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

Žulj, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:915778

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

Preddiplomski studij biologije

Martina Žulj

Utjecaj gena *crypt* na ekspresiju izoenzima gvajakol-peroksidaza u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth)

Završni rad

Mentor: prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schön

Osijek, 2016. godina

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

Utjecaj gena *crypt* na ekspresiju izoenzima gvajakol-peroksidaza u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth)

Martina Žulj

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

Kratak sažetak završnog rada: Gvajakol-peroksidaze (GPOD) postoje u brojnim izooblicima, koji igraju važnu ulogu u oksidacijskom stresu kod biljaka. *β*-kriptogein, protein kojeg izlučuje fitopatogena oomiceta *Phytophthora cryptogea* između ostalog u biljaka uzrokuje stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki, te na taj način potiče antioksidacijsku obranu biljke. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj elicitora *β*-kriptogeina na ekspresiju i aktivnost izoenzima GPOD-a u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth). U tu svrhu uzgojena je O3 linija transgenog korijenja koja sadrži gen *crypt* pod kontrolom alkoholnog inducibilnog promotora, tako da je njegova ekspresija inducirana tretmanom s 0,1 i 1%-tnim etanolom. Korijenje je uzorkovano 3., 7. i 14. dan nakon tretmana. U transgenom korijenju ukrasne koprive eksprimiran je jedan izooblik GPOD-a. Inducibilna ekpresija gena *crypt* u transgenom korijenju uzrokuje povećanu aktivnost izoenzima GPOD, jednog od značajnih antioksidacijskih enzima, što upućuje na značajnu ulogu endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina u povećanju antioksidacijskog statusa transgenog korijenja ukrasne koprive.

Broj stranica: 16
Broj slika: 3
Broj tablica: 0
Broj literaturnih navoda: 27
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: gvajakol-peroksidaze, *β*-kriptogein, izoenzimi, transgeno korijenje, *Coleus blumei*

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Influence of *crypt* gene on guaiacol-peroxidase isozyme expression pattern in painted nettle transgenic roots (*Coleus blumei* Benth)

Martina Žulj

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

Short abstract: Guaiacol peroxidases (GPOX) exist in a number of isoforms, which play an important role in the oxidative stress in plants. *β*-cryptogein, a protein secreted by phytopathogenic oomycete *Phytophthora cryptogea* inter alia causes the formation of reactive oxygen species in plants, and thus stimulates the antioxidative defense of the plants. The aim of this study was to investigate the effect of elicitor *β*-cryptogein on the expression and activity of GPOX isoenzymes in transgenic roots of painted nettle (*Coleus blumei* Benth). For this purpose the O3 line of transgenic roots was cultivated containing a gene *crypt* under the control of alcohol inducible promoter so that its expression is induced by treatment with 0.1 and 1% ethanol. The roots were sampled 3, 7 and 14 days after the treatment. In the transgenic roots of painted nettle one GPOX isoform was expressed. Inducible *crypt* gene expression in the transgenic roots caused increased activity of GPOD isoenzymes, one of the major antioxidant enzymes, suggesting an important role of endogenously synthesized *β*-cryptogein in the increase of antioxidant status in transgenic roots of painted nettle.

Number of pages: 16
Number of figures: 3
Number of tables: 0
Number of references: 25
Original in: Croatian

Key words: guaiacol peroxidase, *β*-cryptogein, isozymes, hairy roots, *coleus blumei*

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

Sadržaj:

