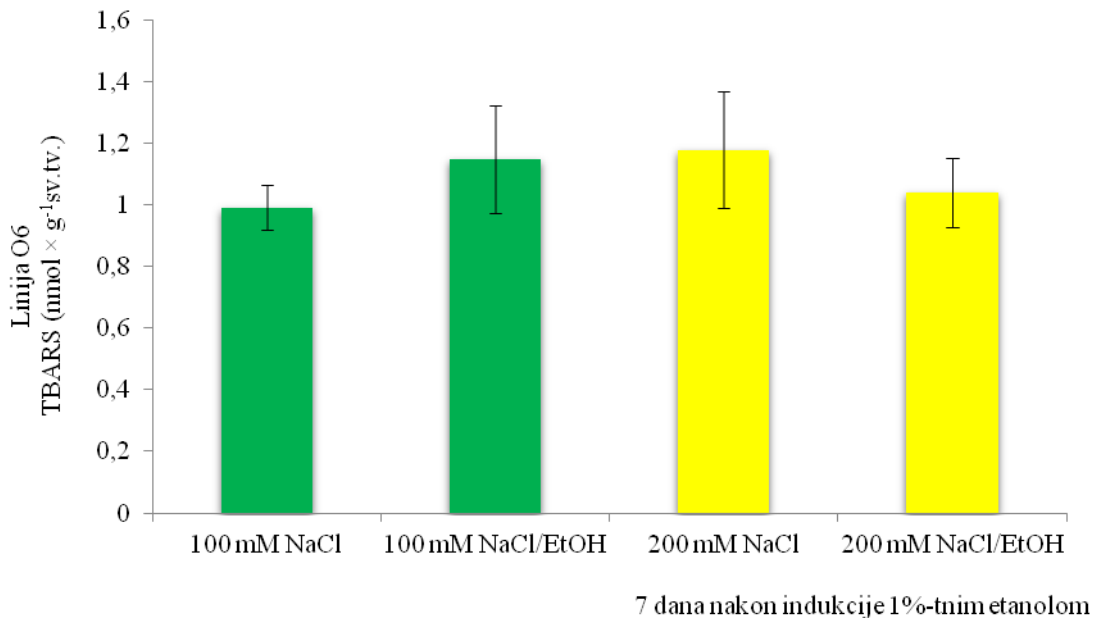
Kod linije O3, tjedan dana nakon tretmana tkiva 100 mM NaCl-om, u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* nije došlo do promjene količine TBARS-a u odnosu na kontrolno tkivo bez indukcije etanolom, dok je količina TBARS-a značajno porasla u tkivu tretiranom 200 mM NaCl-om u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo za 22.94% (Slika 5A). Dva tjedna nakon indukcije gena *crypt* etanolom, količina TBARS-a značajno je porasla (42.7%) u tkivu tretiranom 100 mM NaCl-om u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina u odnosu na kontrolno tkivo u kome sinteza nije inducirana. Kod tretmana 200 mM NaCl-om dolazi do značajnog smanjenja količine TBARS-a za 16.15% u tkivu induciranom etanolom u odnosu na kontrolno tkivo bez indukcije ekspresije gena *crypt* (Slika 5B).

Kod linije O6, tjedan dana nakon indukcije tkiva etanolom nije uočena značajna promjena u količini TBARS-a kod oba tretmana NaCl-om (100 i 200 mM) između tkiva u kome je potaknuta sinteza *β*-kriptogeina i odgovarajućeg kontrolnog tkiva bez inducirane ekspresije gena *crypt*. Dva tjedna nakon tretmana 100 mM NaCl-om, količina TBARS-a značajno je porasla (50.5%) u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* u odnosu na kontrolno tkivo bez inducirane ekspresije gena. Kod tkiva tretiranog 200 mM NaCl-om, nisu zamjećene statistički značajne promjene između tkiva u kome je potaknuta sinteza *β*-kriptogeina i odgovarajućeg kontrolnog tkiva bez inducirane sinteze *β*-kriptogeina (Slika 6A,B).

