Učinak transgena za ß-kriptogein na aktivnost katalaze i gvajakol-peroksidaze ukosmatom korijenju ukrasne koprive (Coleus blumei Benth.)

Mataković, Lavinija

Master's thesis / Diplomski rad

2012

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:181:452114

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

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Lavinija Mataković

UČINAK TRANSGENA ZA *β*-KRIPTOGEIN NA AKTIVNOST KATALAZE I GVAJAKOL-PEROKSIDAZE U KOSMATOM KORIJENJU UKRASNE KOPRIVE (*Coleus blumei* Benth.)

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2012.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Lavinija Mataković

UČINAK TRANSGENA ZA *β*-KRIPTOGEIN NA AKTIVNOST KATALAZE I GVAJAKOL-PEROKSIDAZE U KOSMATOM KORIJENJU UKRASNE KOPRIVE (*Coleus blumei* Benth.)

Diplomski rad

OSIJEK, 2012.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Učinak transgena za *β*-kriptogein na aktivnost katalaze i gvajakol-peroksidaze u kosmatom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.)

Lavinija Mataković

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Osijek
Mentor: Dr.sc. Elizabeta Has-Schön, **izv.prof**
Neposredni voditelj: Dr.sc. Ivna Štolfa, **doc.**

Sažetak: Svojstvo biotičkih elicitora da potiču obrambene odgovore u biljkama koristi se u *in vitro* kulturi kao strategija za povećanu proizvodnju komercijalno važnih spojeva. Elicitori se također koriste i u svrhu poboljšanja otpornosti biljke na patogene i neke okolišne stresove. Beta-kriptogein je proteinski elicitor koji izlučuje fitopatogena oomiceta *Phythophthora cryptogea*, koji kod biljaka izaziva hipersenzitivni odgovor i sustavno stjecanje otpornosti protiv nekih patogena. Cilj ovog istraživanja je kontroliranom sintezom kriptogeina u biljci oponašati napad patogenom, te na taj način poboljšati antioksidativni status biljke. U tu svrhu je transgeno korijenje ukrasne koprive (*Coleus blumei*), u kojem se sintetčki gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog alkoholnog promotora, tretirano etanolom kako bi se inducirala sinteza *β*-kriptogeina. Kao pokazatelji oksidativnog stresa mjerene su količine vodikova peroksida (H_2O_2) i produkata lipidne peroksidacije (TBARS). Antioksidativni staus je određen mjerenjem aktivnosti katalaze i gvajakol-peroksidaze. Inducibilna ekspresiju gena *crypt* je povećala aktivnosti antioksidativnih enzima (katalaze i gvajakol-peroksidaze) u kosmatom korijenju ukrasne koprive. Razine H_2O_2 i TBARS-a su pokazale odsutnost oksidativnog stresa. Povećani antioksidativni status mogao bi poboljšati otpornost biljaka protiv patogena i drugih okolišnih stresova.

Broj stranica: 45
Broj slika: 12
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 112
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: *Coleus blumei*, ß-kriptogein, kosmato korijenje, oksidacijski stres, katalaza, gvajakol-peroksidaza

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo:

1. **Dr.sc.** Elizabeta Has-Schön**, izv.prof**
2. **Dr.sc.** Ljiljana Krstin**, doc.**
3. **Dr.sc.** Ivna Štolfa**, doc.**
4. **Dr.sc.** Janja Horvatić**, izv.prof.**

Rad je pohranjen u: Knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

BASIC DOCUMENTACION CARD

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

Influence of β-cryptogein transgene on catalase and guaiacol-peroxidase activity in Coleus blumei hairy roots

Lavinija Mataković

Thesis performed at: Department of Biology, Osijek
Supervisor: Dr.sc. Elizabeta Has-Schön, **associate prof.**
Assistant in charge: Dr.sc. Ivna Štolfa, **assistant, prof.**

Short abstract: The property of biotic elicitors to induce plant defence response was used as an strategy for enhancing production of commercially important compounds in plant *in vitro* cultures. Also, elicitors have been used to improve plant resistance to pathogens and to some environmental stresses. Proteinaceus elicitor secreted by phytophatogenic oomycete *Phythophthora cryptogea*, *β*-cryptogein, induces hypersensitive response and systemic acquired resistance in plants against some pathogens. The aim of this thesis was to mimic pathogen attack by using controlled synthesis of cryptogein, and thus improve antioxidant status of the plant. In order to induce synthesis of the *β*-cryptogein *Coleus blumei* hairy roots harboring synthetic *crypt* gene were generated under the control of alcohol-inducible promoter after ethanol treatment. As an indicator of the oxidative stress hydrogen peroxide (H_2O_2) and lipid peroxidation product (TBARS) contents were estimated. Antioxidative status was determined by measuring catalase and guiacol peroxidase activities. Induced expression of *crypt* gene caused increase of antioxidant enzymes activities (GPOD and CAT) in *Coleus blumei* hairy roots. Contents of H_2O_2 and TBARS confirmed the absence of oxidative stress. Increased antioxidative status could provide enhance resistance against pathogens and other environmental stresses.

Number of pages: 45
Number of figures: 12
Number of tables: 1
Number of references: 112
Original in: Croatian
Key words: *Coleus blumei, β*-cryptogein, hairy roots, oxidative stress, catalase, guaiacol peroxidase

Date of the thesis defence:

Reviewers:

1. **Dr.sc.** Elizabeta Has-Schön, **associate prof.**
2. **Dr.sc.** Ljiljana Krstin**, assistant prof.**
3. **Dr.sc.** Ivna Štolfa**, assistant prof.**
4. **Dr.sc.** Janja Horvatić**, associate prof.**

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Unversity of Josip Juraj Strossmayer in Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1. Interakcija između biljke i patogena 1

1.1.1. Reaktivne kisikove tvari 2

1.1.2. Oksidacijski stres 3

1.1.3. Pokazatelji oksidacijskog stresa 3

1.1.3.1. Vodikov peroksid 3

1.1.3.2. Lipidna peroksidacija 4

1.1.4. Antioksidativni sustav biljne obrane 5

1.1.4.1. Gvajakol-peroksidaze 5

1.1.4.2. Katalaza 6

1.2. Biotički elicitori 6

1.2.1. Beta-kriptogein 8

1.3. Alkoholom-regulirani inducibilni (*alcA)* promotor 9

1.4. Kosmato korijenje (eng. *Hairy roots*) 10

1.5. Cilj rada 12

2. MATERIJALI I METODE **13**

2.1. Materijali 13

2.1.1. Kemikalije i otopine 13

2.1.2. Uređaji 14

2.1.3. Biljni materijal 14

2.1.4. Hranjive podloge 17

2.2. Metode 18

2.2.1. Kultura biljnog tkiva 18

2.2.2. Određivanje količine H_2O_2 18

2.2.3. Određivanje količine malondialdehida (MDA) 19

2.2.4. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina 19

2.2.5. Određivanje koncentracije proteina 20

2.2.6. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) 20

2.2.7. Određivanje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza
(gvajakol-peroksidaza, GPOD) 20

2.3. Statistička obrada podataka 21

3. REZULTATI **22**

3.1. Količina vodikovog peroksida (H_2O_2) u transgenom korijenju 22

3.2. Količina produkata lipidne peroksidacije u transgenom korijenju 23

3.3. Aktivnost katalaze (CAT) u transgenom korijenju 25

3.4. Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOD) u transgenom korijenju 26

4. RASPRAVA **28**

5. ZAKLJUČCI **32**

6. LITERATURA **33**

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Elizabeti Has-Schön i doc. dr. sc. Ivni Štolfa na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog rada.

Najiskrenije zahvaljujem Rosemary Vuković asistentici Odjela za biologiju na iznimnoj pomoći, brojnim savjetima i satima posvećenim mom Diplomskom radu te svom znanju stečenom u to vrijeme.

Najveće hvala mojoj obitelji na svim odricanjima, razumijevanju i neizmjernoj podršci tokom studiranja. Posebno hvala mami na cjelokupnom trudu koji je nesebično uložila u moje školovanje, na beskrajnom strpljenju, stalnoj potpori i ljubavi.

Hvala mojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene.

1. UVOD

1.1. Interakcija između biljke i patogena

Tijekom svojeg životnog ciklusa biljke moraju reagirati na različite prijetnje koje dolaze iz okoliša, zbog čega su razvile širok raspon obrambenih strategija (Van Breusegem i Dat 2006). Protiv mikroorganizama postoji sofisticirani osjetilni sustav koji omogućuje biljkama uočavanje kemijskih signala potencijalnih patogena, te njihovo prevođenje u prikladne biokemijske odgovore. Biljke posjeduju fizičke barijere poput kutikule i stanične stijenke te brojne molekularne mehanizme za uspiješno suzbijanje napada patogena (De Gara i sur, 2003). Nakon infekcije pokreće se signalni mehanizam koji dovodi do promjena u metabolizmu zaražene biljke i u konačnici usporava širenje patogena (De Gara i sur, 2003; Bindschedler i sur, 2006; Davies i sur, 2006; Zaninotto i sur, 2006; Choi i sur, 2007). Biljke prepoznaju i suprotstavljaju se napadu mnogih fitopatogena inducirajući brzi obrambeni odgovor, zvan hipersenzitivni odgovor (*engl. Hypersensitive Response,* HR). Ovaj odgovor rezultira lokaliziranom smrti stanica i tkiva na mjestu infekcije, lišavajući na taj način patogene hranjivih tvari što spriječava njihovo širenje u ostale dijelove biljke. Bonnet i suradnici (1995) su u svojim istraživanjima pokazali kako interakcija između fitopatogene oomicete *Phytophthora cryptogea* i biljke duhana (*Nicotiana tabacum*) uzrokuje HR za koji je karakteristična pojava nekroze tkiva i ograničavanje rasta gljive. Hipersenzitivni odgovor često aktivira nespecifičnu otpornost u biljci, fenomen poznat kao sustavno stjecanje otpornosti (*engl. Systemic Acquired Resistance,* SAR) što je jedna od posljedica biljnog obrambenog odgovora (Wojtaszek 1997). Nakon infekcije biljke patogenom i njenog oporavka, razvija se povećana otpornost na buduće infekcije uzrokovane istim ili drugim patogenima (Grover i Gowthaman 2003). Prema Ryals i suradnicima (1996) nakon što se SAR jednom aktivira u biljci, nastala otpornost je dugotrajna i učinkovita protiv širokog spektra patogena (virusa, bakterija i oomiceta).

1.1.1. Reaktivne kisikove tvari

Kao odgovor na napad patogena, u biljnom tkivu dolazi do brze i prolazne akumulacije velike količine reaktivnih kisikovih tvari (engl. Reactive Oxygen Species, ROS). Glavni oblici ROS-a koji imaju ključnu ulogu u obrani su: vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni anioni ($O_2^{\bullet -}$) i hidroksilni radikali ($^{\bullet}OH$). U normalnim uvjetima, reaktivne kisikove tvari se pojavljuju u stanicama kao štetni nusprodukti, nastali kao rezultat uzastopne redukcije molekularnog kisika. Stvaranje ROS-a posljedica je poremećaja normalnog oksidativno-redukcijskog stanja stanice, pri čemu ROS djeluju kao oksidansi te mijenjaju svojstva tvari sa kojima reagiraju interferirajući sa njihovom funkcijom. Budući da su ROS vrlo reaktivni a samim time i toksični, njihova je akumulacija u stanicama strogo regulirana kako bi se izbjegle visoke koncentracije koje mogu oštetiti biljno tkivo (Torres i sur, 2006). Dosadašnja istraživanja koja su se temeljila na mehanizmima stvaranja ROS-a i njegovim funkcijama u biljkama, pokazala su kako je upravo stvaranje i akumulacija ROS-a specifičan odgovor biljke na napad patogenih mikroorganizama (Bowell, 2001).