1. Uvod 1

1.1. Oksidacijski stres 1

1.2. Gvajakol-peroksidaze 1

1.3. Biotički elicitori, *β*-kriptogein 2

1.4. Cilj rada 3

2. Materijali i metode 3

2.1. Kultura biljnog tkiva 3

2.2. Indukcija sinteze *β*-kriptogeina u transgenom korijenju 4

2.3. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina 4

2.4. Određivanje koncentracije proteina 4

2.5. Poliakrilamid gel elektroforeza u nativnim uvjetima (PAG) 5

2.6. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaza na gelu 6

3. Rezultati 6

3.1. Aktivnost izoenzima gvajakol-peroksidaza u transgenom korijenju ukrasne koprive 6

4. Rasprava 7

5. Zaključak 9

6. Literatura 10

1. Uvod

1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je kompleksni kemijski i fizikalni fenomen koji obuhvaća biotički i abiotički stres kod viših biljaka, a nastaje kao rezultat prekomjerne produkcije i akumulacije reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Demidchik 2015). ROS je zajednički naziv koji uključuje slobodne radikale kisika kao sto su superoksidni radikal ($O_2^{\cdot -}$), te neradikalne spojeve ili molekule, kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) i ozon (O_3) (Halliwell 1996). ROS nastaje kao odgovor biljke na napad patogena ili neke druge podražaje iz okoliša, a stvaraju se u obliku nusprodukata raznih metaboličkih puteva. ROS može inaktivirati enzime i nanijeti štetu važnim staničnim komponentama (Arora i sur. 2002) uključujući lipidnu peroksidaciju membranskih lipida i mutaciju DNA. Neke od slabijih reaktivnih jedinki, kao što su superoksidi mogu se transformirati pomoću redoks reakcija s prijelaznim metalima u agresivnije vrste te nanijeti ozbiljnu štetu stanici. Kako bi spriječile nastanak oštećenja stanica, biljke su stvorile antioksidacijski sustav obrane, koji uključuje razne antioksidacijske molekule i enzime. Neenzimski sustav čine antioksidansi kao npr. tokoferoli, antocijanini, flavoni, karotenoidi i askorbinska kiselina, dok enzimski antioksidacijski sustav biljaka čine enzimi kao što su gvajakol-peroksidaze (GPOD), superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APD) i druge nespecifične peroksidaze (Ashraf 2009).

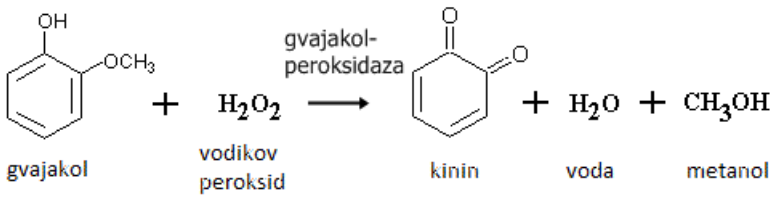
1.2. Gvajakol-peroksidaze

Peroksidaze (POD) su velika skupina enzima koji kataliziraju redoks reakcije između H_2O_2 i različitih reducensa. Nađene su u životinjskim, biljnim te stanicama mikroorganizama i, prema njihovim strukturnim i katalitičkim svojstvima, podjeljene su u tri nadporodice (Hiraga i sur, 2001). Peroksidaze koriste organski supstrat kao donor elektrona kako bi reducirali H_2O_2 uz nastanak vode kao produkta reakcije (jednadžba 1).

$$\boldsymbol{RH_2 + H2O_2 \rightarrow R + H_2O} \qquad (1)$$

Gvajakol-peroksidaze (GPOD, EC 1.11.1.7) pripadaju posljednjoj nadporodici peroksidaza te razredu III biljnih peroksidaza, koje imaju velik broj izooblika i različito reguliranu ekspresiju zbog varijabilnih aminokiselinskih sljedova, što ukazuje na njihovu ulogu u raznim fiziološkim procesima (Hiraga i sur, 2001). Možemo ih naći u različitim dijelovima stanice