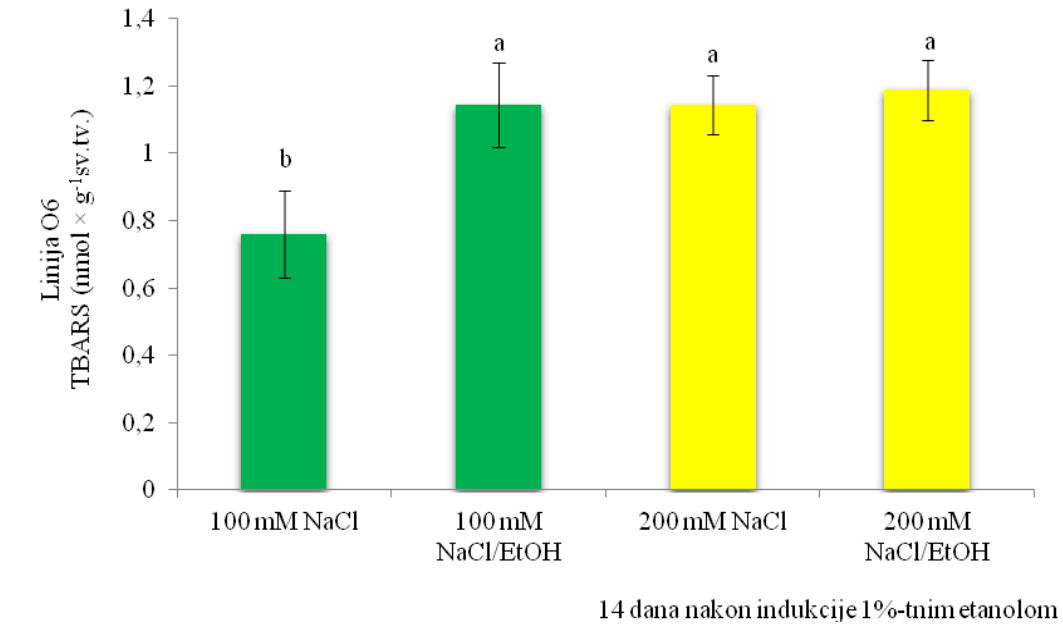


Slika 5. Količina TBARS-a u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

A



B



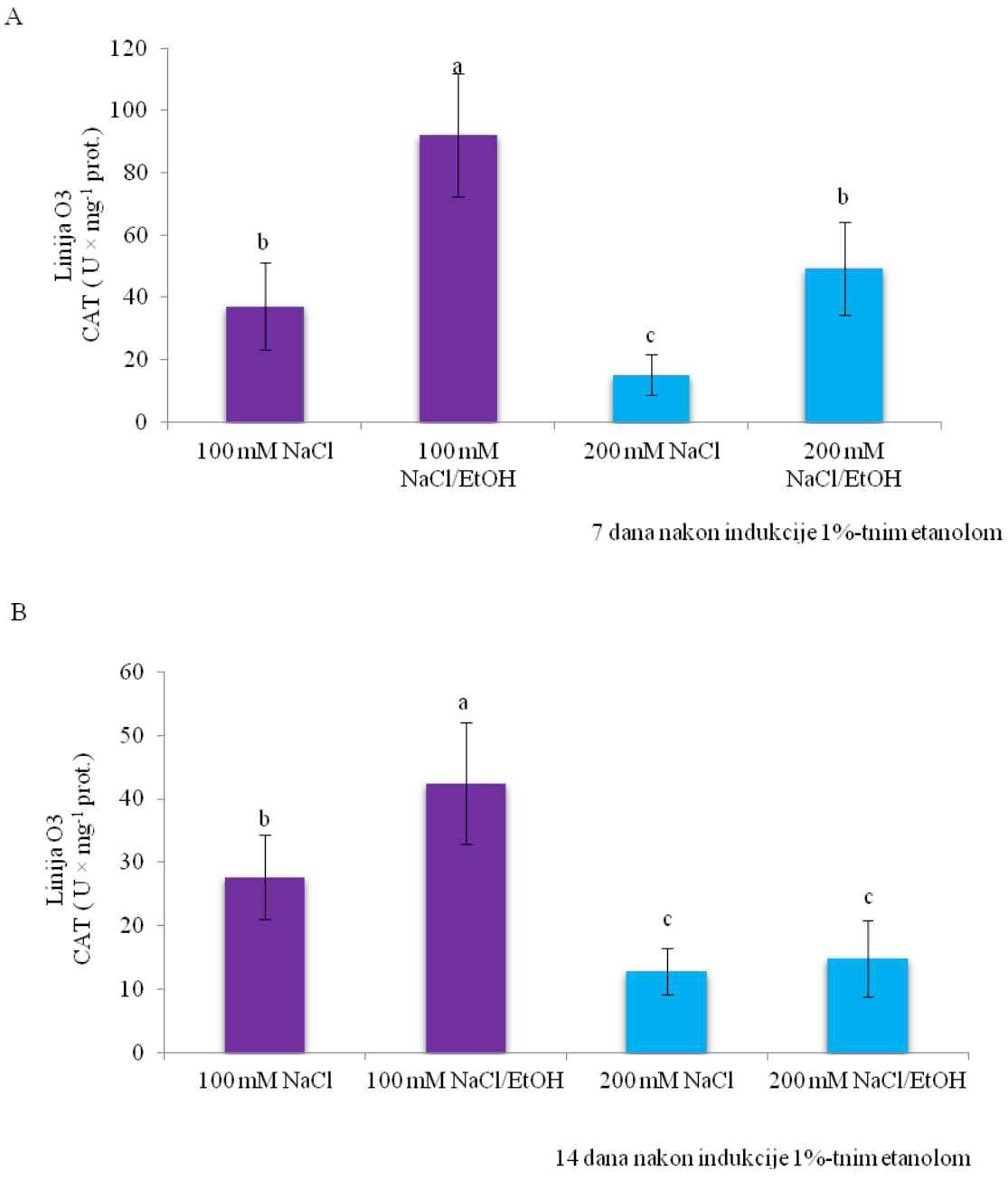
Slika 6. Količina TBARS-a u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.3. Aktivnost katalaze u transgenom korijenju ukrasne koprive

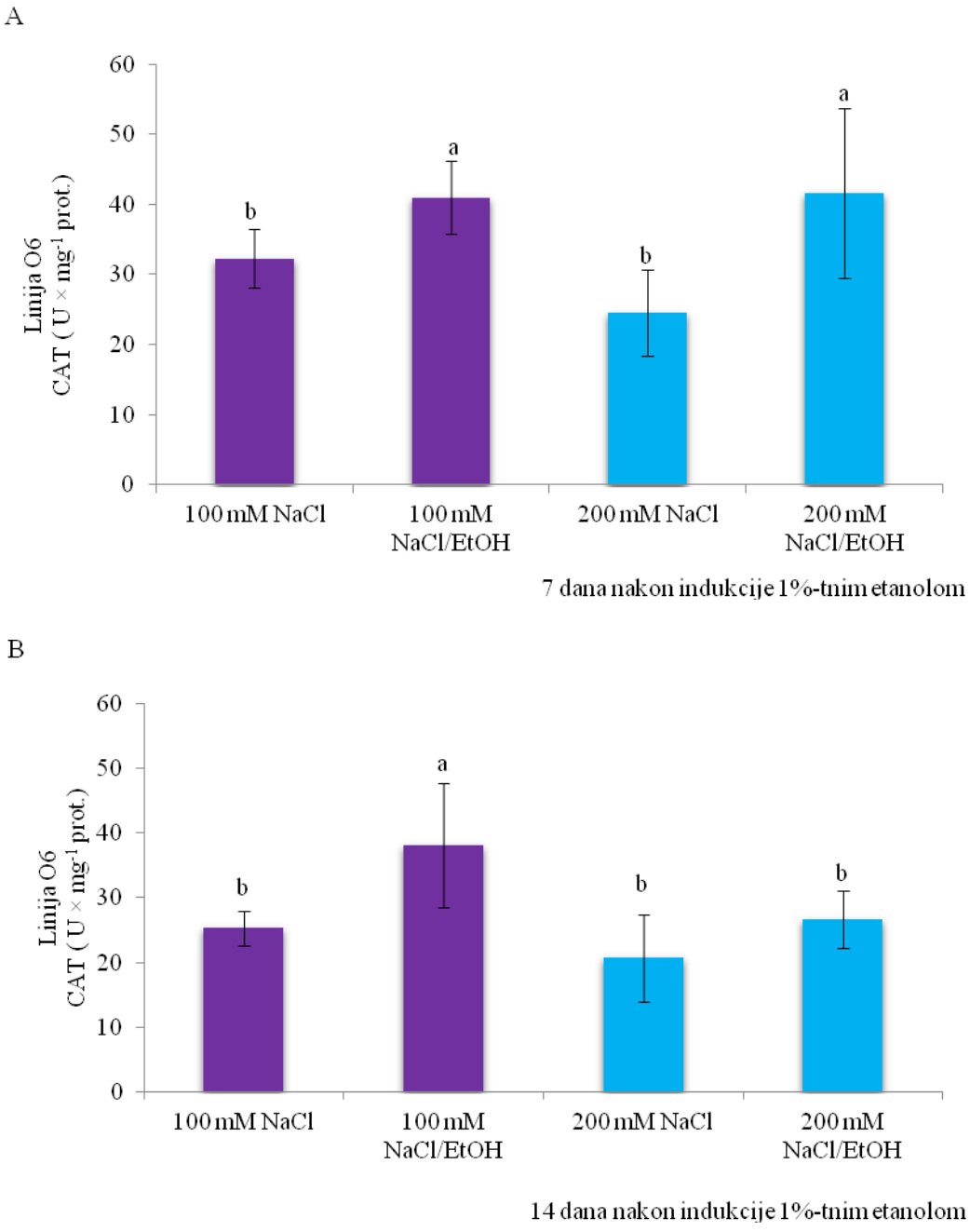
Antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive određen je mjerenjem aktivnosti CAT, 7. i 14. dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1%-tnim etanolom.