Osim što imaju ulogu u direktnoj obrani od napada patogena, istraživanja su pokazala da ROS služe i kao signalne molekule u aktiviranju daljnje biljne zaštite koja, između ostalog, obuhvaća i akumulaciju fitoaleksina, te aktivaciju gena uključeni u obranu biljke (Van Breusegem i sur, 2008; Shetty i sur, 2008). Prve reakcije javljaju se nekoliko minuta od invazije na mjestu infekcije, nakon uočavanja patogena. Ovi brzi događaji koji ne ovise o transkripciji uzrokuju morfološke i fiziološke promjene zaraženih stanica, te ovise o alosteričkim promjenama nekoliko enzima i brzim kemijskim promjenama. Masivna sinteza ROS-a događa se uglavnom u apoplastu (Mendoza, 2011). Eksperimenti u kojima su korišteni specifični inhibitori pokazali su kako je influx Ca^{2+} potreban za proizvodnju ROS-a (Grant i sur, 2000). Stoga je povećanje razine Ca^{2+} u citosolu još jedan od brzih odgovora nakon infekcije patogenom. Nekoliko enzima uključeno je u proizvodnju ROS-a nakon uspješnog prepoznavanja patogena (Torres i sur, 2006). Jedan od prvih događaja nakon prepoznavanja patogena je aktivacija NADPH-oksidaze u plazma membrani (Keller i sur, 1998). Upotreba specifičnih inhibitora je pokazala kako su NADPH-oksidaza membrane i peroksidaze stanične stijenke dva najvjerojatnija biokemijska izvora ROS-a (Grant i sur, 2000) nakon infekcije patogenom.

Brojni radovi pokazuju kako ROS, a posebno H_2O_2 ima antimikrobnu ulogu u obrani biljke (Apostol i sur, 1989; Custers i sur, 2004; Legendre i sur, 1993).

1.1.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres, neuravnoteženost između antioksidanasa i prooksidanasa koja ometa staničnu funkciju, jedan je od prvih znakova obrambene strategije biljke. Oksidacijski stres pojavljuje se kada dođe do prekomjernog stvaranja $O_2^{\bullet -}$ i/ili H_2O_2 u stanicama, koji su nastali kao odgovor biljke na različite vanjske podražaje (Wojtaszek, 1997). Shigeoka i suradnici (2002) također ističu kako je smanjenje katalitičke aktivnosti biljnog aktioksidativnog sustava još jedan razlog za pojavu oksidativnog stresa. U biljkama ROS nastaju kao nusprodukti različitih metaboličkih puteva i lokalizirani su u različitim staničnim odjeljcima (Ceron-Garcia i sur, 2012). Zbog njihovog toksičnog učinka dolazi do oštećenja svih komponenata unutar stanice uključujući lipidnu peroksidaciju membranskih lipida, inaktivaciju proteina i mutaciju DNA (Mendoza, 2011). Alscher i sur, (2002) ističu kako se eliminacija ROS-a u biljnim stanicama, događa pomoću različitih komponenata enzimatskog ili neenzimatskog antioksidativnog obrambenog sustava.

1.1.3. Pokazatelji oksidacijskog stresa

1.1.3.1 Vodikov peroksid (H_2O_2)

Vodikov peroksid je jedan od važnijih kisikovih spojeva koji nastaje u biljkama tijekom oksidativnog stresa, relativno je stabilan i ima dug životni vijek. Budući da nije jako reaktivan i u stanju je proći kroz membranu biljne stanice te doći staničnih lokacija vrlo udaljenih od samog mjesta formiranja, djeluje i kao signal (Wojtaszek, 1997). Dokazano je da H_2O_2 ima važnu ulogu u nepovoljnim okolišnim uvjetima, pri čemu djeluje kao posrednik u stjecanju otpornosti na abiotički i biotički stres (Dat i sur, 2000). Patogenom inducirana proizvodnja H_2O_2 ima nekoliko učinaka, posebno je važna uloga signala koji dovodi do SAR (Alvarez i Lamb, 1998; Noctor i Foyer 1998). Peng i Kuc (1992) također ističu kako H_2O_2 ima direktno toksično djelovanje na mikrorganizme. Prema Tenhaken i suradnicima (1995) H_2O_2 upravlja hipersenzitivnim odgovorom tijekom smrti stanice. Torres i suradnici (2002) u svojim su istraživanjima pokazali kako odsutnost gena za NADPH-oksidazu kod uročnjaka smanjuje proizvodnju H_2O_2, a time smanjuje i obrambene reakcije protiv patogena. NADPH-oksidaza prenosi elektrone sa citoplazmatskog NADPH na molekularni kisik kako bi se stvorili $O_2^{\bullet -}$(Simon-Plas i sur, 2002). Superoksidni ioni podliježu reakciji dismutacije koju katalizira superoksid dismutaza (SOD), pri čemu nastaje H_2O_2 i akumulira se na mjestu

napada (Thordal-Christensen, 1997). Unutarstanična razina H_2O_2 regulirana je širokim rasponom enzima od kojih su najvažniji katalaza i različite peroksidaze koje nastali H_2O_2 uklanjanju prevođenjem u vodu. CAT je aktivna samo pri relativno visokim koncentracijama H_2O_2, dok se niže koncentracije H_2O_2 uklanjaju pomoću peroksidaza (Gadjev i sur, 2008).

1.1.3.2. Lipidna peroksidacija

Vrlo važna značajka stanične smrti te tipična obrambena reakcija do koje dolazi tijekom interakcije biljka-patogen je lipidna peroksidacija. Lipooksigenaza (LOX) je ključni enzim lipidne peroksidacije koji ima ulogu u formiranju hidroperoksida koji se vrlo brzo prevode u seriju reaktivnih spojeva. Nekoliko reaktivnih vrsta, uključujući aldehide, lipidne epokside i alkohole, formira se razgradnjom lipidnih hidroperoksida (Davies i sur, 2000). Malondialdehid (MDA) jedan je od završnih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina fosfolipida, odgovoran za oštećenja stanične membrane (Gutteridge 1995, Halliwell i sur, 1993). Višestruko nezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) prisutne u membranskim fosfolipidima posebno su osjetljive na napad ROS-a. Glavna mjesta napada u molekulama fosfolipida su dvostruke veze između dva ugljikova atoma te esterska veza između glicerola i masne kiseline. Jedan $^{\bullet}OH$ može dovesti do peroksidacije mnogih PUFA, jer su reakcije koje sudjeluju u tom procesu dio cikličke lančane reakcije. U početnoj fazi $O_2^{\bullet -}$ i $^{\bullet}OH$ mogu reagirati sa metilenskom skupinom PUFA stvarajući konjugirane diene, lipidne peroksi radikale i hidroperokside (Sharma i sur, 2012). Peroksidacija PUFA tijekom napada ROS-a dovodi do smanjenja fluidnosti i povećanja propusnosti membrane. Istraživanja utjecaja fungalnih elicitora na lipidnu peroksidaciju pokazala su kako se nakon tretiranja krumpira elicitorom oomicete *P.infestans* povećala aktivnost LOX (Göbel i sur, 2003). Također se pokazalo kako je lipidna peroksidacija kod lista duhana, povezana sa HR induciranim kriptogeinom (Rusterucci i sur, 1999).

1.1.4. Antioksidativni sustav biljne obrane

Kako bi se biljke nosile sa ekološkim promjenama i spriječile inavaziju patogena, njihov metabolizam mora biti fleksibilan i dinamičan (Noctor i Foyer, 1998). Većina biljnih stanica ima sposobnost proizvodnje i detoksikacije ROS-a. Stanice su stekle vrlo važne zaštitne mehanizme kako bi održale razinu ROS-a unutar stanice najnižom mogućom. Međutim u nekim slučajevima određenim stresnim situacijama ovi zaštitni mehanizmi su nadjačani, posebno tijekom oksidativnog stresa (Wojtaszek 1997). Životni vijek ROS-a unutar biljne stanice određen je pomoću antioksidativnog sustava koji pruža ključnu zaštitu od oksidativnog oštećenja. Antioksidativni sustav sastoji se od brojnih enzima i spojeva niske molekularne težine. Glavni antioksidativni enzimi za zaštitu stanica od oksidativnog oštećenja u biljnim su SOD, CAT i askorbat peroksidaza (APX). Ovi enzimi prisutni su u različitim izoenzimskim oblicima u nekoliko staničnih odjeljaka. Njihova ekspresija je genetički kontrolirana, te je prema potrebi regulirana razvojnim i okolišnim podražajima kako bi se uklonio proizvedeni ROS u stanicama (Di Cagno, 2001; Noctor i Foyer, 1998; De Gara, 2003).

1.1.4.1 Gvajakol-peroksidaze (GPOD, EC 1.11.1.7)

Ovi enzimi pripadaju velikoj obitelji oksidoreduktaza koje kataliziraju razgradnju H_2O_2 uz nastanak vode. Najčešće su hemoproteini i nalaze se u mnogim staničnim odjeljcima: vakuoli, Golgijevom tijelu, endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima, staničnoj stijenci kao i u izvanstaničnim prostorima. Za redukciju H_2O_2 peroksidaza koristi organski supstrat kao donor elektrona prema jednadžbi:

$$RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + H_2O.$$

Hiraga i suradnici (2001) ističu kako je nekoliko GPOD izoenzima u biljkama inducirano tijekom ranjavanja i infekcije patogenom, što naglašava njihovu važnost u obrani biljke. GPOD kataliziraju oksidoredukciju između H_2O_2 i nekoliko drugih reduktanata, te je njihova aktivnost u korelaciji sa biljnom obranom protiv patogena (Jwa i sur, 2006). Osim što sudjeluju u obrambenim odgovorima tijekom napada patogena, peroksidaze imaju važnu fiziološku ulogu u sintezi polimera stanične stijenke (lignina i suberina) koji predstavljaju fizičku barijeru protiv biotičkog i abiotičkog stresa (Quiroga i sur, 2000). Budući da GPOD

imaju veći afinitet za H_2O_2 od CAT, imaju važniju ulogu od CAT u uklanjanju ROS-a tijekom oksidativnog stresa (Gill i Tuteja 2010).

1.1.4.2. Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6)

Biljne katalaze su tetramerni hemoproteini koji se nalaze uglavnom u peroksisomima. Ubrajaju se među najučinkovitijie proteinskie katalizatore te katalizira razgradnju H_2O_2 pri čemu nastaje voda i kisik (Willekens 1997; Scandalios 1987) prema jednadžbi:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2.$$

Iako je katalaza više specifična za vodikov peroksid također reagira i sa ograničenim brojem organskih hidroperoksida. Katalaza koristi H_2O_2 kao elektron donor i akceptor. Enzim je visokog kapaciteta ali niskog afiniteta za razgradnju H_2O_2, te ima veću brzinu ali mnogo niži afinitet za H_2O_2 od peroksidaze. Smatra se kako je CAT kompetitor GPOD budući da koriste isti supstrat. CAT je aktivna samo pri relativno visokim koncentracijama H_2O_2, dok se niže koncentracije H_2O_2 uklanjaju pomoću GPOD (Gadjev i sur, 2008). Katalaze imaju važnu ulogu u uklanjanju većine H_2O_2, međutim zbog visokog afiniteta za H_2O_2 i prisutnosti na različitim lokacijama unutar stanice, peroksidaze uklanjaju onaj H_2O_2 koji je CAT nedostupan (Van Breusegem i sur, 2001).