kao što su mitohondriji, stanične stijenke, vakuole, Golgijeva tijela, endoplazmatski retikulum, a isto tako i izvanstaničnom prostoru. To su hemoproteini koji uz utrošak H_2O_2 oksidiraju elektron donore kao što su gvajakol i pirogalol (Sharma i sur, 2012) (Slika 1). GPOD su povezane s mnogim esencijalnim procesima stanice i obrani protiv biotičkog i abiotičkog stresa, te proglašene ″enzimima stresa″ (Erofeeva, 2015). U odnosu na CAT, GPOD imaju važniju ulogu u uklanjanu ROS-a zahvaljujući većem afinitetu za H_2O_2 (Gill i Tuteja 2010). One su nužne komponente sustava detoksikacije unutar stanice, koji regulira koncentracije H_2O_2 (Tayefi-Nasrabdi i sur, 2010). Neki GPOD izoenzimi u biljkama inducirani su tijekom ranjavanja i infekcije patogenom, što naglašava njihovu neizmjernu važnost u obrambenom sustavu biljke (Hiraga i sur, 2001). Aktivnost GPOD-a u korelaciji je s biljnom obranom protiv patogena (Jwa i sur. 2006). Osim što sudjeluju u obrani biljke protiv patogena, Hiraga i suradnici ističu kako POD igraju važnu fiziološku ulogu u lignifikaciji i suberizaciji te katabolizmu auksina.



Slika 1. Reakcija katalizirana gvajakol-peroksidazom.

1.3. Biotički elicitori, *β*-kriptogein

Elicitori su jedan od važnih faktora, koji se ponašaju kao prekidač za povećanu sintezu sekundarnih metabolita u kulturi biljnih stanica (Ahmed i Baig, 2013). Pošto imaju ulogu u induciranju odgovora biljke na stres, koriste se u proizvodnji sekundarnih metabolita. Nekoliko parametara, kao što su vrijeme izloženosti elicitoru, starost kulture, regulacija rasta i sastav nutrijenata, bitni utječu na uspješnost elicitacije. Elicitori su s obzirom na njihovo podrijetlo i molekularnu strukturu podijeljeni na biotičke i abiotičke. Biotički elicitori su elicitori biološkog podrijetla (plijesni, bakterije, virusi ili herbivori). Elicitini su porodica malih, visoko konzerviranih proteina (oomicetalni fitopatogeni), koje izlučuju vrste roda *Phytophthora* i *Pythium*. Članovi ove porodice imaju visoki stupanj sličnosti u sekvencama,

ali se razlikuju po svom neto naboju koji ih dijeli u dvije skupine (*α* i *β*-elicitini) (Yu, 1995). *α*-elicitini su vrlo kiseli, dok su *β*-elicitini lužnati sa lizinom na položaju 13.

β-kriptogein je protein od 10-kDa koji pripada porodici *β*-elicitina. Izlučuju ga fitopatogena oomiceta *Phytophthora cryptogea*. Njegova trodimenzionalna struktura određena je pomoću kristalografije i nuklearne magnetske rezonancije (Boissy i sur. 1996). Na jednoj strani ima 5 slabije konzerviranih *α*-petlji, a na drugoj visoko konzerviranu kljunastu strukturu koju oblikuju 2 antiparalelne *β*-ploče i *Ω*-petlje. Glikozilirani heterodimerni proteini smješteni na plazma membrani su receptori za *β*-kriptogein (Bourque i sur. 1999). Jedan od najranijih odgovora na djelovanje kriptogeina je proizvodnja ROS-a. Grant i Loake (2000) ističu kako su istraživanja tijekom oksidacijskog stresa uzrokovanog kriptogeinom pokazala da samo nekoliko minuta nakon napada patogena dolazi do brze proizvodnje ROS-a u biljkama, dok njegova daljnja akumulacija u konačnici uzrokuje smrt stanice.

1.4. Cilj rada

Cilj ovog rada je odrediti utjecaj gena *crypt*, koji kodira oomicetalni elicitor *β*-kriptogein, na ekspresiju i aktivnost izoenzima GPOD-a u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth) metodom poliakrilamid gel elektroforeze u nativnim uvjetima.