Kod linije O3, tjedan dana nakon tretmana tkiva 100 mM NaCl-om, uočen je značajan porast aktivnosti CAT u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* za 147.5% u odnosu na kontrolno tkivo bez indukcije ekspresije gena *crypt*. Tkivo tretirano 200 mM NaCl-om također pokazuje značajan porast aktivnosti CAT u tkivu u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina za 224.2% u odnosu na kontrolno tkivo bez indukcije sinteze *β*-kriptogeina (Slika 7A). Dva tjedna nakon tretmana 100mM NaCl-om uočen je statistički značajan porast aktivnosti CAT (53.35%) u tkivu u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina etanolom, u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo bez inducirane sinteze *β*-kriptogeina. Dva tjedna nakon tretmana 200 mM NaCl-om nisu uočene statistički značajne razlike između tkiva u kojem je inducirana ekspresija gena *crypt* i kontrolnog tkiva u kome nije inducirana sinteza gena *crypt*, iako je vidljiv trend porasta aktivnosti CAT (Slika 7B).

Kod linije O6 tjedan dana nakon tretmana 100 mM NaCl-om uočen je statistički značajan porast aktivnosti CAT u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* za 27.03% u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo u kome nije inducirana ekspresija gena *crypt*. Tretman 200mM NaCl-om u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* bilježi porast aktivnosti CAT za 69.9% u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo u kome nije inducirana ekspresija gena *crypt* (Slika 8A). Dva tjedna nakon tretmana 100mM NaCl-om uočen je statistički značajan porast aktivnosti CAT (50.8%) u tkivu u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina u odnosu na kontrolno tkivo u kojem nije inducirana sinteza *β*-kriptogeina, dok kod tretmana 200 mM NaCl-om nema statistički značajne razlike između tkiva u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina i kontrolnog tkiva bez indukcije *β*-kriptogeina, iako je vidljiv trend porasta aktivnosti CAT (Slika 8B).