1.2. Biotički elicitori

Biljke pokazuju fizičke i morfološke odgovore na niz fizičkih i kemijskih čimbenika poznatih kao elicitori. Obrambene reakcije koje predstavljaju odgovor na štetne okolišne čimbenike omogućavaju biljkama njihov opstanak. Elicitori se mogu definirati kao molekule koje nakon unošenja u niskim koncentracijama u biološkom sustavu potiču ili poboljšavaju sintezu biološki aktivnih metabolita. Još od 1970. godine pokazalo se kako male molekule polisaharida i proteina, proizvodene od strane patogena, djeluju kao elicitori i induciraju proizvodnju fitoaleksina u biljnim tkivim oko mjesta infekcije. Svojstvo elicitora da induciraju obrambene odgovore biljke se koristi u povećanoj proizvodnji komercijalno važnih spojeva. Značajan primjer je biosinteza taksola pomoću stanične kulture koja je opsežno

istraživana budući da je sintetska proizvodnja ovog biljnog sekundarnog metabolita vrlo skupa (Radman i sur, 2003). Mehanizam biotičke elicitacije kod biljaka uključuje vezanje elicitora na membranske receptore (Hanania i Avni, 1997; Basse i sur, 1993). Nakon što se biljka ili kultura biljnih stanica tretira elicitorima, brzo se pojavljuje niz biokemijskih reakcija kao što je aktivacija NADPH-oksidaze odgovorne za proizvodnju ROS-a (Lebrun-Garcia i sur, 1999), promjene u strujanju iona preko stanične membrane (Mathieu i sur, 1991) i SAR (Lebrun-Garcia i sur, 1999). Proučavanje elicitora neophodno je kako bi se stvorile učinkovite strategije za smanjenje negativnog učinka oskidacijskog stresa u biljkama (Ceron-Garcia, 2012). Budući da se pokazalo kako *Phytophthora drechleri* luče elicitine koji izazivaju nekrozu lista duhana, Picard i suradnici (2000) predlažu da se inženjeringom molekula, poput elicitina, inducira obrana u biljnim stanicama bez stvaranja nekroze tkiva. Elicitori induciraju proizvodnju ROS-a kako bi potaknuli obrambeni mehanizam biljke a također izazivaju HR i proizvodnju sekundarnih antimikrobnih spojeva (Ebel i Cosio, 1994; Nürnberger, 1999). Neki drugi autori također pokazuju kako biljke koje su tretirane elicitinima razvijaju otpornost, jer nakon primjene na biljnu površinu aktiviraju se signalni putevi unutarstanične obrane (Odjacova i Hadjiivanova, 2001; Garcia-Brugger i sur, 2006; Holopainen i sur, 2009).

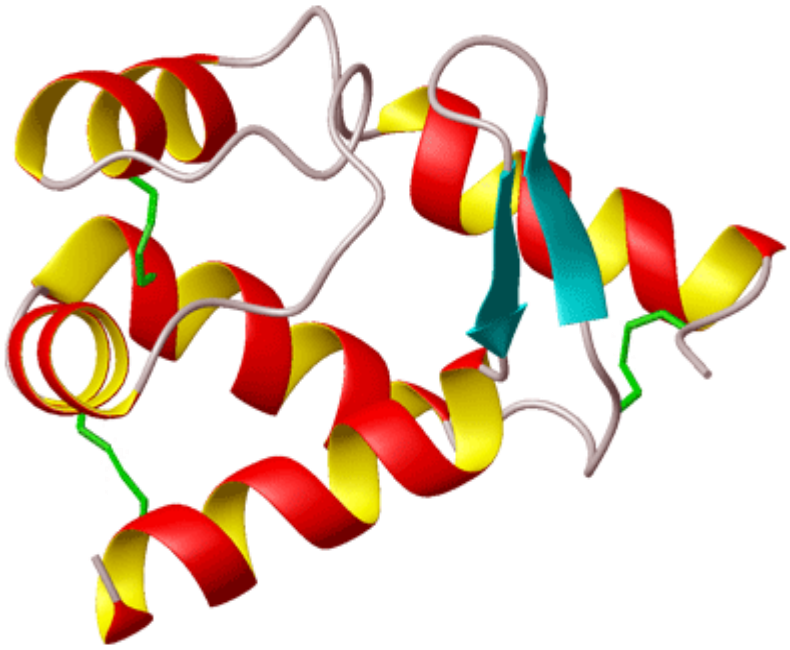
Gljivični fitotoksini, tzv. elicitini, su skupina proteinskih elicitora. Do sada sve proučavane vrste roda *Phytophthora* izlučuju jednu ili nekoliko izoformi takvih molekula. Elicitini su vrlo konzervirani holoproteini (10 kDa) koje izlučuju sve vrste roda *Phytophthora* te nekoliko vrsta roda *Phytium* (Heut i sur, 1995; Kamoun i sur, 1993). Imaju ulogu kao toksični i signalni proteini koji induciraju obrambeni odgovor uključujući HR i nekrozu lista. Smatra se da je prepoznavanje biljne stanice određeno interakcijom elicitina sa receptorom na plazma membrani duhana (Yu, 1995). Elicitini izlučeni u vanjski medij u biljku ulaze kroz njezin korijenov sustav te nastavljaju sve do stanica lista gdje uzrokuju nekrozu (Pernollet i sur, 1993). Ove molekule ne prolaze nikakve post-translacijske modifikacije osim uklanjanja signalnog peptida prije izlučivanja u stanični medij. Dvije strukturne skupine (α- i β-elicitini) razlikuju se po svojim biološkim učincima nakon primjene na stabljike ili peteljke duhana. Smatra se kako β-elicitini uzrokuju jaču nekrozu listova, te pružaju bolju zaštitu tijekom naknadnog napada patogena (Yu i sur, 1995). Alfa-elicitini (manje nekrotični) su kiseli proteini sa amiokiselinom valinom na mjestu 13, dok su β-elicitini vrlo toksični pri čemu nekrozu izaziva već 0.1 μg po listu. Beta-elicitini su bazični te sadrže hidrofilni ostatak (lizinski ili treoninski) na istoj poziciji, koja može biti ili aktivno ili regulatorno mjesto odgovorno za nekrozu. Ova klasifikacija je u korelaciji sa razlikama u slijedu elicitina te

njihovim fizikalno-kemijskim značajkama. Poznat je potpuni slijed 10 elictina (Heut and Pernollet 1989), te njihov sastav od 98 aminokiselina sa homologijom većom od 66%. Iz odnosa slijeda i funkcije pretpostavlja se da je 13. aminokiselinski ostatak ključan za toksičnost. Rodovi *Phytium* i *Phytophthora* ekonomski su važni biljni patogeni. Nalaz da se elicitini izlučuju u svim drugim rodovima fitopatogenih oomiceta (osim roda *Phytophthora*) podržava hipotezu da su ove molekule primarno toksini koji slabe domaćina u svrhu pomaganja gljive u napadu na biljno tkivo.

Elicitini iz različitih vrsta pokazuju različite razine toksičnosti a te su razlike vezane za strukturne značajke. Smatra se da je biološka funkcija elicitina prijenos sterola iz biljke domaćina putem još sasvim nepoznatoga mehanizma, budući da neke fitopatogene oomicete roda *Phytophthora* ne mogu same sintetizirati sterole (Ponchet i sur, 1999).

1.2.1. Beta-kriptogein

Beta-kriptogein je glavni elicitin oomicete *Phytophthora cryptogea*, koji pripada *β*-skupini elicitina. Trodimenzionalna struktura *β*-kriptogeina određena je pomoću kristalografije i nuklearne magnetske rezonancije (Boissy i sur, 1996; Fefeu i sur, 1997). Beta-kriptogein ima na jednoj strani 5 slabije konzerviranih α-petlji, dok je na drugoj strani visoko konzervirana kljunasta struktura formirana pomoću 2 antiparalelne β-ploče i Ω-petlje (Slika 1). S obzirom na veliku sličnost između aminokiselinskog slijeda različitih članova iz obitelji elicitina ova strukturna slika je vjerojatno konzervirana. Kriptogein se prvo sintetizira kao pre-protein sa signalnim peptidom od 20 aminokiselinskih ostataka koji se uklanjaju prije izlaza u stanični medij. Nakon pokusa provođenih na biljkama duhana pokazalo se kako su receptori za kriptogein glikozilirani heterodimerni proteini locirani na plazma membrani (Bourque i sur, 1999). Brojna istraživanja su pokazala kako je jedan od najranijih odgovora na djelovanje kriptogeina proizvodnja ROS-a. Važan oblik biljne obrane je HR u kojem dolazi do brze stanične smrti oko mjesta infekcije kako bi se ograničio rast patogena. U kulturi stanica duhana *β*-kriptogein inducira HR (Ricci i sur, 1989; Binet i sur, 2001), i SAR kod biljke duhana (Keller i sur., 1996). Provedena istraživanja tijekom oksidativnog stresa uzrokovanog kriptogeionom pokazala su kako nekoliko minuta nakon percepcije patogena dolazi do brze proizvodnje ROS-a u biljkama, dok daljnja akumulacija ROS-a u konačnici rezultira smrću stanice (Grant i Loake, 2000).



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

1.3. Alkoholom-regulirani inducibilni (*alcA)* promotor

Inducibilni promotori su genski promotori koji se koriste za rekombinantnu ekspresiju, te je njihova aktivnost inducirana prisutnošću ili odsutnošću abiotičkih ili biotičkih čimbenika. Kemijski regulirani inducibilni promotori predstavljaju promotore čija je transkripcijska aktivnost regulirana alkoholom, tetraciklinima, steroidima, metalima ili nekim drugim spojevima. Aktivnost ovih promotora modulirana je kemijskim spojevima koji ili uključuju ili isključuju gensku transkripciju (Roa-Rodríguez 2003). Put iskorištavanja etanola filamentozne gljivice *Aspergillus nidulans* je inducibilni genski sustav za iskorištavanje etanola kao izvora ugljika, te predstavlja jedan od najjačih genskih ekspresijskih sustava (Flipphi i sur, 2002). Prvi enzim u putu iskorištavanja etanola je alkohol dehidrogenaza I (ADH-I) kodirana *alcA* genom (Roa-Rodríguez 2003). U prisutnosti inducera poput etanola ili

aldehida, AlcR transkripcijski faktor se vezuje na specifični motiv *alcA* promotora, te aktivira transkripciju alkohol-dehidrogenaze (Kulmburg i sur, 1992). Gen *AlcR* se nalazi pod kontrolom jakog konstitutivnog promotora kao što je CaMV 35S. U odsutnosti inducera aktivatorski protein AlcR ne može vezati specifičnu sekvencu modificiranog *AlcA* promotora koji je povezan sa genom od interesa.

Modificirani ciljni promotor obuhvaća regulatornu sekvencu *alcA* promotora i regiju jezgre promotora (TATA box i mjesto početka transkripcije). Prednosti ovog sustava su nedostatak odgovarajućeg *alcR* gena u biljkama, jer se na taj način izbjegava aktivacija endogene biljne alkohol dehidrogenaze. Kemijski induceri su relativno jednostavne molekule sa niskom razinom toksičnosti (Roa-Rodríguez 2003). Panozzo i sur (1997) pokazali su kako se u prisutnosti etanola, alkoholom regulirani transkripcijski faktor AlcR veže na ciljnu sekvencu unutar *alcA* promotora i aktivira ekspresiju ciljnog gena.

1.4. Kosmato korijenje (eng. *Hairy roots*)

Različite vrste bakterija sposobne su za prijenos gena u više biljne vrste (Broothaerts i sur, 2005), među njima su najviše proučavane *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*. Članovi roda *Agrobacterium* su fitopatogene vrste koje uzrokuju maligne bolesti brojnih biljnih vrsta. *A. rhizogenes* je gram negativna fitopatogena bakterija tla koja pripada porodici Rhizobiaceae. *A. rhizogenes* inficira biljno tkivo na ranjenim stanicama te dovodi do stvaranja adventivnog korijenja poznato kao kosmato korijenje (eng. *hairy roots*). Molekularna osnova genetičke transformacije biljnih stanica pomoću agrobakterija je prijenos i integracija T-DNA regije velikoga Ri (eng. *root inducing*) plazmida iz bakterije u biljni genom (Weber i Bodanese‑Zanettini 2011). Također, agrobakterije omogućavaju prijenos T-DNA binarnih vektora olakšavajući time selekciju transgenih biljaka iz dobivenog kosmatog korijenja. T-DNA koja sadrži transgen od interesa u binarnom vektoru, općenito je ko-transformirana sa *A. rhizogenes* Ri T-DNA koja sadrži *rol* gene odgovorne za proliferaciju korijena. Agrobakterija prenosi T-DNA koja čini malu regiju (približno od 5-10%) Ri-plazmida (Anderson i Moore, 1979). Transformacija uzrokovana ovom vrstom dovodi do razvoja fenotipa vrlo razgranatog kosmatog (dlakavog) korijena. Kosmato korijenje ima jedinstvo svojstvo da bude sposobno rasti *in vitro* bez dodatka egzogenih biljnih regulatora rasta (Collier i sur, 2005). Transformacija posredovana bakterijom *A. rhizogenes* postala je moćan alat u istraživanju biologije korijena zbog svoje brze i jednostavne metodologije.