2. Materijali i metode

2.1. Kultura biljnog tkiva

Sav laboratorijski pribor i posuđe, otopine i hranjive podloge prethodno su sterilizirane u autoklavu. Tkivo je presađivano u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka, čija je radna površina dezinficirana 70%-tnim etanolom i sterilizirana UV svjetlom. Transgeno korijenje ukrasne koprive uzgajano je u Petrijevim zdjelicama na tekućoj Murashige i Skoog hranjivoj podlozi (Murashige i Skoog, 1962; MS) u inkubatoru u tami pri +28 °C bez dodatka regulatora rasta. Kultura transgenog održavana je subkultiviranjem svaka dva tjedna na svježu podlogu. Opskrbljenost tkiva kisikom osigurana je statičnim uzgajanjem korijenja u malo medija. Tijekom uzgoja sadržaj u Petrijevim zdjelicama potrebno je jednom dnevno promiješati kako bi se dodatno homogenizirao sastav podloge.

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

U istraživanju je korištena jedna linija transgenog korijenja ukrasne koprive, linija O3, koja sadrži gen *crypt* pod kontrolom alkoholnog inducibilnog promotora. Korijenčići su subkultivirani svaka 2 tjedna prije stavljanja u eksperiment. Za provođenje eksperimenta, korijenčići su rasli u dvije faze. Prva faza trajala je dva tjedna i rezultirala rastom korijenčića. Nakon toga su izrasli korijenčići (oko 1 g tkiva) presađeni u 8 mL svježe tekuće MS podloge, čime započinje druga faza rasta, odnosno faza u kojoj se u biotehnologiji inducira sinteza sekundarnih metabolita. Nakon što se prilagodilo hranjivoj podlozi, tkivo je četvrti dan subkulture tretirano etanolom u koncentraciji 0.1% i 1% kako bi se inducirala ekspresija gena *crypt*. Kontrolno je tkivo tretirano odgovarajućom količinom sterilne diH_2O, volumenom koji odgovara volumenu etanola. Za potrebe analize tkivo je uzorkovano neposredno prije tretmana, te 3.,7. i 14. dan nakon tretmana etanolom.

2.3. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Uzorkovani korijenčići oprani su u destiliranoj vodu, posušeni papirnatim ubrusima te usitnjavani u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodani polivnil-polipirolidon (PVPP), koji ima ulogu stabilizatora, tj. veže na sebe fenole i alkaloide iz biljnih tkiva. Nakon usitnjavanja tkivo je vagano u tubice (oko 0.3 g) te su proteini ekstrahirani 15 min na ledu (kako ne bi došlo do denatruacije proteina) uz dodatak 1 mL prethodno ohlađenog pufera za ekstrakciju (100 mM kalij-fosfatni pufer, 1mM EDTA, pH 7.0). Iz dobivenih homogenata proteini su razdvojeni centrifugiranjem 15 min na 22000 g i +4 °C. Metodom dekantiranja dobiveni su supernatanti, koji su prebačeni u nove epice. Nakon kratke pohrane u tekućem dušiku, epice s uzorkom držane su na ledu sve do trenutka njihove upotrebe.

2.4. Određivanje koncentracije proteina

Nakon ekstrakcije, koncentracija proteina u ekstraktima određena je jednom od najčešće primjenjivanih metoda, metodi po Bradfordu. Metoda se temelji na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Anionski oblik boje (plavi) veže se na proteine i maksimalno apsorbira pri valnoj duljini od 595 nm. Pritom nastaje zeleno-smeđe do plavo obojenje. Proteinski ekstrakt (100 µL) razrijeđen je i pomiješan s 1 mL Bradford reagensa (100 mg CBB G-250, 50 mL etanola, 100 mL 85% fosforne kiseline, dH_2O do 1 L) te inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon

inkubacije izmjeren je intenzitet obojenja otopine na spektrofotometru pri valnoj duljini 595 nmm. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (*Bovin Serum Albumin,* BSA) te prema njemu napravljen baždarni pravac iz kojeg su očitane apsorbancije u proteinskim ekstraktima.