Slika 7. Aktivnost CAT u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

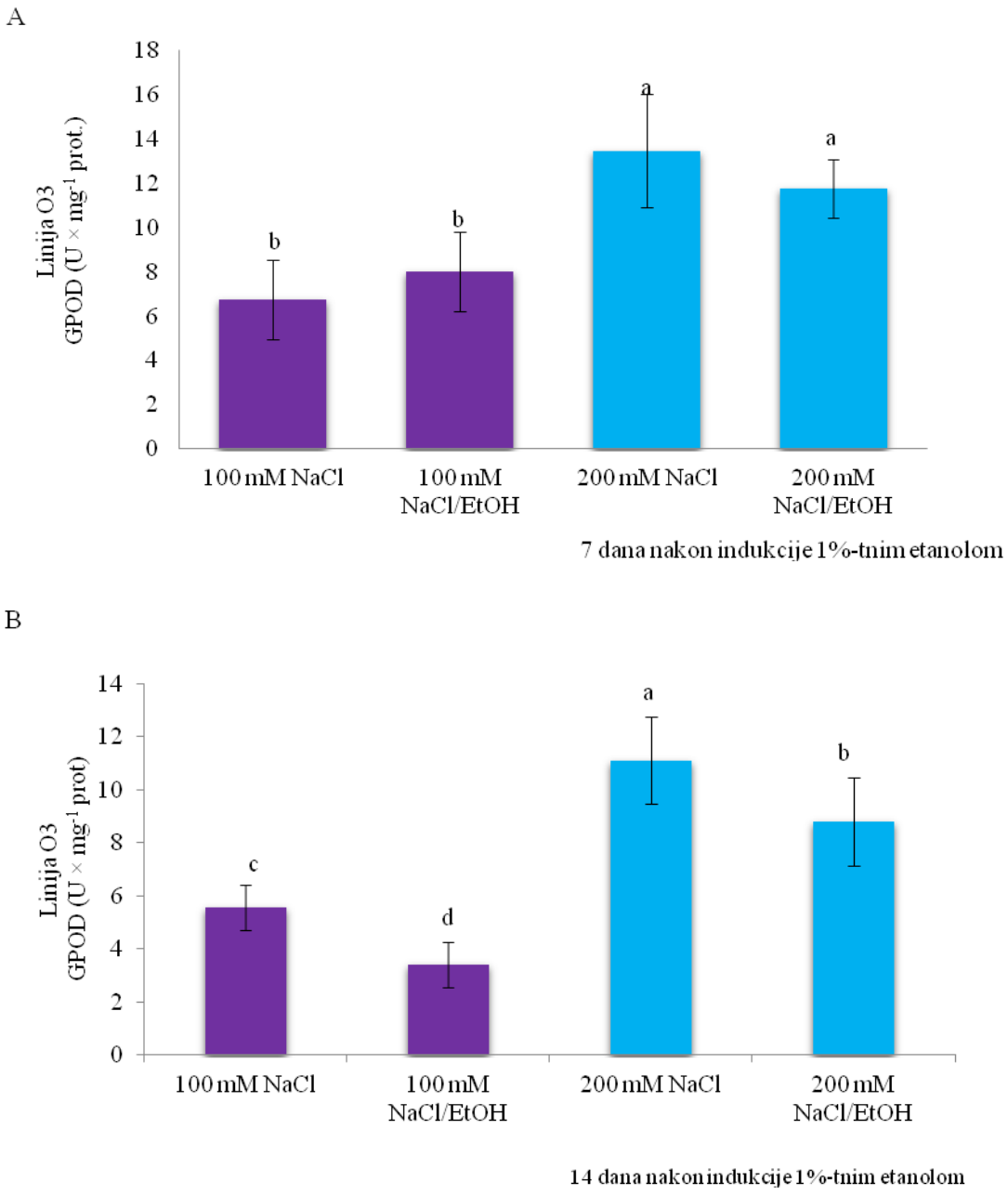


Slika 8. Aktivnost CAT u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

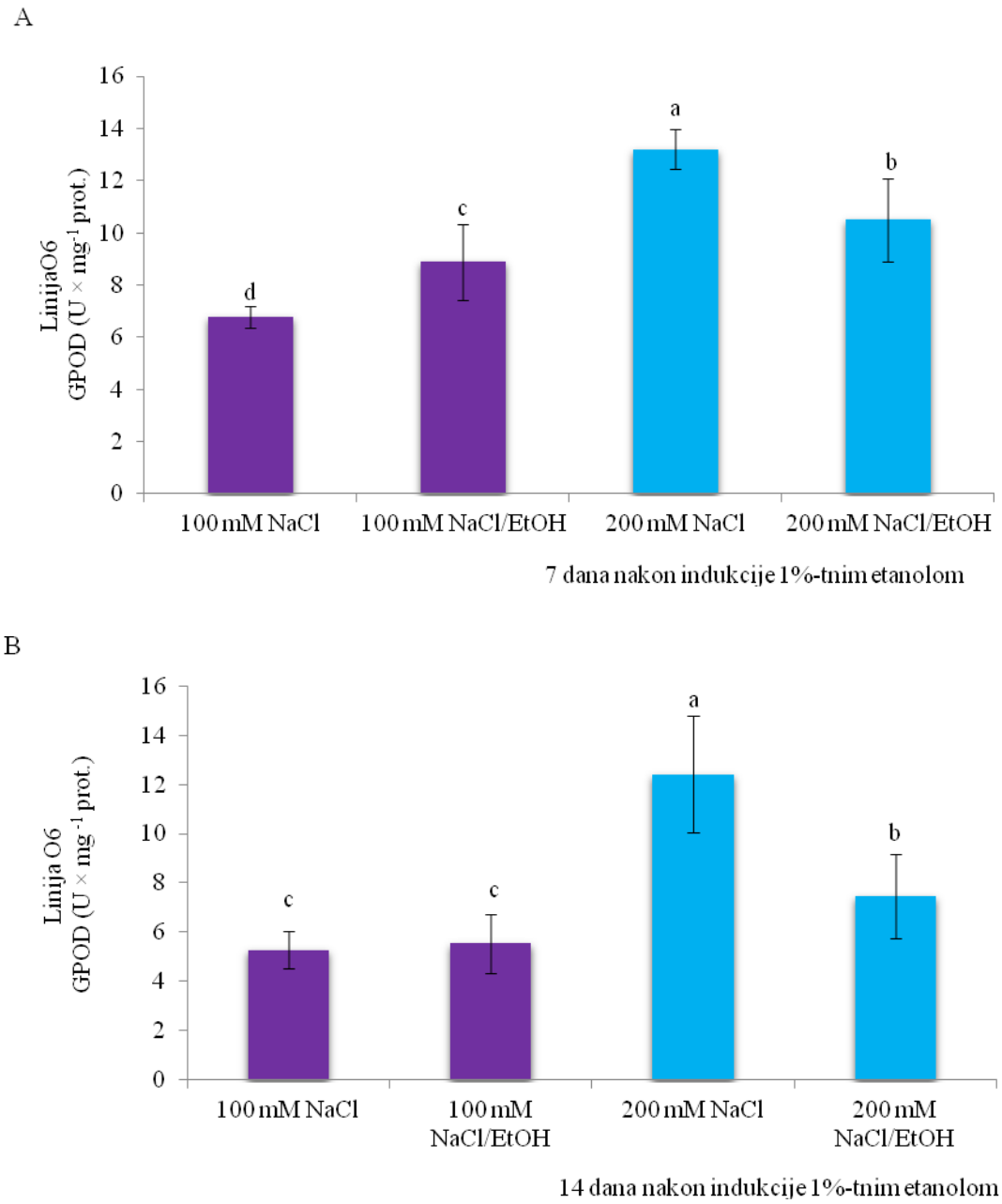
3.4. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u transgenom korijenju ukrasne koprive

Kod linije O3, tjedan dana nakon tretmana 100 mM NaCl-om i 200 mM NaCl-om nisu uočene statistički značajne razlike između tkiva u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina i odgovarajućeg kontrolnog tkiva bez sinteze *β*-kriptogeina (Slika 9A). Dva tjedna nakon tretmana 100 mM NaCl-om uočen je značajan pad aktivnosti GPOD-a (38.61%) u tkivu u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina u odnosu na kontrolno tkivo bez indukcije sinteze *β*-kriptogeina. Također kod tretmana 200 mM NaCl-om aktivnost GPOD-a značajno opada (20.8%) u tkivu u kome dolazi do indukcije sinteze *β*-kriptogeina u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo bez indukcije sinteze *β*-kriptogeina (Slika 9B).

Kod linije O6, tjedan dana nakon tretmana 100 mM NaCl-om dolazi do značajnog porasta aktivnosti GPOD-a (31.35%) u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo bez indukcije. Međutim kod tretmana 200 mM NaCl-om dolazi do značajnog opadanja aktivnosti GPOD-a za 20.57% u tkivu u kome je inducirana ekspresija gena *crypt* u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo bez indukcije (Slika 10A). Dva tjedna nakon tretmana 100 mM NaCl-om nisu vidljive statistički značajne razlike između tkiva u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina i odgovarajućeg kontrolnog tkiva bez sinteze *β*-kriptogeina. Dok je kod tretmana 200 mM NaCl-om uočen značajan pad aktivnosti GPOD-a (39.73%) u tkivu u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina u odnosu na odgovarajuće kontrolno tkivo bez sinteze *β*-kriptogeina (Slika 10B).



Slika 9. Aktivnost GPOD u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).