Ovaj sustav transformacije vrlo je koristan u genetičkoj manipulaciji biljaka. Budući da svaki transgenični korijen predstavlja samostalni transformacijski događaj, u kratkom vremenskom razdoblju može se dobiti veliki broj transformanata (Weber i Bodanese‐Zanettini 2011). Sama učinkovitost indukcije kosmatog korijenja može značajno varirati između genotipova (Savka i sur, 1990). Kosmato korijenje jedinstveno je u svojoj genetičkoj i biosintetičkoj stabilnosti, pri čemu upravo njihov brz rast nudi dodatne prednosti. Njihov brz rast, nisko vrijeme udvostručavanja, jedostavno održavanje i sposobnost sinteze niza kemijskih spojeva nudi dodatnu prednost kao kontinuirani izvor proizvodnje vrijednih sekundarnih metabolita. Kultura kosmatog korijenja vrijedan je izvor fitokemikalija koje se koriste kao lijekovi, kozmetika i aditivi u prehrani. Budući da ovo korijenje može sintetizirati više od jednog metabolita pokazali su svoju ekonomičnost u svrhu komercijalne proizvodnje (Giri i Narasu 2000). Biljne stanične kulture bogati su izvori vrijednih lijekova i drugih biološki aktivnih fitokemikalija (Radman i sur, 2003). Kultura kosmatog korijenja pokazala se vrlo efikasnom budući da su genetički stabilnije od staničnih suspenzija, te zbog sposobnosti rasta na mediju bez dodataka hormona. Također su učinjena i velika postignuća u transformaciji medicinskih biljaka kao što je prizvodnja lijekova, alkaloida, polifenola, terpenoida. Nadalje velika postignuća zabilježna su u regeneraciji biljaka otpornih na herbicide, nametnike i bolest (Bajaj 1999). Mason i sur (1992) ističu važnost proizvodnje cjepiva u transgenim biljkama pomoću expresije stranih proteina koji imaju farmaceutsku važnost.

1.5. CILJ RADA

Cilj ovog rada je odrediti učinak inducibilne ekspresije gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-kriptogein, na oksido/antioksidativni status kosmatog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth.).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije i otopine

Za određivanje količine H_2O_2, TBARS-a, te aktivnosti katalaze i gvakjakol-peroksidaze koristili smo slijedeće kemikalije i otopine:

- Aceton, 80%
- Titanov reagens (komercijalni reagens)
- NH_4OH, 25%
- H_2SO_4, 2M
- H_2O_2, 30%
- Trikloroctena kiselina (TCA), 0.1%
- Reagens za određivanje količine malondialdehida: 0.5% tiobarbituratna kiselina (TBA) u 20% trikloroctenoj kiselini (TCA)
- 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), 1mM EDTA
- Polivinil-polipirolidon (PVPP)
- Pufer za mjerenje aktivnosti GPOD ili POX: 50 mM KP-pufer (pH 7.0), 18 mM gvajakol, 5 mM H_2O_2
- Pufer za mjerenje aktivnosti KAT: 50 mM KP-pufer (pH 7.0), 10 mM H_2O_2
- Bradford reagens: 100 mg Coomassie briljant plavo G-250, 50 ml 95% etanola, 100 ml 85% fosforne kiseline, nadopuniti dH_2O do 1 l
- Albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA), 1 mg ml^{-1}

2.1.2. Uređaji

Za održavanje kulture kosmatog korijenja, određivanje količine H_2O_2, TBARS-a, aktivnosti katalaze i gvajakol-peroksidaze koristili smo slijedeće uređaje:

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

2.1.3. Biljni materijal

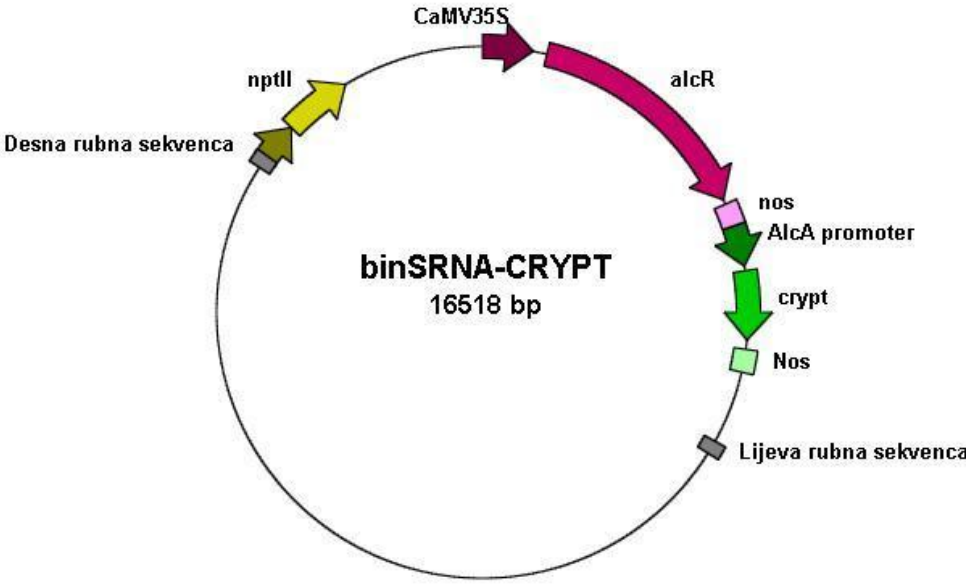
U istraživanju smo koristili transgeno korijenje vrste *Coleus blumei* Benth. iz porodice *Lamiaceae* (Slika 2). Šareni hibrid ukrasne koprive korišten za genetičku transformaciju uzgajan je *in vitro*. Genetička transformacija lisnih eksplantata ukrasne koprive izvedena je pomoću bakterije *A. rhizogenes*, 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 3). U odnosu na sekvencu prirodnog *crypt* gena, promijenjena je nukleotidna sekvenca sintetiziranog *crypt* gena tako da uključuje restrikcijska mjesta, dok aminokiselinski slijed elicitora nije promijenjen.

Transformacija ukrasne koprive i indukcija dlakavog korijenja obavljena je prema Bauer i sur. (2002). Lisni eksplantati veličine 1 cm^2 su inkubirani u suspenziji agrobakterije *A. rhizogenes*, kako bi se oštećene stanice na rezanim površinama transformirale. Nakon inkubacije lisni eksplantati su kultivirani na krutom MS hranjivom mediju bez hormona tijekom 2 tjedna, nakon čega na rubovima eksplantata izraste transgeno korijenje. Izrezano korijenje dužine 0.5 cm preneseno je na na kruti MS medij na 25 °C u tamu. Kako bi se eliminirala kontaminacija agrobakterijama korijenje je određeno vrijeme raslo na MS podlozi koja sadrži kanamicin.

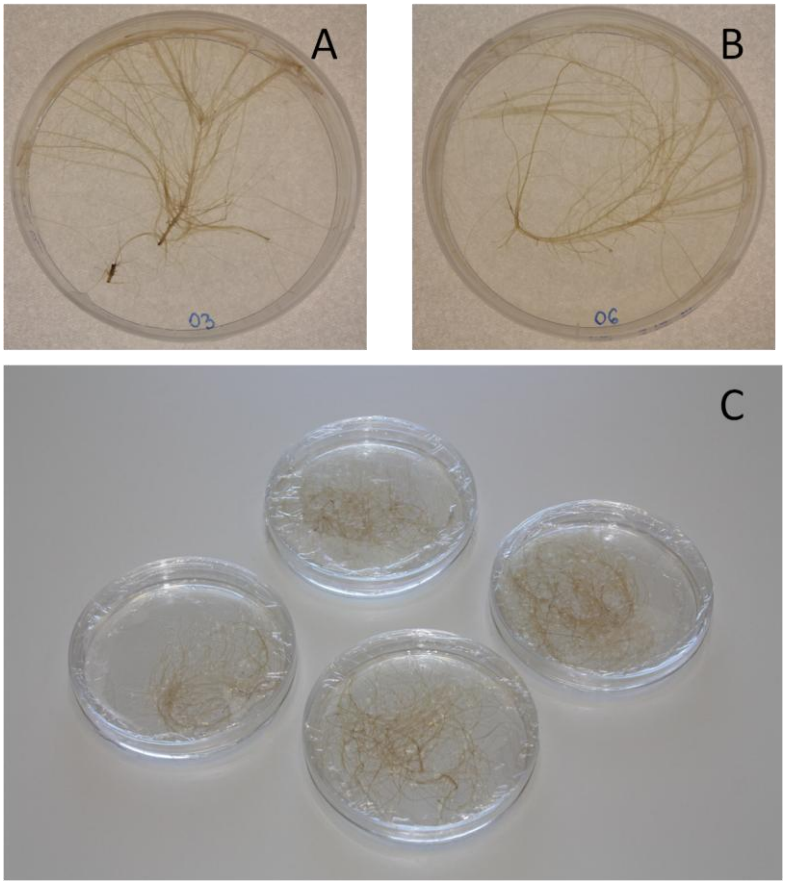
Za istraživanje antioksidativnog statusa odabrali smo dvije linije transgenog korijenja, liniju O3 i liniju O6 (Slika 4). PCR analizom (Vuković i sur, neobjavljeno istraživanje) je potvrđeno da ispitivane transgene linije O3 i O6 sadrže *crypt* i *orf* gen. RT-PCR-om je potvrđeno postojanje *crypt* transkripta, te je bioinformatičkim predikcijskim programima pokazano moguće izlučivanje endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina izvan stanice (Vuković i sur, neobjavljeno istraživanje).



Slika 2. Ukrasna kopriva *Coleus blumei* (Benth.). (Fotografirala Rosemary Vuković).



Slika 3. Binarni transformacijski vektor - pBinSRNA-CRYPT. Izvor: Vuković, R.



Slika 4. Uzgoj kosmatog korijenja ukrasne koprive na krutoj hranjvoj podlozi (A - linija O3; B - linije O6) i na tekućoj hranjvoj podlozi (C). (Fotografirala Rosemary Vuković).

2.1.4. Hranjive podloge

Transgeno korijenje ukrasne koprive je uzgajano na krutoj i tekućoj hranjivoj Murashige i Skoog podlozi (Murashige i Skoog, 1962; MS), bez dodatka hormona (Tablica 1). U krutu hranjivu podlogu je dodan agar. Nakon pripreme medija potrebno je podesiti pH na 5.7. Hranjivi medij se sterilizira 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
$CaCl_2 \times 2H_2O$	755
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Mikroelementi	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \times H_2O$	16.9
$ZnSO4 \times H_2O$	8.6
Kl	0.83
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0.25
$CuSO4 \times 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0.025
$FeSO4 \times 7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	37.3
Organski dodaci	
Myo-inositol	100.0
Nikotinska kiselina	1
Thiamin HCl	10
Pyrodoxin-HCl	1
Glicin	2.0
Saharoza	20000

2.2. Metode

2.2.1. Kultura biljnog tkiva

Transgeno korijenje ukrasne koprive smo uzgajali u Petrijevim zdjelicama na tekućoj i krutoj MS hranjivoj podlozi u tami, u inkubatoru na temperaturi od 28 °C i 25 °C. Kuluru transgenog korijenja na krutoj podlozi smo održavali subkultiviranjem svakih 6 tjedana, dok smo kulturu na tekućoj podlozi presađivali svaka 2 tjedna na svježi medij. Tijekom uzgoja korijenja na tekućoj podlozi potrebno je jednom dnevno promješati sadržaj u Petrijevci, kako bi se medij dodatno aerirao. Prilikom rada sa tkivom u kulturi potrebno je osigurati sterilne uvjete (presađivanje obavljati u laminaru, koristiti sterilni pribor, posuđe i potrebne otopine).

Za provođenje pokusa, nakon dva tjedna rasta, tkivo je subkultivirano na 8 ml svježeg tekućeg MS hranjivog medija, te je 4. dan tretirano različitim koncentracijama etanola (0.1% i 1%). Kontrolno tkivo je tretirano odgovarajućom količinom sterilne dH_2O. Upotreba inducibilnih promotora omogućila nam je da jednu transgenu liniju možemo koristiti i kao negativnu kontrolu i kao eksperimentalnu liniju, te se na taj način umanjuje problem koji može nastati zbog varijacije u klonovima. U eksperimentu smo koristili dvije transgene linije, liniju O3 i liniju O6. Svaka linija predstavlja različiti transformacijski događaj. Tkivo je za analize uzorkovano neposredno prije tretmana etanolom, zatim 3., 7. i 14. dan nakon indukcije etanolom. Nakon uzorkovanja, tkivo je od ostatka medija dobro oprano u dH_2O, te posušeno pomoću papirnatog ubrusa.

