UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milana M. Trifunović

GENETIČKA TRANSFORMACIJA KIČICE (*Centaurium erythraea* Rafn.) *AtCKX1* I *AtCKX2* GENIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milana M. Trifunović

GENETIC TRANSFORMATION OF CENTAURY (*Centaurium erythraea* Rafn.) USING *AtCKX1* AND *AtCKX2* GENES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

_____
Dr Angelina Subotić, viši naučni saradnik IBISS-a Univerziteta u Beogradu, mentor

_____
Dr Ivana Dragićević, docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentor

_____
Dr Ana Simonović, naučni saradnik IBISS-a Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova disertacija urađena je u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se svom mentoru dr Angelini Subotić na stručnoj pomoći, korisnim savetima, razumevanju, optimizmu i podršci koju mi je pružala tokom svih ovih godina. Veliku zahvalnost dugujem dr Ivani Dragićević koja je uvek imala vremena i bila spremna da mi pomogne u analizi i prezentaciji rezultata. Posebnu zahvalnost dugujem dr Ani Simonović koja mi je pomogla u rešavanju problema na koje sam nailazila u pojedinim molekularno biološkim metodama tokom izrade ove disertacije i pomoći oko uobličavanja teksta.

Deo istraživanja ove disertacije koji se tiče analize endogenih biljnih hormona urađen je na Institutu za eksperimentalnu botaniku Češke akademije nauka u Pragu i ovom prilikom želim da se zahvalim dr Václav Motyka koji je to omogućio i takođe mi pomogao u analizi rezultata.

Neizmernu zahvalnost dugujem mr Aleksandru Cingelu i Martinu Rasporu koji su mi pružili nesebičnu pomoć prilikom savladavanja molekularno bioloških metoda koje su primenjene u ovoj disertaciji.

U ispitivanju fotosintetičkih pigmenata kičice pomogla mi je dr Snežana Milošević kojoj se ovom prilikom srdačno zahvaljujem.

Hemijska ispitivanja sekundarnih metabolita, HPLC analizom sekoiridoida i ksantona, uradila je dr Dijani Krstić-Milošević. Zahvaljujem joj se i na pomoći oko analize rezultata i uobličavavanja teksta ove disertacije. Izolaciju ksantona iz biljnog materijala, kao i određivanje hemijske strukture ksantona uradila je dr Snežana Trifunović na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i ovom prilikom joj se najtoplije zahvaljujem.

Veliko hvala svim mojim divnim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« u Beogradu koji su na bilo koji način učestvovali u izradi ove disertacije.

Mojim roditeljima beskrajno hvala za podršku, razumevanje i neizmernu i nesebičnu pomoć koja me prati godinama unazad. Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene u dobrim i lošim trenucima i pružili mi moralnu podršku. Na kraju, posebnu zahvalnost dugujem svojoj prijateljici Ani Čubrilo, profesorki srpskog jezika i književnosti, na vremenu koje je odvojila za lekturu ove disertacije.

Genetička transformacija kičice (*Centaurium erythraea* Rafn.) *AtCKX1* i *AtCKX2* genima

REZIME

Biljna vrsta *Centaurium erythraea* Rafn., u našem narodu poznata kao kičica, od davnina se upotrebljava kao lek za sniženje temperature i nivoa šećera u krvi, lečenje anemije, žutice i gihta, za jačanje apetita i povećanje stomačne sekrecije. Zbog poznatih lekovitih svojstava, kičica se nalazi u mnogim farmakopejama. Kao početni materijal za uspostavljanje kulture korenova *in vitro* korišćeni su vrhovi adventivnih korenova prosečne dužine ~10 mm koji su izolovani od sterilno dobijenih klijanaca kičice i dalje su gajeni na čvrstoj MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Proces organogeneze u kulturi korenova kičice je spontan. Posle sedam dana gajenja u kulturi na bazalnom delu početnog eksplantata uočavaju se prve promene. Koren zadebljava i tkivo počinje da puca celom dužinom bazalnog dela. Tokom četvoronedeljnog pasaža, duž razraslog dela eksplantata, formira se veliki broj adventivnih pupoljaka. U cilju dobijanja transgenih biljaka sa sniženim nivoom endogenih citokinina, za transformaciju su korišćena dva bakterijska soja *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 koji nose pBinHTX plazmid sa dva različita gena, *AtCKX1* odnosno *AtCKX2*, koji kodiraju enzim citokinin oksidazu/dehidrogenazu (CKX). Efikasna integracija *AtCKX1* gena (30%) i *AtCKX2* gena (28.2%) određena je PCR analizom genomske DNK. U cilju što boljeg određivanja nivoa ekspresije *AtCKX* gena kičice prvo je bilo neophodno urađena je optimizacija PCR protokola sa prajmerima za qPCR. Ovaj postupak sastojao se u pronalaženju optimalne temperature vezivanja prajmera uz istovremenu primenu različitih aditiva odnosno pojačivača PCR reakcije. Dodavanje 5% DMSO-a u qPCR reakcije značajno je poboljšalo specifičnost amplifikacije *AtCKX1* i *AtCKX2* gena kičice. qRT-PCR analizom potvrđena je ekspresija *AtCKX1* i *AtCKX2* gena kod 50% odnosno 64% analiziranih linija. U ovom radu uspešno je pokazano da ekspresija *AtCKX* gena u transgenim biljkama kičice značajno utiče na metabolizam citokinina. Ključni faktor u kontroli nivoa citokinina u biljnim tkivima predstavlja CKX enzim, jedini do sada poznati