Slika 10. Aktivnost GPOD u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6) tretiranog 100 i 200 mM otopinom NaCl: A) 7 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH) i B) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom (100 mM NaCl/EtOH, 200 mM NaCl/EtOH). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Opći simptomi oštećenja prouzrokovani solnim stresom su inhibicija rasta, ubrzani razvoj i starenje, te smrt stanica nakon dužeg izlaganja. Povećane koncentracije natrijevih iona mogu poremetiti ishranu biljke, tj. uzimanje kalija. Nedostatak kalija dovodi do inhibicije rasta, remećenja turgora, membranskog potencijala te aktivnosti enzima (Zhu 2007). Tretman listova ukrasne koprive NaCl-om uzrokuje smanjenje rasta, sadržaja proteina, zatvaranje puči, što također dovodi do inhibicije fotosinteze (Gilbert i sur. 1997). Solni stres može potaknuti oksidacijski stres stvaranjem ROS-a na više načina u različitim biljnim tkivima tj. organelima npr. povećanjem propusnosti elektrona koji se pretvaraju u ROS. Također, osim curenja elektrona potiče se fotorepiracija što dovodi do nakupljanja H_2O_2 u peroksisomima (Abogadallah 2010). Kako bi preživjele, biljke imaju razne mehanizme obrane od oksidacijskog stresa, kao što je povećanje enzimske aktivnosti ili akumulacija sekundarnih metabolita (Nikravesh i sur. 2012). S obzirom da solni stres utječe negativno na većinu biljnih vrsta te da je jedan od opasnijih abiotičkih čimbenika stresa koji uzrokuje pojavu oksidacijskog stresa, u ovom radu su praćeni pokazatelji stresa, kao što su količina H_2O_2 i razina LPO kako bi se odredio utjecaj endogeno eksprimiranog oomicetalnog elicitora na pokazatelje oksidacijskog stresa koji se javlja kao posljedica solnog stresa.

Elicitori se zbog svojih svojstava aktivacije mehanizama obrane biljke protiv patogena koriste i općenito u povećanju otpornosti biljke na druge čimbenike koji uzrokuju stres (Bowell 2001). Tako oomicetalni elicitor *β*-kriptogein može izazvati hipersenzitivni odgovor u duhanu i drugim biljnim vrstama (Keller i sur. 1999). Poznat je kao elicitin koji izaziva kaskadu reakcija potrebnih za odgovor na napade patogena. *β*-Kriptogeinom inducirana signalna transdukcija ima zajedničke elemente sa stresom koji izaziva suša ili salinitet, kao npr. prijenos Ca, NO, stvaranje ROS-a, te aktivacija protein-kinaza (Lecourieux i sur. 2002, Lamolette i sur. 2004, Hirasawa i sur. 2005, Lebrun-Garcia i sur. 2002). *β*-Kriptogein inducira faktor transkripcije koji korelira s aktivacijom više različitih gena koji sudjeluju u odgovoru na stres (Guo i sur. 2004). Prijašnja istraživanja su pokazala kako *β*-kriptogein u transgenom duhanu povećava otpornost duhana na solni stres (Jiang i sur. 2004).

Na temelju navedenih činjenica cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj endogeno eksprimiranog *β*-kriptogeina u ublažavanju učinaka solnog stresa u transgenom korijenju ukrasne koprive. U ovom eksperimentu korišteno je transgeno korijenje ukrasne koprive *C. blumei* Benth. u kojem se nalazi gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog alkoholnog

promotora, čija se ekspresija inducira tretmanom s etanolom. Prednost upotrebe inducibilnih alkoholnih promotora je kontrola ekspresije gena, budući da prekomjerna ekspresija *β*-kriptogeina može dovesti do izazivanja hipersenzitivnog odgovora. U eksperimentu su korištene 2 linije transgenog korijenja, linija O3 i O6, od kojih svaka predstavlja jedan transformacijski događaj, te se očekivao različit odgovor ovih linija na isti tretman. Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da ekspresija gena *crypt* inducirana alkoholom u transgenom korijenju ukrasne koprive ima utjecaj na pokazatelje oksidacijskog stresa (H_2O_2 i TBARS). Koncentracija H_2O_2 i razina LPO u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive s eksprimiranim *crypt* genom nije značajno povišena s obzirom na tkivo bez eksprimiranog gena *crypt,* te je to objašnjeno tako da biljka nije izložena oksidacijskom stresu uslijed ekspresije gena *crypt* (Vuković 2013). Razlog smanjenim ili nepromjenjenim razinama H_2O_2 i MDA je povećana aktivnost antioksidacijskih enzima koja je inducirana *β*-kriptogeinom (Vuković 2013). H_2O_2 spada u skupinu ROS, čije povećane količine uzrokuju oksidacijski stres, a povezan je i s obranom biljke od patogena ili drugih stresora (Dorey i sur. 1999). Proizvodnju ROS-a inducira tretman elicitorima, točnije dolazi do naglog stvaranja H_2O_2 i superoksidnog aniona (Radman i sur. 2003). Često proizvodnja ROS-a može biti glavni okidač za aktivaciju obrambenog odgovora u biljke, te samim time ROS mogu sudjelovati u programiranoj staničnoj smrti (PCD) putem hipersenzitivnog odgovora biljnih stanica (Mitller i sur. 2004). Dok prekomjerna akumulacija ROS dovodi do oštećenja tkiva i same biljke (Allen 1995). Brojna istraživanja pokazuju kako je jedan od najranijih odgovora biljnih stanica na djelovanje *β*-kriptogeina proizvodnja ROS-a, pri čemu je H_2O_2 vrlo važan pokazatelj oksidacijskog stresa. Učinak endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina na količinu H_2O_2 nakon izazvanog solnog stresa određen je u tkivu transgenog korijenja tjedan dana i dva tjedna nakon induciranja ekspresije gena *crypt.* Općenito pod utjecajem solnog stresa dolazi do povećanja H_2O_2 u korijenju riže (Lin i Kao 2001). Nakon izazivanja oksidacijskog stresa izlaganjem korijenja solnom stresu očekivan je porast H_2O_2, no dodatkom *β*-kriptogeina očekuje se pad razine H_2O_2 ili nepromijenjena razina.Važno je istakunti da u tretmanima 200 mM NaCl-om nakon tjedan dana u tkivu u kome je inducirana sinteza *β*-kriptogeina dolazi do porasta H_2O_2, dok se na tretmanima nakon 2 tjedna ne zamjećuje statistični značajna razlika, ali vidljiv je trend opadanja razine H_2O_2 (Slika 3, 4). Ovakvi rezultati su prema drugim istraživanjima (Kumar i sur. 2016, Vuković 2013) očekivani, te se mogu objasniti kao utjecaj *β*- kriptogeina na produkciju ROS-a (porast nakon tjedan dana), iako je važnija činjenica da tretman *β*-kriptogeinom u konačnici dovodi do smanjenja razine H_2O_2. S obzirom da se trend smanjenja razine H_2O_2 pojavljuje nakon dva tjedna, to je

vrijeme potrebno za indukciju sinteze *β*-kriptogeina kod linije O3, dok je kod linije O6 zabilježen značajan pad od 19.32% u tretmanu 100 mM NaCl-om u tkivu u kom je inducirana sinteza *β*-kriptogeina, te porast razine H_2O_2 u tretmanu 200 mM NaCl-om, nakon dva tjedna. Različiti rezultati između dvije linije su očekivani. Povećanje razine H_2O_2 objašnjava se utjecajem *β*-kriptogeina na stvaranje ROS-a.