2.2.2. Određivanje količine H_2O_2

Količina H_2O_2 u transgenom tkivu je određena metodom po Mukherejee i Choudhouri (1983). Nakon što smo tkivo usitnili u tarioniku pomoću tekućeg dušika, u tubicu smo odvagali oko 0.2 g usitnjenog tkiva te H_2O_2 ekstrahirali pomoću 1 ml ledeno-hladnog acetona. Slijepa proba sastojala se od 1 ml acetona bez tkiva. Nakon miješanja na vibracijskoj mješalici slijedilo je centrifugiranje 5 minuta pri 6000 g i +4 °C. Dobiveni supernatant odvojili smo u drugu tubicu te mu dodali 400 µl titan-sulfata i 500 µl NH_4OH (konc.). Dodatkom titan-sulfata i NH_4OH dolazi do egzotermne reakcije prilikom koje nastaje kompleks titan-peroksida. Istaloženi titan-peroksid smo odvojili centrifugiranjem 10 minuta

pri 15000 g i +4 °C, otopili dodavanjem 1 ml 2 M H_2SO_4, te ponovili centrifugiranje. Apsorbanciju supernatanta smo mjerili pri valnoj duljini od 415 nm. Količinu H_2O_2 smo izrazili kao $\mu mol \times g^{-1}$ svježe tvari.

2.2.3. Određivanje količine malondialdehida (MDA)

Razina lipidne peroksidacije (LPO) u transgenom tkivu je određena metodom po Verma i Dubey (2003), mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), i to uglavnom malondialdehida (MDA). Nakon usitnjavanja tkiva u tekućem dušiku, u tubicu smo odvagali oko 0.2 g usitnjenog tkiva te dodali 1 ml 0.1% trikloroctene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja homogenata 5 minuta pri 6000 g na 4 °C, 0.5 ml dobivenog supernatanta je pomiješano sa 1 ml reagensa za određivanja MDA. Kao slijepu probu koristili smo 1.5 ml reakcijske smjese (0.5 ml 0.1% TCA i 1 ml TCA/TBA). Reakcijsku smjesu smo inkubirali 30 min u vodenoj kupelji na 95 °C, nakon čega smo reakciju zaustavili hlađenjem u ledenoj kupelji (10-15 min) i centrifugirali 15 min pri 18 000 g i 4 °C. Odvojenom supernatantu smo izmjerili apsorbanciju pri 532 nm i 600 nm. Apsorbancija pri 600 nm oduzima se od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina lipidnih peroksida je izražena kao TBARS, uglavnom MDA, po g svježe tvari ($nmol \times g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

2.2.4. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Korijenčiće za ekstrakciju ukupnih proteina smo uzorkovali u određenim vremenskim intervalima: prije tretmana etanolom, 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom. Uzorkovane korijenčiće smo dobro oprali u destiliranoj vodi, višak vode pokupili ubrusom, te ih usitnjavali u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinilpolipirolidona (PVPP-a; služi za uklanjanje fenolnih spojeva iz biljnog ekstrakta). Usitnjeno tkivo (oko 0.3 g) vagali smo u tubice te smo proteine ekstrahirali 15 min na ledu uz dodatak 1 ml hladnog pufera za ekstrakciju. Homogenate smo zatim centrifugirali 10 minuta pri 18 000 g i +4 °C. Dobivene supernatante smo prebacili u čiste tubice, čuvali na ledu i koristili za mjerenje aktivnosti enzima i određivanje koncentracije proteina.

2.2.5. Određivanje koncentracije proteina

Sadržaj proteina u tkivnim ekstraktima je određen metodom po Bradfordu (1967). Razrijeđeni proteinski ekstrakt (100 µl) se pomiješa sa 1 ml Bradford reagensa, te inkubira najmanje 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije mjeri se apsorbancija pri 595 nm. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (*Bovin Serum Albumin*, BSA). Na temelju vrijednosti apsorbance poznatih koncentracija BSA se dobiva standardna krivulja iz koje se ekstrapolira koncentracija proteina u uzorku.

2.2.6. Određivanje aktivnosti katalaze (EC 1.11.1.6; CAT)

Aktivnost katalaze je mjerena metodom po Aebi-u (1984). Reakcijski pufer za mjerenje aktivnosti katalaze se sastojao od 50 mM kalij-fosfatnog pufera i 10 mM H_2O_2. Reakciju smo započeli dodavanjem 50 µl uzorka u 1950 µl reakcijske smjese. Pad apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 smo mjerili svakih 10 sekundi tijekom 1 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Specifična aktivnost (SA) CAT izražena je kao promjena apsorbancije po minuti po mg proteina ($\Delta A \times min^{-1} \times mg^{-1}_{proteina}$).

2.2.7. Određivanje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza (gvajakol-peroksidaza, GPOD)

Aktivnost gvajakol peroksidaze je mjerena metodom po Siegel i Galstonu (1967). Reakcijski pufer za mjerenje aktivnosti GPOD sadržavao je 18 mM gvajakola i 5 mM H_2O_2 u KP-puferu. Na 950 µl pufera za mjerenje aktivnosti dodali smo 50 µl uzorka i mjerili apsorbanciju svake sekunde tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 470 nm. Do porasta apsorbancije dolazi uslijed oksidacije gvajakola pri čemu nastaje tetragvajakol. Specifična aktivnost GPOD izražena je kao promjena apsorbancije po minuti po mg proteina ($\Delta A \times min^{-1} \times mg^{-1}_{proteina}$).

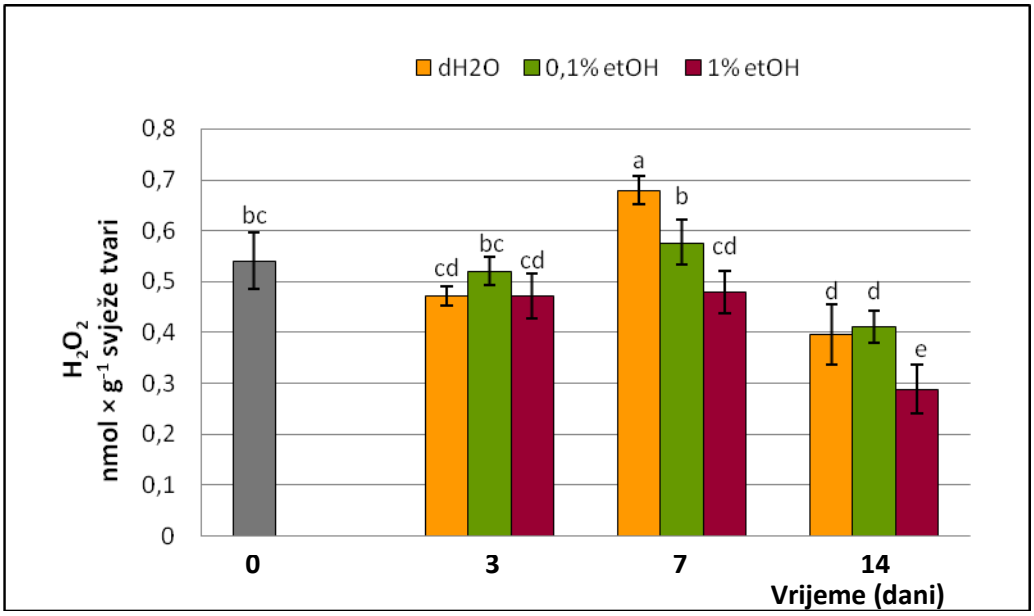
2.3. Statistička obrada podataka

Podatci dobiveni u ovom radu su obrađeni u statističkom programu STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti kontrole i tretmana uspoređene su pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (*one-way* ANOVA), sa Newman-Keuls testom za testiranje razlika između kontrole i tretmana. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

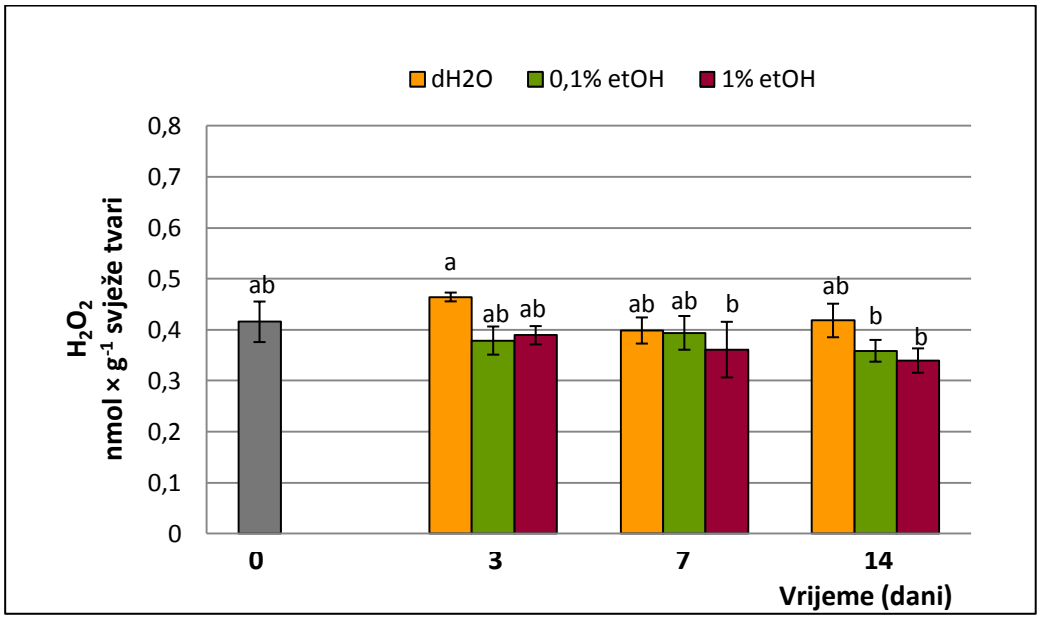
3.1. Količina vodikovog peroksida (H_2O_2) u transgenom korijenju

Treći dan nakon tretmana etanolom kod O3 linije nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom
Tjedan dana nakon tretmana 1%-tnim etanolom količina H_2O_2 opada za 29.54%, dok je kod tretmana 0.1%-tnim etanolom zabilježeno smanjenje koncentracije H_2O_2 za 15.2%, u odnosu na kontrolno korijenje. Dva tjedna nakon tretmana 1%-tnim etanolom kod iste linije transgenog korijenja koncentracija H_2O_2 opada za 27.16% (Slika 5).



Slika 5. Količina H_2O_2, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

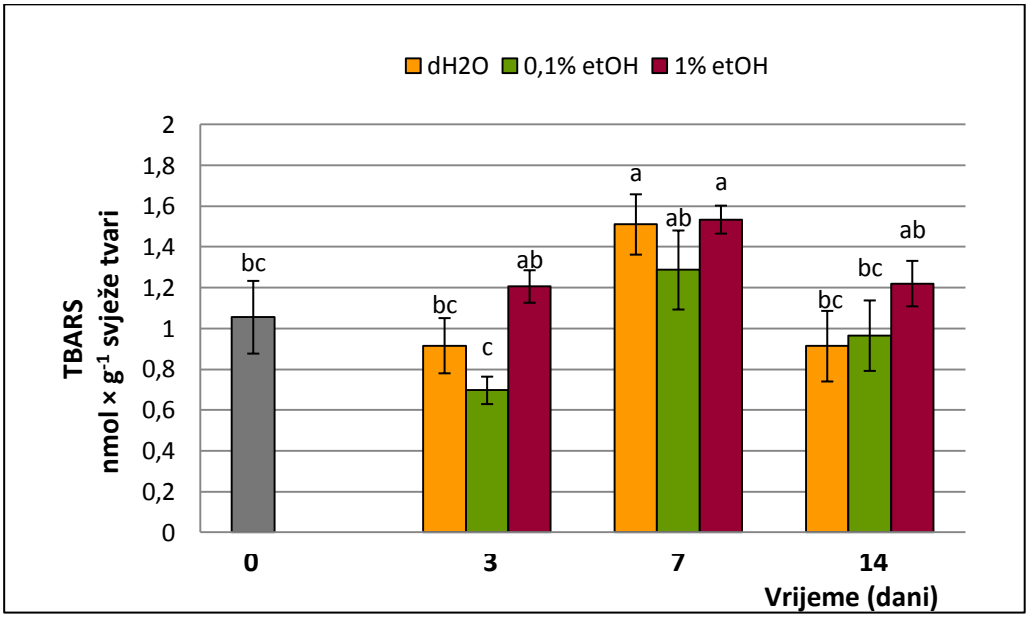
Kod linije O6 transgenog korijenja 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom nisu utvrđene statistički značajne razlike u količinama H_2O_2 između kontrolnog korijenja tretiranog vodom i korijenja tretiranog etanolom (Slika 6).