2.5. Poliakrilamid gel elektroforeza u nativnim uvjetima (PAG)

Elektroforeza je gibanje čestica u električnom polju, čija pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, svojstvima čestice i sredini u kojoj se te čestice gibaju. U ovom eksperimentu zbog potrebe određivanja aktivnosti GPOD-a primjenjena je nativna elektroforeza kako bi se sačuvala interakcija među proteinskih podjedinica i njihova nativna konformacija. Kod elektroforeze rabe se nosači koji omogućuju razdvojenim komponentama ostati u oštro odvojenim zonama, jer u suprotnom zbog procesa difuzije elektroforetski razdvojene čestice se izmješaju čim prestane djelovanje električnog polja. Kako bi se što uspješnije odvojile sve izoforme GPOD-a u ovom eksperimentu korišeni su poliakrilamidni gelovi (10%-tni gel za razdvajanje i 4%-tni gel za koncentriranje). Za pripremu poliakrilamidnog gela korištene su otopine: 30% akrilamida i bisakrilamida; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10%-tni amonijev persulfat i N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin. Gel za razdvajanje prvi je izliven u kalup za elektroforezu te je nakon njegove polimerizacije na njega izliven gel za koncentriranje u koji je zatim uronjen češljić kako bi se oblikovale jažice u koje su nanešeni uzorci. Količine uzoraka za proces elektroforeze određene su sukladno rezultatima određivanja koncentracije proteina u uzorcima, to jest u sve jažice unešene su iste količine proteina (40 μg). Neposredno prije nanošenja na gel uzorci su pomiješani sa 50 μL otopine boje brom fenol plavo (kako bi uzorci bili što uočljiviji) i glicerola (kako bi uzorci što bolje sjeli u jažice). Ploče s gelovima stavljene su na elektrodni nosač i u prostor između gelove uliven je svježi 1× pufer za elektroforezu (0.025 M Tris, 0.192 M glicin, pH 8.3). Nakon toga elektrode su spojene s izvorom struje (eng. *power supply*) i kadica s gelovima stavljena je u hladnjak na +4 °C da bi se spriječila denaturacija proteina uzrokovana toplinom koja se razvija tijekom elektroforeze. Napon je prvih 45 minuta podešen na 100 V, dok uzorci iz gela za koncentriranje ne uđu u gel za razdvajanje nakon čega se napon povećava na 220 V i pri tom naponu elektroforeza ide do kraja, odnosno dok boja brom fenol plavo ne dođe do ruba gela.

2.6. Određivanje aktivnosti peroksidaza primjenom gvajakola

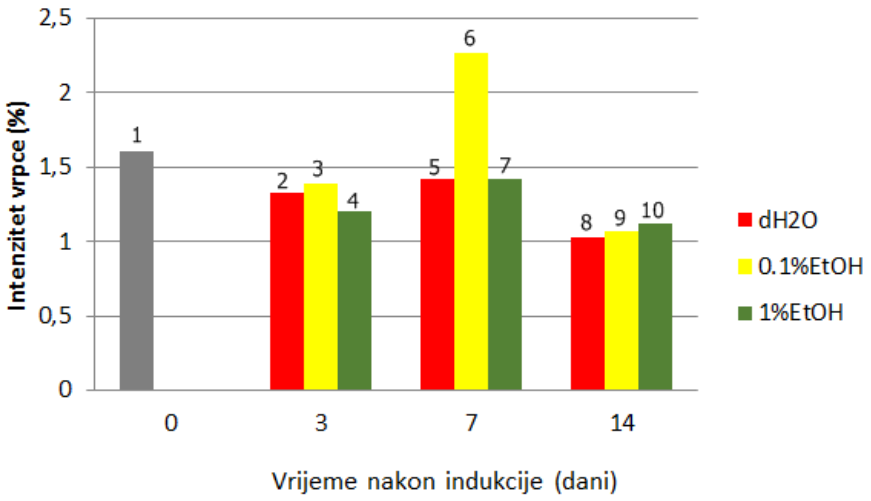
Po završetku elektroforeze, gel je ispran 30 min u 100 mL 50 mM KP-pufera (pH 7.0). Nakon toga, gel je inkubiran u 100 mL otopine 20 mM gvajakola i 4mM H_2O_2. Gel je u otopini gvajakola inkubiran 20 min, odnosno dok se nisu pojavile crvenkasto-smeđe vrpce nakon čega je odmah skeniran jer se obojenje brzo izgubi.