Solni stres uzrokuje oštećenja membrana i rezultira povećanjem razine LPO (Hernandez i Almansa 2002). Najčešći pokazatelj učinka oksidacijskog stresa na lipide je mjerenje akumulacije TBARS-a. LPO kao indikator oksidacijskog stresa takođermože nastati nakon tretmana elicitorima (Peever i Higgins 1989). Tako, na primjer kod duhana dolazi do pojave LPO nakon tretmana *β*-kriptogeinom (Stallaert i sur. 1995). LPO kod lista duhana povezana je s hipersenzitivnim odgovorom induciranim *β*-kriptogeinom (Rustèrucci i sur. 1999). U ovom istraživanju nepromijenjene razine TBARS-a ili smanjenje koje je uočeno u tretmanu 200 mM NaCl-om je u korelaciji s količinom H_2O_2 u istim tretmanima. Također pojavljuje se značajno povećanje TBARS-a kod linije O6 pri tretmanu sa 100 mM NaCl-om. Prema literaturnim navodima indukcija *β*-kriptogeinom dovodi do stvaranja ROS-a koji samim time utječu na razinu LPO. Međutim razlike između kontrolnih skupina, tj tretmana bez indukcije sinteze *β*-kriptogeina i tretmana u kojima je postojala indukcija *β*- kriptogeina ukazuju na to da ne dolazi do pojave oksidacijkog stresa indukcijom *β*-kriptogeina, što se može usporediti s podacima iz prijašnjih istraživanja (Vuković 2013). Porast količine TBARS-a možemo objasniti možda duljim vremenom potrebnim za indukciju sinteze *β*-kriptogeina, zbog manjih koncentracija koje uzrokuju stresne uvjete.

Glavnu ulogu u zaštiti od oksidacijskog stresa imaju antioksidacijski enzimi. U ovom radu mjerene su aktivnosti dva enzima, CAT i GPOD, kao pokazatelja antioksidacijskog statusa, uslijed utjecaja *β*-kriptogeina na transgeno korijenje izloženo solnom stresu. Prema dosadašnjih istraživanjima utvrđeno je da *crypt* gen povećava aktivnosti antioksidacijskih enzima, što regulira količinu H_2O_2 u tkivima i sprječava LPO tkiva. Povećanje specifične aktivnosti CAT zabilježeno je u transgenom korijenju nakon indukcije ekspresije *β*-kriptogeina kod obje linije transgenog korijenja (O3 i O6) (Vuković 2013). Također, Kumar i suradnici (2016) su u svom istraživanju dokazali pozitivan utjecaj *β*-kriptogeina na antioksidacijski status biljke duhana čime sepospješuje obrana od oksidacijskog stresa. Nakon inokulacije biljke duhana pepelnicom dolazi do povećanja aktivnosti CAT (Lebeda i sur. 1999). U ovom radu, utvrđeno je znatno povećanje aktivnosti CAT u obje linije transgenog korijenja nakon indukcije sinteza *β*-kriptogeina 1%-tnim etanolom. Aktivnost CAT je u pozitivnoj korelaciji s opadanjem razine H_2O_2.

Aktivnost GPOD-a u nekim tretmanima ostaje nepromijenjena, iako u tkivu tretiranom 100 mM NaCl-om, linije O3, nakon tjedan dana, tkivu tretiranom 100 mM i 200 mM NaCl-om, linije O3 nakon dva tjedna, te tkivu treiranom 200 mM NaCl-om linije O6 nakon tjedan i nakon dva tjedna dolazi do pada aktivnosti GPOD-a nakon indukcije sinteze *β*-kriptogeina. Premda je u svim dosadašnjim istraživanjima dokazano da aktivnost GPOD raste pod utjecajem *crypt* gena, tj. da je inducirana dodatkom *β*-kriptogeina te je povezana s putevima biljne obrane (Gómez-Vásquez 2004, Vuković 2013, Kumar i sur. 2016). Prema nekim istraživanjima utvrđeno je da CAT ima veću aktivnost pri većim razinama H_2O_2, dok peroksidaze uklanjaju manje koncentracije H_2O_2 (Gadjev i sur. 2008). CAT je pokazana kao glavni antioksidacijski enzim u vrsti *Jatropha curcas* L. u borbi protiv solnog stresa (Gao i sur. 2008). Slično tome Chaparzadeh i suradnici (2004) utvrdili su povećanje aktivnosti CAT u tkivu vrste *Calendula officinalis* tretiranom različitim koncentracijama NaCl-a, dok se aktivnost drugih antioksidacijskih enzima ne povećava pod utjecajem solnog stresa.

Kako bi prevladale posljedice oksidacijskog stresa induciranog salinitetom biljke koriste sustave antioksidansa. Relativno visoke aktivnosti antioksidacijskih enzima zabilježene su u genotipu vrsta tolerantnih na solni stres, u usporedbi s osjetljivim vrstama, što dovodi do pretpostavke da antioksidacijski sustav ima važnu ulogu u toleranciji solnog stresa u biljke (Azooz 2009). Kako bi se povećala tolerancija na oksidacijski stres, velik broj istraživanja je usmjeren prema konstruiranju transgenih biljaka koje eksprimiraju različite antioksidacijske enzime. U transgenim biljkama duhana pokazano je da se transgenom manipulacijom može pojačati obrambeni antioksidacijski odgovor biljke, što omogućava zaštitu biljke od različitih stresora (Lee i sur. 2007). Prema istraživanju Gao i suradnika (2014) dodatkom *β*-kriptogeina aktivira se „gen koji nalikuje na kriptogein“ (ApCL) kloniranjem tog gena i njegovom transformacijom u druge biljke poboljšava se otpornost biljke na solni stres i sušu. U svom istraživanju Kumar i suradnici (2016) pokazuju da indukcijom *β*-kriptogeina biljka ne samo da preživljava, nego su zabilježeno povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima što dovodi do pada količine H_2O_2. U ovom istraživanju također je utvrđeno da *β*-kriptogein potiče antioksidacijski odgovor biljke. Iako je transgeno korijenje već izloženo jednom obliku stresa, solnom stresu, obrambeni odgovor se pojačava indukcijom *crypt* gena. Ovakvim istraživanjima omogućava se stvaranje novih ideja koje vode ka dobivanju transgenih biljaka otpornih na stresne uvjete.