Slika 6. Količina H_2O_2, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

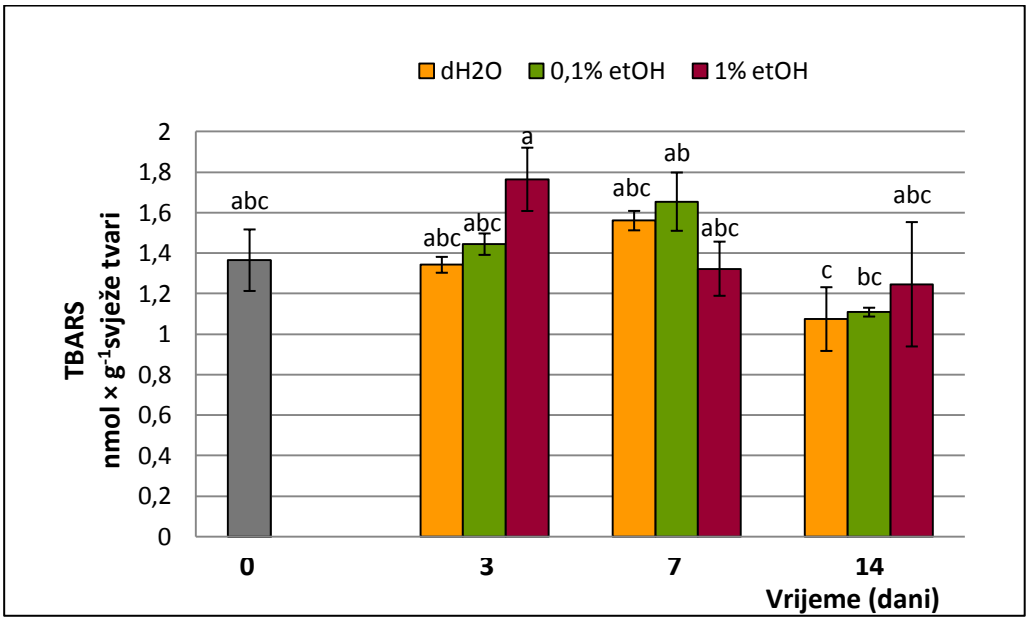
3.2. Količina produkata lipidne peroksidacije u transgenom korijenju

Kod O3 linije transgenog korijenja 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom (Slika 7).



Slika 7. Količina produkata lipidne peroksidacije, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

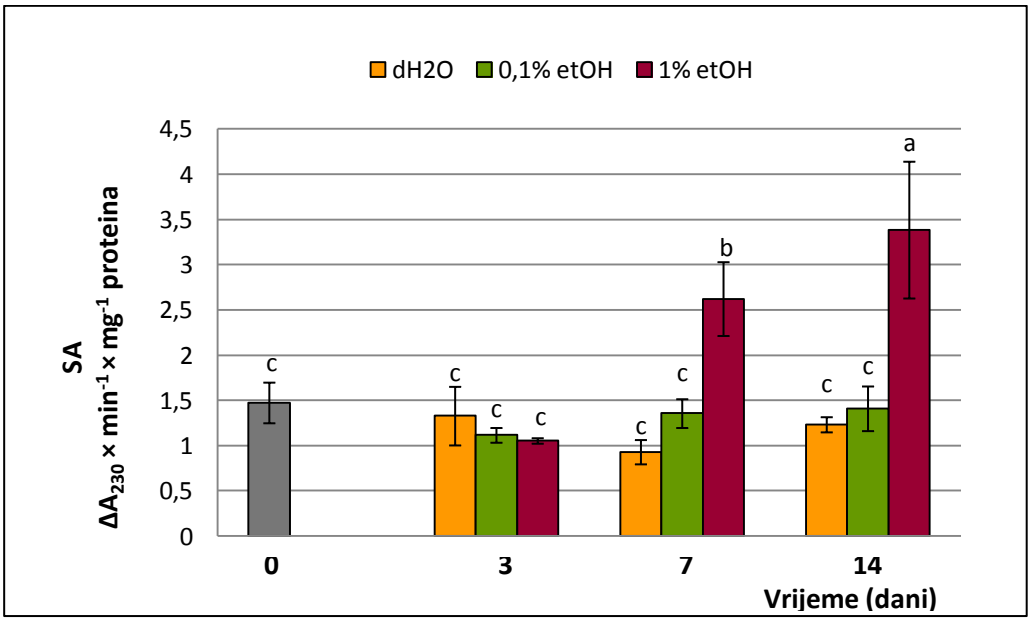
Kod O6 linije transgenog korijenja 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom (Slika 8).



Slika 8. Količina produkata lipidne peroksidacije, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

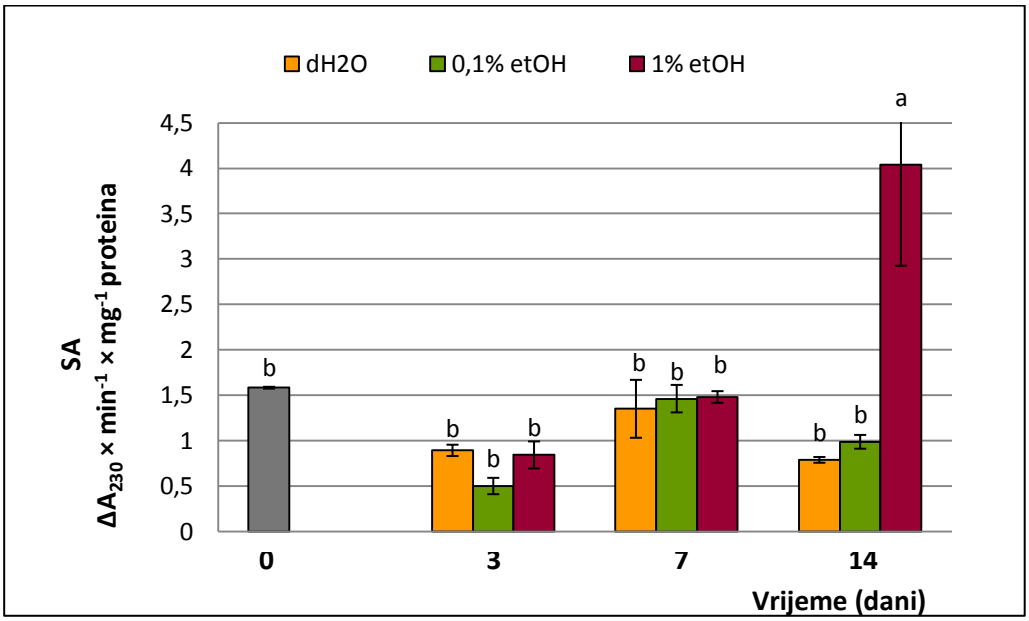
3.3. Aktivnost katalaze (CAT) u transgenom korijenju

Treći dan nakon tretmana etanolom kod O3 linije nema statistički značajnih razlika u aktivnosti CAT između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom. Tjedan dana nakon tretmana etanolom kod iste linije došlo je do značajnog porasta aktivnosti CAT u korijenju tretiranom 1%-tnim etanolom. Aktivnost CAT je u odnosu na kontrolno korijenje porasla za 182%. Dva tjedna nakon indukcije 1%-tnim etanolom aktivnost CAT u tretiranom korijenju bila je povećana za 174.6% odnosu na kontrolno korijenje (Slika 9).



Slika 9. Aktivnost CAT, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

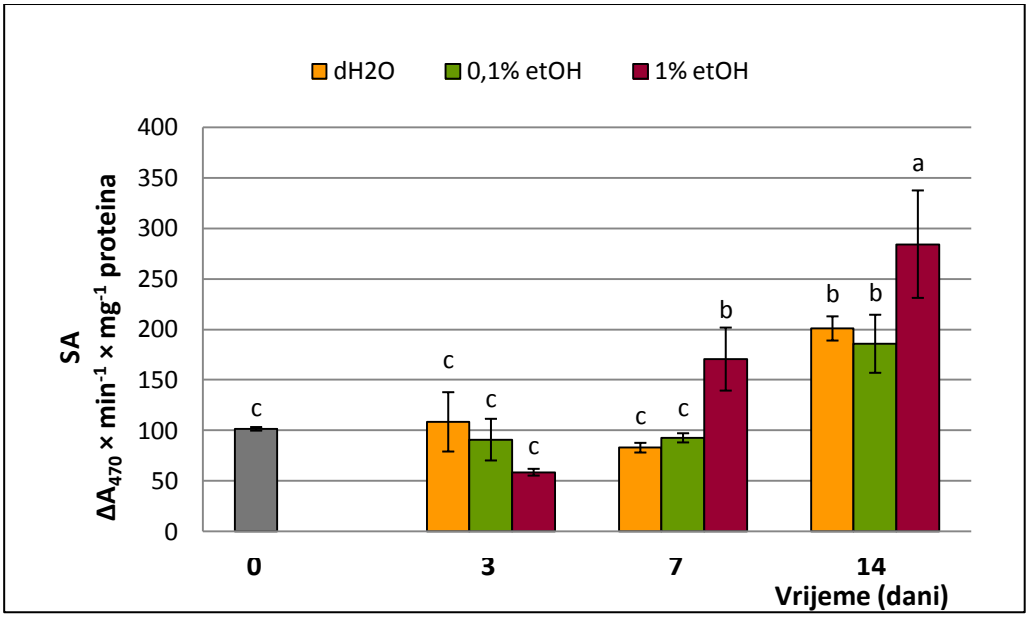
Kod O6 linije, 3. i 7. dan nema statistički značajnih razlika u aktivnosti CAT između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom. Dva tjedna nakon indukcije 1%-tnim etanolom kod iste linije zabilježen je porast aktivnosti za 413% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 10).



Slika 10. Aktivnost CAT, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

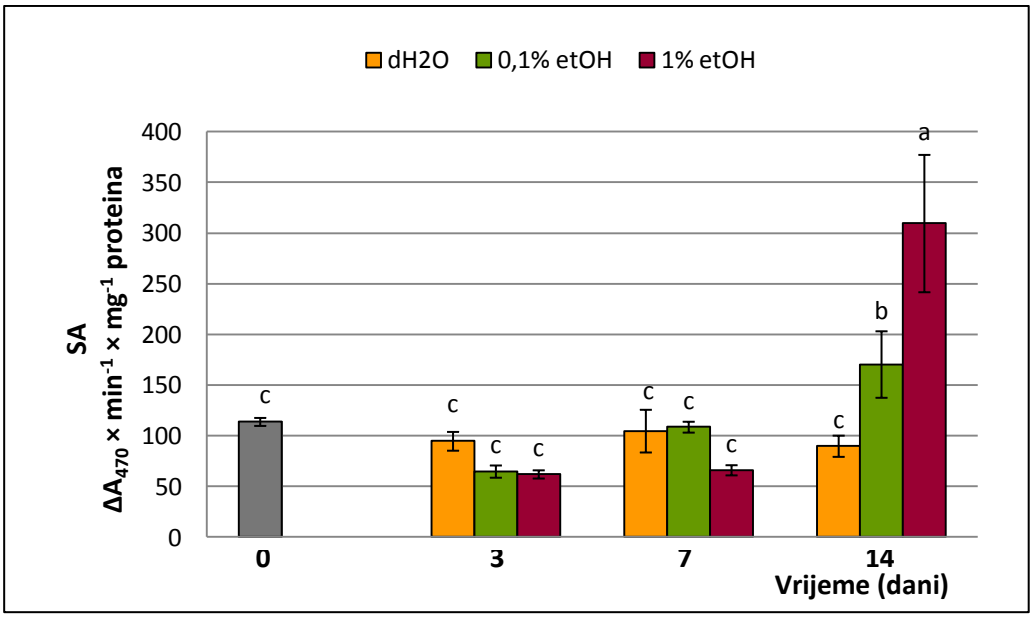
3.4. Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOD) u transgenom korijenju

Treći dan nakon tretmana etanolom kod O3 linije nema statistički značajnih razlika između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom. Tjedan dana nakon tretmana etanolom kod iste linije došlo je do značajnog porasta aktivnosti GPOD u korijenju tretiranom 1%-tnim etanolom. Aktivnost GPOD je u odnosu na kontrolno korijenje porasla za 105.8% (Slika 5). Dva tjedna nakon indukcije 1%-tnim etanolom aktivnost GPOD je u tretiranom korijenju bila povećana za 41.5% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 5).