enzim koji učestvuje u katabolizmu citokinina. Specifična aktivnost CKX enzima određivana je u izdancima i korenovima svih transgenih *AtCKX* linija. Analiza količine i sadržaja ukupnih kao i pojedinačnih grupa endogenih citokinina netransfromisanih biljaka kičice omogućila je, po prvi put, određivanje citokiniskog profila kičice *in vitro*. Takođe je pokazano da se promene u metabolizmu citokinina prilično nepredvidivo odražavaju na količinu auksina tj. količinu ukupne endogene IAA u samom biljnom tkivu. Uspešno je pokazano da ekpresija *AtCKX* gena takođe utiče i na neke morfološke parametre transformisanih biljaka kičice. Promenjena citokininska homeostaza utiče na smanjenje morfogenetskog potencijala transformisanih biljaka kičice, ali ne utiče na značajno odstupanje prirasta mase izdanaka u odnosu na kontrolu. Rezultati analize fotosintetičkih pigmenata kičice ukazuju na to da sniženje citokinina može biti jedan od preduslova, ali ne i sam signal za početak senescencije. Dominantne farmakološki aktivne supstance kičice su sekoiridoidi i ksantoni. Sadržaj sekoiridoidnih komponenti biljaka *in vitro* ne razlikuje se mnogo u odnosu na biljke iz prirode dok se količina ksantonskih jedinjenja značajno povećava kod biljaka gajenih *in vitro*. Većina transgenih *AtCKX* linija kičice produkuje manje sekoiridoida u odnosu na biljke *in vitro* i biljke iz prirode. Povećana akumulacija ksantona određena je u skoro svim *AtCKX* linijama kičice u poređenju sa biljkama iz prirode. Imajući u vidu da su ksantoni sve više u upotrebi zbog svojih farmakoloških svojstava, transgene *AtCKX* linije kičice mogle bi biti koristan izvor biljnog materijala u proizvodnji novih lekova.

Ključne reči: *Centaurium erythraea* Rafn., *Agrobacterium tumefaciens*, genetička transformacija, qRT-PCR, *AtCKX* geni, CKX aktivnost, citokinini, sekundarni metaboliti, sekoiridoidi, ksantoni.

Naučna oblast: Biologija
Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka
UDK broj: 577.21:581.1(043.3)

Genetic transformation of common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.) using *AtCKX1* and *AtCKX2* genes