5. ZAKLJUČCI

- Uslijed inducibilne ekspresije *β*-kriptogeina u transgenom korijenju ukrasne koprive dolazi do promjene antioksidacijskog statusa tkiva izloženog solnom stresu. S jedne strane, *β*-kriptogein značajno povećava aktivnost CAT, dok s druge strane smanjuje aktivnost GPOD-a.
- Povećana aktivnost antioksidacijskog enzima CAT regulira količinu H_2O_2 u transgenom korijenju tkivu te na taj način smanjuje lipidnu peroksidaciju tkiva, do koje dolazi uslijed izlaganja korijenja solnom stresu.
- Inducibilna ekspresija oomicetalnog elicitora *β*-kriptogeina ublažava učinak solnog stresa u transgenom korijenju ukrasne koprive povećanjem antioksidacijskog statusa u tkivu. Stoga bi inducibilna ekspresija gena *crypt* mogla biti dobra strategija u obrani biljaka od različitih okolišnih stresova.

6. LITERATURA

Abogadallah Gaber M (2010) Antioxidative defense under salt stress. Plant Signal Behav 5:369-374

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Method Enzymol105:121-126

Allen LA, et al. (1995) Isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V affect the binuclear reaction center and alter the kinetics of interaction with the isoforms of yeast cytochrome c. J Biol Chem 270(1):110-8

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. Curr Sci 82:1227–1234

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide - scavenging enzyme inplants. Plant Physiol 85:235–241

Athar H, Khan A and Ashraf M (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. Environ Exp Bot 63:224–231

Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Abreu CEB and Gomes-Filho E (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt sensitive maize genotypes. J Environ Exp Bot 56:87–94

Azooz MM, Ismail AM, AbouelhamMF (2009) Growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a selection criterion for the salt tolerance of maize cultivars grown under salinity stress. Int J Agric Biol 38:1814–9596

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

Blein JP, Coutos-Thévenot P, Marion D, and Ponchet M (2002) From elicitins to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defense mechanisms. Trends Plant Sci 7:293–296

Boller T (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu Rev Plant Phys 46:189–214

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

Bowell PG, Bindschedler LV, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2001) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three‐component system. J Exp Bot 53:1367-1376

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem72:248–254

Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006) ABA induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H_2O_2 synthesis. Plant J 45:113–122

Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. Trends Plant Sci 2:48–54

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. U: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (ur). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Plant Physiol 6:1158–1203

Buhot N, Gomes E, Milat ML, Ponchet M, Marion D, Lequeu J, et al. (2004) Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. Mol Biol Cell 15:5047–5052

Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell Tiss Org 64:145–157

Chaparzadeh ND, Amico ML, Khavari-Nejad RA, Izzo R and Navari-Izzo F (2004) Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. Plant Physiol Biochem 42:695–701

Collinge DB, Susarenka AJ (1990) Plant gene expression in response to pathogens. Plant Mol Biol 9:389–410

Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, van Montagu M, Inze D, van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci 57:779–795

Del Rio L A, Pastori GM, Palma J M, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, Lopez-Huertas E, Hernández JA (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. Plant Physiol 116:1195-1200

Dempsey DA, Klessig DF (1995) Signals in plant disease resistance. Bull Inst Pasteur 93:167–186

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 elicitin. Plant Physiol 121:163-172

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

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 11:81-128.

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

Feierabend J, Schaan C, Hertwig B (1992) Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. Plant Physiol 100:1554–1561

Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. J Exp Bot 55:307–319

Foreman J, Bothwell JH, Demidchik V, Mylona P, Miedema H, Torres MA (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422:442–446

Foyer CH, Lelandais M, Edwards EA, Mullineaux PM (1991) The role of ascorbate in plants interactions with photosynthesis, and regulatory significance. In active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. Plant Physiol 6:131– 144

Foyer C H and Noctor G (2001) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. New Phytol 146:359-388

Gadjev I, Stone JM, Gechev TS (2008) Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. Int Rev Cell Mol Biol 270:87–144

Gaid MM, Scharnhop H, Ramadan H, Beuerle T, Beerhues L (2011) 4-Coumarate: CoA ligase family members from elicitor-treated *Sorbus aucuparia* cell cultures, J Plant Physiol 168:944–951

Gao J, Li J, Xiao Q et al. Biotechnol Lett (2014) Isolation and characterization of a cryptogein-like gene from drought and salt-treated *Alternanthera philoxeroides* roots. Biotechnol Lett 36:2351–2356

Garcia-Brugger AG, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol Plant Microbe Interact 19:711–724

Gaspar Th, Penel C, Hagege D, Greppin H (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes, U: Lebaryewski, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar, Th. (ur.) Biochemical, Molecular and physiological aspects of plant peroxidases, University M. Curie-Sklodowska, Lublin, and University of Geneva, Geneva, 250–279

Gilbert GA, Wilson C, Madore MA(1997) Root-Zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in Coleus. Plant Physiol 115:1267-1276

Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem 48:909-930

Gómez-Vásquez R, Day R, Bushmann H, Randles S, Beeching JR, and Cooper RM (2004) Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. Ann Bot 94:87-97

Grant JJ and Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. Plant Physiol 124:21-29

Guo ZJ, Chen XJ, Wu XL, Ling JQ, Xu P (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP 1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. Plant Mol Biol 55:607–618

Halliwell B (1996) Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Rad Res 25:57–74

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bonhert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Plant Physiol Plant Mol Biol 51:463–499

Hayat S, Mir BA, Wani AS, Hasan SA, Irfan M, Ahmad A (2011) Screening of salt tolerant genotypes of *Brassica juncea* based on photosynthetic attributes. J Plant Interact 6:53–60

Hernandez JA, Almansa MS (2002) Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. Physiol Plant 115:251–257

Hertwig B, Streb P, Feierabend J (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. Plant Physiol 100: 1547–1553

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

Hirasawa KI, Amano T, ShioiY (2005) Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. Phytochemistry 66:463–468

Jaleel CA, Gopi R, Sankar B, Manivannan P, Kishorekumar A, Sridharan R and Panneerselvam R (2007) Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. South African J Bot 73:190–195

Jiang DH, Chen XJ, Wu KL (2004) The trangenic tobacco into which were transfer cryptogein show pathogen-resist and salt-tolerance. Chinese Sci Bull 43:570–575

Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi –D (2004) Over-expression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance. Plant Cell Environ 27:1459–1468