Slika 11. Aktivnost GPOD, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

Treći dan nakon tretmana etanolom kod O6 linije nema statistički značajnih razlika između kontrolnog korijenja (tretiranog vodom) i korijenja tretiranog etanolom. Također, niti tjedan dana nakon tretmana etanolom kod iste linije i dalje nisu uočene statistički značajne razlike. Dva tjedna nakon indukcije 1%-tnim etanolom zabilježen je porast aktivnosti GPOD za 244% u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 6).



Slika 12. Aktivnost GPOD, u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O6), prije indukcije (0. dan), te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije 0.1 i 1%-tnim etanolom (etOH). Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Budući da patogeni uzrokuju velike gubitke u poljoprivrednoj proizvodnji, te da su za njhovo suzbijanje ponajprije korištena kemijska sredstva, mnogi autori kao alternativu predlažu biološke kontrolne metode kako bi se smanjio utjecaj pesticida na okoliš (Suzuki i sur, 2005; Verhagen i sur, 2006; Buonaurio i sur, 2009). Kao odgovor na napad patogena aktivira se inducirana otpornost na bolesti, te predstavlja alternativu za zaštitu bilja jer se temelji na aktivaciji mehanizma otpornosti i učinkovita je protiv širokog spektra biljnih patogena (Van der Enti sur, 2008). Ova spoznaja je od velikog značaja stoga što iskorištavanje jedinstvenog potencijala biljke da se bori protiv patogena može umanjiti korištenje toksičnih kemikalija u kontroli bolesti, te predstavlja ekološki prihvatljiv pristup zaštite. Unatoč velikom broju biotičkih i abiotičkih elicitora za induciranje otpornosti biljke prema patogenim infekcijama, samo neki od njih su u praksi korišteni za zaštitu. Induciranje proizvodnje elicitora u transgenim biljkama dovodi do aktiviranja obrambenih mehanizama i rezultira smrću stanice, što pokazuje da inducirana i lokalizirana proizvodnja elicitora u biljkama predstavlja vrlo moćan alat za izazivanje HR (McNellis i sur, 1998). Ovi lokalni odgovori često izazivaju nespecifičnu otpornost biljke poznatu kao SAR, pružajući biljci trajnu zaštitu protiv širokog raspona patogena (Van Loon, 1997). Beta-kriptogein, korišten u ovom istraživanju, inducira HR (Ricci i sur, 1989; Binet i sur, 2001) i SAR (Keller i sur, 1996) u kulturi stanica biljke duhana.

Strategija stvaranja transgenih biljaka koje proizvode elicitore kao odgovor na infekciju patogenom, temelji se na pretpostavci da percepcijski sustav biljke prepoznaje elicitor, te da odmah nakon napada virulentnog mikroorganizma dolazi do aktiviranja HR (Keller i sur, 1999). Tepfer i suradnici (1998) su razvili transgene biljke duhana koje eksprimiraju gen koji kodira β-kriptogein.

U ovom istraživanju uzgojili smo transgeno korijenje *C. blumei* u kojem se sintetički gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog alkoholnog promotora. Upotrebom alkoholnog promotora može se kontrolirati vrijeme i razina ekspresije *crypt* gena. Nadalje, upotrebom inducibilnih promotora se mogu izbjeći štetni učinci koje često uzrokuje konstitutivna ekspresija gena (Hammond-Kosack i sur, 1994). Kako β-kriptogein uzrokuje stvaranje HR-a, koji može dovesti do stanične smrti, njegovu je ekspresiju nužno kontrolirati (Keller i sur, 1999). Upotreba inducibilnih promotora u genetičkom inženjerstvu omogućila je korištenje jedne transgene linije i kao negativne kontrole (tkivo tretirano vodom, kod kojeg nema

indukcije *crypt* gena) i kao eksperimentalne linije (tkivo tretirano etanolom koji inducira ekspresiju *crypt* gena), te se na taj način uklanja problem koji može nastati zbog varijacije u konovima. Sintezom *β*-kriptogeina dolazi do aktiviranja obrambenih odgovora u biljci, čime se oponaša napad patogena. Elicitini se danas sve češće koriste u jednostavnim eksperimentalnim sustavima za proučavanje molekularnih mehanizama obrambenog odgovora (Suzuki, 1999).

Prema Radman i suradnicima (2003) nakon tretmana biljke ili kulture biljnih stanica elicitorima, inducira se proizvodnja ROS-a kao što su superoksidni anioni i H_2O_2. Viard i suradnici, (1994) u svojim istraživanjima ističu kako 60 min nakon tretmana kulture stanica duhana kriptogeinom, dolazi do brze proizvodnje ROS-a. Biokemijski mehanizmi na kojima se temelji indukcija zaštite duhana tretiranog sa *β*-kriptogeinom uključuju oksidacijski stres (Rusterucci i sur, 1996; Simon-Plas i sur, 1997). Sinteza ROS-a predstavlja jedan od najranijih obrambenih odgovora biljke na napad patogena. Međutim, uslijed nakupljanja ROS-a u stanicama može doći do oksidacijskog stresa a time i do oštećenja lipida, proteina i DNA. Kako bi odredili utjecaj endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina na pojavu oksidacijskog stresa u transgenom tkivu mjerili smo količinu MDA i količinu H_2O_2. Rezultati mjerenja ova dva pokazatelja su potvrdili odsutnost oksidacijskog stresa u tkivu koje je bilo tretirano 0.1 % i 1%- tnim etanolom. Iz navedenog možemo zaključiti da genetička elicitacija *β*-kriptogeinom ne uzrokuje oštećenja koja mogu nastati uslijed oksidacijskog stresa. Razlog ovome mogu biti povećane aktivnosti antioksidativnih enzima.

Smatra se da je H_2O_2 kao lako mjerljivi parametar, proizveden tijekom oksidativnog stresa povezan sa obranom od patogena (Dorey i sur, 1999). Rusterucci i suradnici (1996) su u svojim istraživanjima kulture stanica duhana pokazali korelaciju između oksidativnog stresa induciranog kriptogeinom i sposobnosti kriptogeina da inducira HR kod lista duhana. Ovi autori predlažu da je H_2O_2 nastao tijekom oksidativnog stresa neophodan za povećanje stanične smrti inducirane elicitorom. U ovom istraživanju kod O3 linije transgenog korijenja 7. dan nakon tretmana 0,1% i 1% etanolom zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije H_2O_2 u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 5). Nadalje, u našim rezultatima dva tjedna nakon indukcije 1%-tnim etanolom kod obje ispitivane linije došlo je do značajnog smanjenja koncentracije H_2O_2 u odnosu na kontrolno korijenje (Slike 5 i 6).

Lipidna peroksidacija se koristi kao pokazatelj oksidativnog stresa u stanicama i tkivima biljaka i životinja. Jedan od najčešće korištenih pokazatelja u svrhu procjene učinka oksidativnog stresa na lipide je mjerenje akumulacije MDA, najobilnijeg prirodnog produkta lipidne peroksidacije. Peever i Higgins (1989) pokazali su u svojim istraživanjima kako je

lipidna peroksidacija indikator oksidativnog stresa nastalog nakon tretmana elicitorima. Stallaert i suradnici (1995) istraživali su različite odgovore kod biljke duhana do kojih dolazi nakon tretmana kriptogeinom. Njihova zapažanja dovela su ih do zaključka da kod lista duhana tretiranog kriptogeinom dolazi do pojave lipidne peroksidacije.

Naši rezultati (Slike 7 i 8) pokazuju da 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom kod obje linije (O3 i O6) nije došlo do značajnog povećanja količine produkata lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolno tkivo, što je vjerojatno posljedica povećane aktivnosti antioksidativnih enzima CAT i GPOD. Prijašnja istraživanja pokazala su kako lipidna peroksidacija nastala kao posljedica stvaranja ROS-a kod biljaka duhana tretiranih kriptogeinom, ima vrlo bitnu ulogu u stimulaciji stanične smrti (Montillet i sur, 2005).

Kako bi spriječile štetne učinke ROS-a biljke su razvile antioksidacijske obrambene mehanizme koji uključuju indukciju antioksidacijskih enzima. Jedna od najvažnijih značajnih promjena u fiziologiji zaražene biljke je promjena u aktivnosti antioksidacijskih enzima koji su uključeni u obrambeni mehanizam protiv infekcije patogenom. Unutarstanična koncentracija H_2O_2 regulirana je različitim enzimima, od kojih su najvažnije katalaze (Willekens i sur, 1997) i nespecifične peroksidaze. Dosadašnja istraživanja ukazala su na povećanje aktivnosti CAT nakon inokulacije biljke duhana sa gljivicom *Erysiphe cichoracearum* (Lebeda i sur, 1999). U našem istraživanju tjedan dana nakon tretmana 1%-tnim etanolom kod O3 linije je došlo do značajnog povećanja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom (Slika 9). Rezultati pokazuju da je dva tjedna nakon tretmana 1%-tnim etanolom došlo do značajnog povećanja aktivnosti CAT kod obje ispitivane linije transgenog korijenja u odnosu na kontrolno tkivo (Slike 9 i 10). Povećanje aktivnosti CAT posljedica je indukcije *crypt* gena 1%-tnim etanolom. Također naši rezultati pokazuju da se najveća zabilježena aktivnost CAT (Slike 9 i 10) u negativnoj korelaciji sa smanjenjem koncentracije H_2O_2 (Slike 5 i 6). Peroksidaze su također jedne od najvažnijih enzima uključenih u metaboliziranje H_2O_2 nastalog tijekom oksidativnog stresa uzrokovanog odgovorom biljke na napad patogena. Ryals i suradnici (1996) su pokazali su važnost uloge peroksidaza u obrambenim odgovorima biljke na napad patogena. U našem istraživanju najveća aktivnost GPOD zabilježena je dva tjedna nakon indukcije 1 %-tnim etanolom, kod obje linije transgenog korijenja (Slike 11 i 12). Ovaj podatak je vrlo bitan jer ukazuje na to da se nakon indukcije sintetičkog *crypt* gena 1%-tnim etanolom povećava aktivnost GPOD što je u korelaciji sa podacima iz literature, gdje se pokazalo kako se aktivnost enzima peroksidaze inducira elicitorima i povezana je sa putevima biljne obrane (Gómez-Vásquez, 2004). Najveća zabilježena aktivnost GPOD (Slike 11 i 12) podudara se sa smanjenjem koncentracije H_2O_2

(Slike 5 i 6). Tjedan dana nakon tretmana etanolom kod O3 linije transgenog korijenja aktivnost GPOD se značajno povećala, dok se kod O6 linije nije došlo do promjene u odnosu na kontrolu. Razlike u odgovoru na indukciju etanolom između linije O3 i O6 su se mogle očekivati budući da se radi o dva neovisna transformacijska događaja.