3. Rezultati

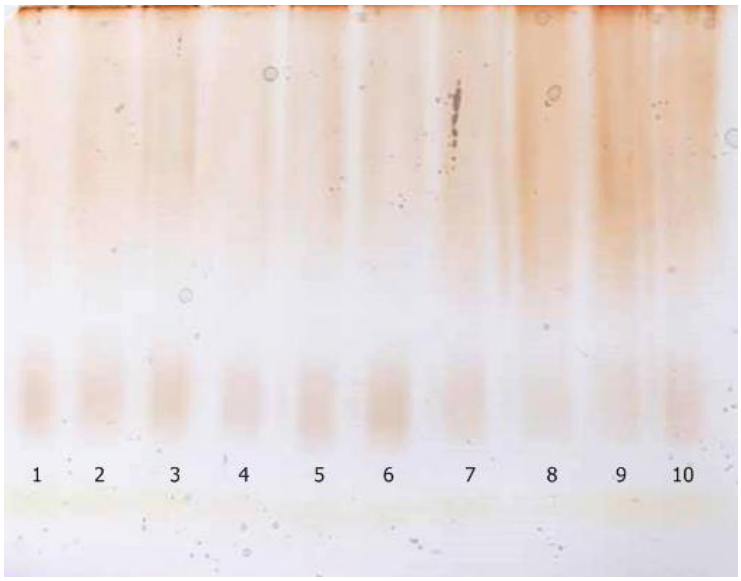
3.1. Aktivnost izoenzima gvajakol-peroksidaza u transgenom korijenju ukrasne koprive

Nakon provedene PAG elektroforeze i inkubacije gela u reagensu za mjerenje aktivnosti GPOD-a, na gelu su se pojavila jasno izražena jedna izoforma GPOD-a, dok su se ostali prisutni izooblici eksprimirali u manjoj količini te su činili šmir na gelu (Slika 3).

Korjenčići su tretirani 0,1 i 1%- tnim etanolom kako bi inducirala ekspresija *β*-kriptogeina, te su uzorkovani nakon 3, 7 i 14 dana. Treći dan nakon tretiranja 0,1%-tnim etanolom došlo je do slabog porasta aktivnosti GPOD-a, dok je indukcija 1%-tnim etanolom uzrokovala neznatno smanjenje aktivnosti ovog izooblika u odnosu na kontrolnu skupinu. Najveće povećanje aktivnosti eksprimiranog izoenzima GPOD-a zabilježeno je tjedan dana nakon indukcije gena *crypt* 0,1%-tnim etanolom, dok 1%-tni etanol nije uzrokovao nikakve promjene u aktivnosti ovog izoenzima. Dva tjedna nakon tretmana objema koncentracijama etanola, aktivnosti GPOD-a bile su nešto veće u odnosu na kontrolu (Slika 2).



Slika 2. Aktivnost GPOD-a u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive (linija O3), prije indukcije (0. dan) te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0,1 i 1%-tnim etanolom. Kontrolu predstavlja tkivo tretirano vodom (dH_2O).



Slika 3. Ekspresija i aktivnost izoenzima GPOD-a u transgenom korijenju ukrasne koprive prikazana na gelu (linija O3), koji je rezultat PAG elektroforeze u nativnim uvjetima. Intenzitet vrpci je sukladan različitim aktivnosti izoenzima GPOD-a. Brojevi od 1-10 redom označavajaju: kontrolno tkivo uzorkovano prije tretmana (1), tkivo uzorkovano 3. dan nakon tretmana vodom (2), 0.1%-tnim (3) i 1%-tnim etanolom (4), tkivo uzorkovano 7. dan nakon tretmana vodom (5), 0.1%-tnim (6) i 1%-tnim etanolom (7) te tkivo uzorkovano 14. dan nakon tretmana vodom (8), 0.1%-tnim (9) i 1%-tnim etanolom (10).