ABSTRACT

Plant species *Centaurium erythraea* Rafn., commonly known as common centaury, has been used for centuries to cure febrile conditions, regulate blood sugar, treat anemia, jaundice and gout and to increase appetite and stimulate digestion. Because of its numerous therapeutic properties centaurii herba is officially recognized as a drug in a number of pharmacopoeias. Root tips of ≈10 mm average length, isolated from seedlings obtained under sterile conditions, were used as initial explants in this work. The *in vitro* culture of non-transformed centaury roots was established on solid half-strength MS nutrient medium without growth regulators. Organogenesis is a spontaneous process in centaury root culture. The first changes were noticeable on the basal part of the initial explants, after seven days of growth on MS medium. The root explants thickened and began to burst over the entire length of the basal part. During four weeks of subculture, a large number of adventitious buds were observed on initial explants. In order to obtain transgenic centaury plants with lowered endogenous cytokinin levels, *in vitro* cultivated root explants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 bearing a pBinHTX plasmid with either *AtCKX1* or *AtCKX2* genes encoding isoforms of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX). PCR analysis of genomic DNA confirmed the effecient integration of both *AtCKX1* (30%) and *AtCKX2* (28.2%) genes. In order to investigate the expression of *AtCKX* genes in transgenic centaury plants, an optimization of PCR protocol with qPCR primers was necessary. Optimization of PCR protocol implicated finding the optimal annealing temperature and simultaneous application of different PCR additives and enhancers. Addition of 5% DMSO significantly improved the specificity of qPCR amplification of *AtCKX1* and *AtCKX2* genes. qRT-PCR analysis indicated that *AtCKX1* and *AtCKX2* genes were expressed in 50% and 64% of the analyzed transgenic lines, respectively. In this work we clearly demonstrate a significant effect of *AtCKX* genes on cytokinin metabolism in transgenic centaury plants.

Since CKX is the only known enzyme involved in cytokinin catabolism, it is considered a key factor in controlling the cytokinin levels in plant tissues. CKX enzyme activity was determined in shoots and in roots of all *AtCKX* transgenic lines. The analysis of the content of total cytokinins and individual groups of endogenous cytokinins in non-transformed centaury plants enabled, for the first time, a determination of cytokinin profile of this species *in vitro*. In this work we also showed that changes in the cytokinin metabolism have unpredictable effects on the endogenous IAA levels in plant tissues. The expression of *AtCKX* genes also affected some morphological traits of the transgenic centaury plants. We observed that a decrease of endogenous cytokinins caused a reduction of morphogenetic potential of transgenic centaury plants but did not significantly affect the biomass production in comparison to control plants. Analysis of photosynthetic pigments of centaury indicated that a decrease of endogenous cytokinins might be a prerequisite rather than a signal for the onset of senescence. The main active pharmacological compounds of the centaury are secoiridoids and xanthones. The content of the secoiridoids found in plants grown *in vitro* was similar to that in plants collected from nature, whereas the quantity of xanthones was significantly elevated in plants grown *in vitro*, in comparison to plants from nature. Most of the obtained *AtCKX* transgenic centaury lines produced less secoiridoids than plants from natural habitat or plants grown *in vitro*. On the contrary, it was determined that the majority of the *AtCKX* transgenic centaury lines accumulated more xanthones than plants grown in nature. As xanthones are increasingly being used for their pharmacological properties, *AtCKX* transgenic centaury plants could be used as a useful source of plant material for the production of novel drugs.

Key words: *Centaurium erythraea* Rafn., *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, qRT-PCR, *AtCKX* genes, CKX activity, cytokinins, secondary metabolites, secoiridoids, xanthones.

Scientific field: Biology
Specific scientific field: Plant physiology
UDC number: 577.21:581.1(043.3)

S A D R Ž A J

strana

SKRAĆENICE

1. UVOD 1

1.1 Opšte karakteristike vrste *Centaurium erythraea* Rafn. 2
1.2. Pregled literature o regeneraciji vrsti roda *Centaurium in vitro* 4
1.3. Genetičke transformacije biljaka 9
1.3.1. Rod *Agrobacterium* 9
1.3.2. Plazmidi bakterija roda *Agrobacterium* 11
1.3.2.1. Ti – plazmid 13
1.3.3. Mehanizam genetičke transformacije biljne ćelije bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* 14
1.3.4. Genetičke transformacije lekovitih biljnih vrsta bakterijama roda *Agrobacterium* 18
1.3.4.1. Genetičke transformacije biljnih vrsta familije *Gentianaceae* 20
1.4. Citokinini 22
1.4.1. Modifikacije prirodnih citokinina 26
1.4.2. Metabolizam citokinina 27
1.4.2.1. Biosinteza citokinina 28
1.4.2.2. Katabolizam citokinina 29
1.4.3. Fiziološka uloga citokinina 32
1.4.3.1. Interakcija citokinina i auksina 34
1.5. Sekundarni metaboliti biljaka 36
1.5.1. Iridoidi 37
1.5.1.1. Biosinteza iridoida 38
1.5.1.2. Biološka svojstva iridoida 41
1.5.2. Ksantoni 41
1.5.2.1. Biosinteza ksantona 43
1.5.2.2. Biološka svojstva ksantona 44
1.5.3. Sekundarni metaboliti kičice *in vitro* 46