U posljednih nekoliko godina mnogo truda uloženo je u identifikaciju potencijalnih ciljnih gena zbog upotrebe u genetičkom inženjerstvu, u svrhu razvijanja otpornosti na abiotički i biotički stres. Kako bi se povećala tolerancija na oksidativni stres, velik broj istraživanja je usmjeren prema konstruiranju transgenih biljaka koje eksprimiraju različite antioksidacijske enzime. Kwon i suradnici (2002) u svojim istraživanjima ističu kako su transgene biljke duhana kod kojih je u kloroplastima došlo do ekspresije CuZnSOD and APX, pokazale povišenu toleranciju na oksidativni stres induciran metil-viologenom (MV), herbicidom koji inducira stvaranje ROS-a. Nadalje Lee i suradnici (2007) su u svojim istraživanjima dizajnirali transgene biljke duhana kako bi poboljšali toleranciju biljke na oksidativni stres. Njihovi rezultati jasno pokazuju kako se manipulacijom antioksidativnim mehanizmima u kloroplastima biljne stanice mogu zaštiti od različitih stresova prisutnih u okolišu. Prema našim rezultatima, genetičkom elicitacijom *β*-kriptogeinom se postiže povećanje ekspresije antioksidativnih enzima i u skladu s time dolazi do smanjenja oksidacijskog stresa. Stoga bi inducibilna ekspresija gena *crypt* mogla biti dobra strategija u obrani biljaka od patogena i drugih okolišnih stresova.

5. ZAKLJUČCI

- Mjerenje parametara oksidativnog stresa (H_2O_2 i MDA) je pokazalo kako genetička elicitacija *β*-kriptogeinom ne uzrokuje oštećenja koja mogu nastati uslijed oksidacijskog stresa.

- Inducibilna ekspresija gena *crypt* uzrokuje povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima – katalaze i gvajakol-peroksidaze kod obje linije transgenog korijenja (O3 i O6).

- Povećana aktivnost antioksidativnih enzima regulira količinu H_2O_2 u tkivu te spriječava lipidnu peroksidaciju tkiva.

- Veća koncentracija etanola rezultira većim antioksidativnim odgovorom zbog jače indukcije ekspresije gena *crypt*.

6. LITERATURA

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121-126.

Alerts RJ, Gist D, Carols ED, Luca VD, Baumann TW. 1994. Methyl jasmonate vapor increase the developmentally controlled synthesis of alkaloids in Cartharanthus and Cinchona seedlings. *Plant J* 5:635–643.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002 . Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:1331-134.

Anderson A, Moore L. 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium. Phytopathology* 69:320-323.

Apostol I, Heinstein PF, Low PS. 1989. Rapid induction of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology* 90:109–116.

Bahadur A, Singh UP, Sarma BK, Singh DP, Singh KP, Singh A. 2007. Foliar application of plant growth-promoting Rhizobacteria increases antifungal compounds in Pea (*Pisum sativum*) against *erysiphe pisi*. *Mycobiology* 35:129-134.

Bajaj YPS, Ishimaru K. Genetic transformation of medicinal plants. 1999., In: Bajaj YPS (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Medicinal Plants. Vol 45, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp 1-19.

Basse CW, Fath A, Boller T. 1993. High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *J Biol Chem* 268:14724-14731.

Binet M-N, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A. 2001. Disruption of Microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in Tobacco cells. *Plant Physiology* 125:564-572.

Bindschedler LV, Dewdney J, Blee K A, Stone J M, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies D R, Ausubel F M, Bolwell G P. 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal* 47:851-863

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

Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein J-P, Ricci P. 1995. Acquired resistance triggered by elicitins in tobacco and other plants. *Eur J Plant Pathol* 102:181-192.

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. *Journal of Experimental Botany* 53:1367-1376.

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

Bradford MM. 1976. A rapidand sensitive method for the quantification of microgram quantitea of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Breusegem F V, Dat J F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141:384-390.

Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LMA, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433:629-633.

Buonaurio R, Iriti M, Romanazzi G. 2009. Induced resistance to plant diseases caused by Oomycetes and Fungi. *Petria* 19:130-148.

Choi H W, Kim Y J, Lee S C, Hong J K, Hwang B.K. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology* 145:890-904.

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

Custers JHH. Harrison V, Sela-Buurlage SJ, van Deventer MB, Lageweg E, Howe WPW. 2004. Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *Plant Journal 39*:147–160.

Davies KJA. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50:279–289.

Davies DR, Bindschedler LV, Strickland TS, Bolwell GP. 2006. Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1817-1827.

Di Cagno R, Guidi L, De Gara L, Soldatini GF. 2001. Combined cadmium and ozone treatments affects photosynthesis and ascorbatedependent defences in sunflower, *New Phytol* 151:627–636

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, cosio EG. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.*, 148:1-36.

Fefu S, Bouaziz S, Heut J.C, Pernollet J.C, Guittet E. 1997. Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, and beta elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea. Protein Science* 6:2279-2284.

Flipphi M, Kocialkowska J, Felenbok B. 2002. Characteristics of physiological inducers of the ethanol utilization (alc), pathway in *Aspergillus nidulans. Biochem. J* 364:25-31.

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.

Gara LD, Pinto MC , Tommasi F. 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:863-870.

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. *MPMI* 19:711-724.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stresstolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930

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

Göbel C, Feussner I, and Roshal S. 2003. Lipid peroxidation during the hypersensitive response in Potato in the absence of 9-Lipoxygenases. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:52834–52840.

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. *Annals of Botany* 94:87-97

Grant JJ, and Loake GJ. 2000. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiology* 124:21-30.

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. *The Plant Journal* 23:441-450.

Gundlach H, Miller M, Kutchan TM, Zenk MH. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *PNAS* 89:2389–2393.

Gutteridge JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41:1819-1828.

Halliwell B, Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, andsignificance. *Am J Clin Nutr* 57:715-724.

Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JD. 1994. Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease-resistance gene *Cf-9*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:10445-10449.

Hanania U, Avni A. 1997. High affinity binding site for ethylene inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J* 12:113–120.

Heut JC, Le Caer JP, Nespoulous C, Pernollet JC. 1995. The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytophatpgenic fungus *Pythium vexans. Mol Plant Microbe Interact* 8:302-310.

Huet JC, Pernollet JC. 1989. Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitin family, and its comparison to cryptogein and capsicein. *FEBS Letters* 257:302-306.

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.

Holopainen JK, Heijari J, Nerg AM, Vuorinen M, Kainulainen P. 2009. Potential for the use of exogenous chemical elicitors in disease andinsect pest management of conifer seedling production. *Open. For. Sci. J*. 2:17-24.

Jiang D, Guo Z, Chen X, Cheng Z, Zheng Z. 2004. Study on tobacco disease resistances mediated by the elicitor gene *cryptogein* from *Phytophthora cryptogea. Chin J Agr Biotechnol* 1:125-131

Jwa N, Agrawal GK, Tam ogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R. 2006. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol and Biochem* 44:261–273.

Kamoun S, Klucher KM, Coffey MD, and Tyler BM. 1993. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:573-581.

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

Keller T, Damude HG, Werner D, Doemer P, Dixon RA, Lamb C. 1998. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca2+ binding motifs. *Plant Cell* 2:255-66.

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R,Verrier J-L, Roby D and Ricci P. 1999. Pathogen induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell.* 11:223-235.

Kulumburg P, Judewicz N, Mathieu M, Lenouvel F, Sequeval D, Felenbok B. 1992. Specific Binding Sites for the Activator Protein, ALCR, in the alcA Promoter of the Ethanol Regulon of *Aspergillus niduluns. The journal of Biological Chemistry* 267:21146-21153.

Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS .2002. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25:873–882.

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.

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

Lebrun-Garcia A, Bourque S, Binet MN, Ouaked F, Wendehenne D, Chiltz A, Scha¨ffner A, Pugin A. 1999. Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses: analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie* 81:1–6.

Legendre L, Rueter S, Heinstein PS Low PS. 1993. Characterisation of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiology 102*:233–240.

Li WX, Kodama O, Akatsuka T. 1991. Role of oxygenated fatty acids jn rice phytoalexin production. *Agric Biol Chem* 55:1041-1047.

Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. 1992. Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11745–11749.

Mathieu Y, Kurkdjian A, Xia H, Guern J, KoUer A, Spiro MD, O'Neill MM, Albersheim P, Darvill A. 1991. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J*. 1:333-343.

McNellis TW, Mugett MB, Li K, Aoyama T, Horvath D, Chua N-H, Staskawicz BJ. 1998. Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic Arabidopsis induces hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 14:247–257.

Mendoza M. 2011. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotecnología Vegetal* 11:67-75.

Montillet JC, Chamnongpol S, Rustérucci C, James Dat, van de Cotte B, Agnel JP, Battesti C, Inzé D, Van Breusegem F, and Triantaphylidès C. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H_2O_2 in the execution of hypersensitive cell death in Tobacco leaves. *Plant Physiol* 138:1516–1526.

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 Plantarum* 58:166-170.

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 49:249–279.

Nürnberger T. 1999. Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55:167-182.

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

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

Ohta H, Shida K, Peng YL, Furusawa I, Shishiyama J, Aibara S, Morita Y. 1991. A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiol* 97:94–98.

Panozzo C, Capuano V, Fillinger S, Felebok B. 1997. The zink binucelar cluster activator alcR is able to bind to single sites, but requires multiple repeated sites for synergistic activation of the alcA gene in Aspergillus nidulans. *J Biological Chemistry* 272:22859-22865.

Peng M and Kuc J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696–699.

Penell RI, Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9:1157-1168.

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 Physiology* 90:867-875.

Picard K, Ponchet M, Blein JP, Rey P, Tirilly Y, and Benhamou N. 2000. Oligandrin: a proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol* 124**:**379-395.

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.

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? *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 56:1020–1047.

Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122:1119–1128.

Radman R, Saez, T, Bucke C, Keshavarz T. 2003. Elicitacion of plant and microbial cell systems. *Biotechnology Applied Biochemistry* 37:91-102.

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

Rusterucci C, Stallaert V, Milat M-L, Pugin A, Ricci P, and Blein J-P. 1996. Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitins in Nicotiana. *Plant Physiol* 111:885–891.

Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylidès C**.** 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* 274:36446–36455.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, and Hunt MD. 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.

Savka M.A, Ravillion B, Noel G.R, Farrand S. 1990. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. *Phytopathology* 80:503‑508.

Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. 1997., In: Scandalios J. G. (ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 343–406.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53:1305-1319.

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

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

Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* 31:137–147.

Sun WH, Duan M, Li F, Shu DF, Yang S, Meng QW. 2010. Overexpression of tomato *tAPX* gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress. *Biol Plantarum* 54: 614-620.

Sutherland MW. 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:79–93.

Suzuki N, Rizhsky L, Linag H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R .2005 . Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol*. 139: 1313-1322.

Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:4158–4163.

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

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *The Plant Journal 11*:1187–1194.

Torres MA, Dangl JL, Jones JDG. 2002. Arabidopsis gp91(phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:517–522.

Torres, MA, Jones, JDG, Dangl, JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141:373–378.

Van Breusegem F, Bailey-Serres J, Mittler R. 2008. Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiology* 147:978-984.

Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF & Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161:405–414.

Van Der Ent S, Koornneef A, Ton J, Pieterse CMJ. 2009. Inducedresistance orchestrating defense mechanisms through cross-talk and priming. *Annual Plant Reviews* 34:334–370.

Van Loon LC. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol* 103:753-765.

Van't Slot KAE, Gierlich A, Knogge W. 2007. A Single Binding Site Mediates Resistance- and Disease-Associated Activities of the Effector Protein NIP1 from the Barley Pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol* 144:1654-1666.

Verhagen BWM, Van Loon LC, Pieterse CMJ, Teixeira da Silva JA. Induced disease resistance signaling in plants. 2006., In: Teixeira da Silva JA (ed.), Floriculture, Ornamental and Plant biotechnology. Advances and topic issues. Vol 3, Global science books, Isleworth, United Kingdom, pp 334-343.

Verma S, Dubey RS. 2003. Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164:645-655.

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.

Weber R.L M, Bodanese‐Zanettini M.H. 2011. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by Agrobacterium rhizogenes‐mediated transformation. *Pesq. agropec. bras.* 46: 1070-1075.

Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W. 1997.Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO Journal* 16:4806–4816.

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

Yu LM. 1995. Elicitins from Phytophthora and basic resistance in tobacco. Proc *Natl Acad Sci U S A* 92:4088-4094.

Yuan YJ, Li C, Hu ZD, Wu JC, Zeng AP. 2002. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of Taxus chinensis var. mairei for taxol production. *Process Biochemistry* 38:193-198.

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* 141:379-383.

Web 1-http://www.icsn.cnrs-gif.fr/spip.php?article579&lang=fr#agro