4. Rasprava

POD su enzimi iz skupine oksidoreduktaza, široko rasprostranjeni u biljnome i životnjskome svijetu. Imaju ulogu u rastu i diferencijaciji stanica, u biosintezi lignina i polimerizaciji fenolnih monomera u biosintezi suberina, zaštiti stanice od oksidacijskog djelovanja peroksidnog radikala te u katabolizmu auksina. Različiti stresni uvjeti (osmotski šok, hipoksija, suša, povišena ili snižena temperatura, infekcija patogenima, onečišćenje tla ili zraka i dr.) mogu potaknuti niz reakcija što, između ostalog, rezultira i promjenom aktivnosti peroksidaza te vrlo često i povećanim brojem izooblika peroksidaza na gelu (Enzyme nomneclature, 1992.). Aktivnosti izoenzima peroksidaza dokazani su u sirovim biljnim ekstrakima bojanjem nakon gel elektroforeze (Hiraga i sur.,2001). Budući da nespecifične

POD imaju slabu supstratnu specifičnost, kao donori elektrona služe im gvajakol, pirogalol i drugi. Kako je poznato da biotički elicitori igraju važnu ulogu u odgovoru biljke na oksidacijski stres u ovom istraživanju inducirana je sinteza *β*-kriptogeina, proteina iz skupine *β*-elicitina, u transgenom korijenju ukrasne koprive. Transgeno je korijenje genetičke linije O3, tretirano etanolom kako bi se inducirala ekspresija gena *crypt*. Budući da enzimi u stanicama dolaze u velikom broju izooblika, pa se pojedini izooblici pojedinih rabe kao biljezi diferencijacije i morfogeneze tkiva i stanice, cilj ovog rada bio je odrediti kako elictin *β*-kriptogein utječe na ekspresiju izooblika GPOD-a. Usporedbom primarnih sekvenci kod POD dokazano je da se bitno razlikuju unutar pojedine vrste biljke: neke različite aminokiselinske sekvence unutar iste biljke pokazuju samo 35% sličnosti (Hiraga i sur., 2001), a skoro 90% ostatatka je identično unutar POD različitih biljaka (Kjærsgård i sur., 1997). Različita ekpresija POD gena ukazuje na moguće uloge POD-a u različitim fiziološkim procesima. Lagriminin i Rothstein 1987 ističu kako postoje razlike u odgovoru na stres i djelovanju u različitim organima stanice kod čak 12 različitih POD-a u duhanu. Kod riže i *Stylosanthes humilis* utvrđeno je da geni POD različito reagiraju na ranjavanje biljke i infekcije patogena (Harriosn i sur., 1995; Chittoor i sur., 1997).

U svrhu ovog istraživanja liniju O3 transgenog korijenja ukrasne koprive izložili smo tretmanu 0.1%-tnim i 1%-tnim etanolom te ih uzorkovali neposredno prije tretmana etanolom, te 3.,7. i 14. dan nakon tretmana. Prema intenzitetima vprci na gelu nakon obavljene PAG elektroforeze (Slika 3.) zamjećena je znatno povećana aktivnost GPOD-a sedmi dan nakon tretmana 0.1%-tnim etanolom, a kod 3. i 14. dana zabilježena su samo neprimjetna povećanja aktivnosti u odnosu na kontrolno korijenje (dH_2O) (Slika 2.), što je dokazano i u radu Gómez-Vásqueza 2004 gdje se pokazalo kako se aktivnost enzima peroksidaze inducira elicitorima i povezana je s putevima biljne obrane. GPOD kao i ostale peroksidaze igraju značajnu ulogu u lignifikaciji, suberizaciji i katabolizmu auksina. Quiroga i suradnici (2000) dokazali su uključenost POD gena u ligno-suberizaciju kombinacijom kinetičkih i histokemijskih eksperimenata kod rajčice. Koncentracija lignina bila je povećana u transgenim dijelovima rajčice, koji su u prekomjernim količinama stvarali tioredoksin-peroksidazu, što ističu Mansouri i suradnici (1999). Brojna istraživanja su naglasila važnost peroksidaza u obrani biljke od infekcije patogena. U duhanu je nađena pozitivna korelacija između aktivnosti peroksidaza i otpornosti na bolest plamenjače duhana (*Pseudomonas syringae* pv. tabaci) (Lovrekovich i sur., 1968, Simons i Ross, 1970).