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D, Ricci P (1999) Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. Plant Cell 11:223–23

Kieffer F, Lherminier J, Simon-Plas F, Nicole M, Payot M, Elmayan T, Blein JP (2000) The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. J Exp Bot 51:1799–1811

Koca H, Bor M, Ozdemir F, Turkan I (2007) Effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environ Exp Bot 60:344–351

Kumar M, Basu A, Kumari P, Jha S, Mitra A (2016) Tobacco plantlets ameliorate oxidative stress upon expression of a cryptogein gene. Plant Cell Tissue Organ Cult 125:553–570

Labudda M (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland, Nowoursynowska 159:02–776

Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. Plant Physiol 135:516–529

Lebeda A, Jancovä D, Luhovä L (1999) Enzymes in Fungal Plant Pathogenesis. Phyton (Austria) Plant Physiol 39:51-56

Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, and Pugin (1998)Comparison of binding properties and early biological effects of elicitins in tobacco cells. Plant J 15:773–781

Lebrun-Garcia A, Chiltz A, Gout E, Bligny R, Pugin A (2002) Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen activated protein kinase (MAPK) activation induced by cryptogein in tobacco cells. Planta 214:792–797

Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in Bright Yellow-2 tobacco cells. Plant Physiol 146:1255–1266

Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Plant Cell 14:2627–2641

Lee YP, Kim SH, Bang JW, Lee HS, Kwak SS, Kwon SY (2007) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. Plant Cell Rep 26:591–598

Lin CC, Kao CH (2001) Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. Plant Soil 230:135–143

Lloyd M YU (1995) Elicitins from *Phytophthor*a and basic resistance in tobacco. Proc Natl Acad Sci 92:4088-4094

Mafakheri A, Siosemardeh A, Bahramnejad B, Struik P C, Sohrabi Y (2011) Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase andperoxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Austral J Crop Sci 5:1255-1260

Mathe C, Barre A, Jourda C, Dunand C (2010) Evolution and expression of class III peroxidases. Arch Biochem Biophys 500:58-65

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9:490– 498

Mukandan U, Hjorosto MA (1990) Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula*. Appl Microbiol Biot 33:145–147

Mukherjee SP, Choudhuri MA (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings. Physiol Plant 58:166-170

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ 25:239-250

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant15:473–497

Naik M Poornananda and Al–Khayri Jameel M (2016) Abiotic and biotic elicitors - role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants, abiotic and biotic stress in plants - recent advances and future perspectives, Arun K. Shanker and Chitra Shanker (Ed.) InTech 247-277

Neill SJ, Desikan R, Hancock J (2002b) Hydrogen peroxide signaling. Curr Opin Plant Biol 5:388–395

Nikravesh F, Khavari-Nejada RA, Rahimianb H, Fahim H (2012) Antioxidant enzyme activities and isozyme pattern in hairy roots and regenerated tobacco plants. Russ J Plant Physiol 59:648–655

Noctor G, Arisi AM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. J Exp Bot 49:623–647

Odjacova M, Hadjiivanova C (2001) The complexity of pathogen defense in plants. Bulg J Plant Physiol 27:101–109

O'Donohue MJ, Boissy G, Huet JC, Nespoulous C, Brunie S, Pernollet JC (1996) Overexpression in *Phichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytopthora cryptogea*. Protein Expr Purif 8:254–261

Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat M L, Panabières F, Marais A, and Blein J P (2001) Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. Mol Biol Cell 12:2825-2834

Peever TL, and Higgins VJ (1989) Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosponum fulvum*. Plant Physiol 90:867-875

Peng LT, Jiang YM, Yang SZ, Pan SY (2005) Accelerated senescence of fresh-cut Chinese water chestnut tissues in relation to hydrogen peroxide accumulation. J Plant Physiol Mol Biol 31:527–532

Ponchet M, Panabières F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP (1999) Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? Cell Mol Life Sci 56:1020–1047

Pugin A, Frachisse J-M, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, and Guern J (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. Plant Cell 9:2077–2091

Radman R, Saez, T, Bucke C, Keshavarz T (2003) Elicitacion of plant and microbial cell systems. Biotechnol App Bioc 37:91-102

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996) Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 110: 125–136

Rosahl S (1996) Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. Z Naturforsch 51:123-138

Rustérucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, and Blein JP (1996) Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitins in Nicotiana. Plant Physiol 111:885–891.

Scandalias JG (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Adv Genet 28:1-41

Schuch UK and Kelly J (2008) Salinity tolerance of cacti and succulents. T Lands Urb IPM Res Sum 122:61-66

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J Bot 2012:1–26

Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP (2009) Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea corylifolia*. Bioresource Technol 100:1833–1839

Stallaert VM, Ducret JM, Tavernier E, Blein JP (1995) Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with elicitor cryptogein: evaluation by high temperatures

thermoluminiscence emission and chlorophyll fluorescence. Biochim Biophys Acta 1229:290–295

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Curr Opin Plant Biol 3:217-223

Siegel BZ and Galston W (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. Plant Physiol 42:221-226

Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro Ana E, Reyes-Aguero Juan A, Aguado-Santacruz GA, Jimenez-Bremont JF (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiol Biochem 46:82-92

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

Tayefi –Nasrabadi H, Dehfhan G, Daeihassani B, Movafegi A and Samadi A (2011) Some biochemical properties of catalase from saffl ower (Carthamus tinctorius L. cv. M-cc-190). Afr J Agric Res 6:5221–5226

Verma M, Friedl MA, Richardson AD, Kiely G, Cescatti A, Law B E, Wohlfahrt G, Gielen B, Roupsard O, Moors E J, Toscano P, Vaccari FP, Gianelle D, Bohrer G, Varlagin A, Buchmann N, Gorse E, Montagnani L, and Propastin P (2014) Remote sensing of annual terrestrial gross primary productivity from MODIS: an assessment using the FLUXNET. Biogeosciences 11:2185–200

Viard MP, Martin F, Pugin A, Ricci P, Blein JP (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. Plant Physiol 104:1245–1249

Vranova E, Inze´ D, and Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. J Exp Bot 53:1227-1236

Vukadinović V, Jug I, Đurđević B (2014): Ekofiziologija bilja. NSS Osijek

Vuković R (2013) Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.) ,

Doktorski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet; Osijek: Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera Osijek

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

Willkenes H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. Mol Breeding 1:207–228

Wojatszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem J 322:681-692

Yin H, Xu L, and Porter N A (2011) Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis, Chem Rev 111:5944-5972

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

Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM and Bohnert HJ (2005) Salt and Crops: Salinity Tolerance. NewsCAST 32:13–16

Web 1. http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1beo