Lee i suradnici (2007) u svojim su istraživanjima dizajnirali transgene biljke duhana kako bi poboljšali toleranciju biljke na oksidacijski stres, odnosno kako bi inducirali antioksidacijski sustav biljne obrane. Njihovi rezultati jasno pokazuju kako se manipulacijom antioksidativnim mehanizmima u kloroplastima biljne stanice mogu zaštiti od različitih izvora stresa. Prema rezultatima našeg istraživanja indukcijom sinteze gena *crypt* iz transgenog korijenja koji se nalazi pod kontrolom alkoholnog inducibilnog promotora došlo je do povećane aktivnosti izoenzima GPOD-a, jednog od značajnih antioksidacijskih enzima, što upućuje na značajnu ulogu endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina u povećanju antioksidacijskog statusa transgenog korijenja ukrasne koprive.

5. Zaključak

U transgenom korijenju ukrasne koprive eksprimiran je jedan izooblik GPOD-a, dok je su drugi izooblici eksprimirani u manjoj količini te se na gelu uočavaju kao smeđi šmir. Inducibilna ekpresija gena *crypt* u transgenom korijenju ukrasne koprive (*Coleus blumei* Benth) uzrokuje povećanu aktivnost izoenzima GPOD, jednog od značajnih antioksidacijskih enzima, što upućuje na značajnu ulogu endogeno sintetiziranog *β*-kriptogeina u povećanju antioksidacijskog statusa transgenog korijenja ukrasne koprive.

6. Literatura

Ahmeda SA, Baig MMV. 2014. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of Psoralea corylifolia L. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21:499–504

Arora A, Sairam RK, Srivastava G C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science-bangalore* 82:1227-1238.

Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* 27: 84–93.

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.

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

Chittoor J M, Leach JE, White FF. 1997. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:861-871.

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

Erofeeva EA. 2015. Dependence of Guaiacol Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation Rate in Drooping Birch (*Betula pendula* Roth) and Tillet (*Tilia cordata* Mill) Leaf on Motor Traffic Pollution Intensity. *Dose-Response: An International Journal* 13:1-6.

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

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

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

Harrison S J, Curtis M D, McIntyre C L, Maclean D J, Manners J M. 1995. Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume Stylosanthes humilis by Colletotrichum gloeosporioides. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* 8:398-406.

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.

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.

Kjærsgård I V, Jespersen HM, Rasmussen S K, Welinder K G 1997. Sequence and RT-PCR expression analysis of two peroxidases from Arabidopsis thaliana belonging to a novel evolutionary branch of plant peroxidases. *Plant molecular biology* 33:699-708.

Lagrimini LM, Rothstein S. 1987. *Plant physiol*. 84:438-442.

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.

Lovrekovich L, Lovrekovich H, Stahmann M A. 1968. Tobacco mosaic virus-induced resistance to Pseudomonas tabaci in tobacco. *Phytopathology* 58:1034

Mansouri I, Mercado J A, Santiago-Dómenech N, Pliego-Alfaro F, Valpuesta V, Quesada M A. 1999. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum* 106:355-362.

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

Nomenclature E. 1992. Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes. NC-IUBMB. Academic.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012.

Simons T J, Ross A F. 1970. Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to Tobacco mosaic virus in hypersensitive Tobacco. *Phytopathology* 60: 383-384.

Tayefi-Nasrabadi H, Dehghan G, Daeihassani B, Movafegi A, Samadi A. 2011. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 10:751-763.

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