2. CILJ RADA 48

3. MATERIJAL I METODE 49

3.1. Biljni materijal 49
3.2. Sastav hranljive podloge 49
3.3. Spontana regeneracija biljaka *C. erythraea* Rafn. 50
3.4. Metode sterilizacije 51
3.4.1. Površinska sterilizacija biljnog materijala 51
3.5. Uslovi gajenja kultura 51

3.6. Molekularno biološke metode 52
3.6.1. Konstrukti korišćeni za genetičku transformaciju 52
3.6.2. Hranljive podloge za rast bakterija i antibiotici 53
3.6.2.1. Određivanje selektivne koncentracije higromicina 54
3.6.3. Transformacija biljnog materijala 54
3.6.4. Dokazivanje uspešnosti transformacije biljnog materijala 55
3.6.4.1. Izolacija genomske DNK 55
3.6.4.2. PCR analiza 57
3.6.4.3. Izolacija RNK 59
3.6.4.4. Reakcija reverzne transkripcije i optimizacija PCR protokola sa prajmerima za qPCR 60
3.6.4.5. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR) 63
3.7. Merenje CKX aktivnosti 66
3.8. Analiza endogenih biljnih hormona 66
3.9. Morfološka karakterizacija netransformisanih i transformisanih klonova kičice 67
3.9.1. Određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata kičice 67
3.10. Analiza sekundarnih metabolita kičice 68
3.10.1. Standardi i kvantifikacija 69
3.11. Statistička obrada podataka 69

4. REZULTATI 70

4.1. Uspostavljanje kulture *in vitro* i spontana regeneracija biljaka 70
4.2. Genetička transformacija *C. erythraea* Rafn. pomoću *A. tumefaciens* 72
4.2.1. Određivanje selektivne koncentracije higromicina 72
4.2.2. Inokulacija biljnog materijala 73
4.2.3. Uspostavljanje kultura transformisanih korenova i spontana regeneracija transformanata 74
4.2.4. PCR analiza genomske DNK 77
4.2.5. Optimizacija PCR protokola sa prajmerima za qPCR 78
4.2.6. qRT-PCR 80
4.3. CKX aktivnost 85
4.4. Analiza endogenih biljnih hormona 87
4.4.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka kičice *in vitro* 87
4.4.2. Detekcija i kvantifikacija endogenih citokinina kod kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 93
4.4.3. Detekcija i kvantifikacija endogene IAA kod kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 98
4.5. Morfološka karakterizacija kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 101
4.5.1. Regeneracija i umnožavanje kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 101
4.5.2. Prirast mase kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 102

4.6. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata u kontrolnim i odabranim *AtCKX* transgenim linijama kičice *in vitro* 104
4.7. Analiza sekundarnih metabolita kičice 106

5. DISKUSIJA 116

5.1. Uspostavljanje kulture korenova *in vitro* i spontana regeneracija biljaka kičice 116
5.2. Genetička transformacija *C. erythraea* Rafn. pomoću *A. tumefaciens* 117
5.2.1. Utvrđivanje uspešnosti genetičke transformacije kičice 119
5.3. CKX aktivnost kod *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 122
5.3.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka kičice iz kulture *in vitro* 123
5.3.2. Sadržaj endogenih citokinina i auksina kod odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 125
5.4. Morfološka karakterizacija kontrolnih i transgenih linija kičice *in vitro* 128
5.4.1. Regeneracija i umnožavanje kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 129
5.4.2. Prirast mase kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 130
5.5. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro* 130
5.6. Sekundarni metaboliti kičice *in vitro* 132

6. ZAKLJUČCI 136

7. LITERATURA 139

BIOGRAFIJA AUTORA 177

Prilog 1 – Izjava o autorstvu
Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
Prilog 3 – Izjava o korišćenju

S K R A Ć E N I C E

AM(D)(T)P	adenozin mono (di) (tri) fosfat
ANOVA	analiza varijanse
BA	N^6-benziladenin
BSA	*bovine serum albumin* – goveđi serum albumin
cDNK	komplementarni lanac DNK
CKX	enzim citokinin oksidaza/dehidrogenaza
CPPU	*N*-fenil-*N*'-(2-hloro-4-piridil)urea
CTAB	heksa-decil-3-metil-amonijum-bromid
CYP735As	enzim membranska monooksigenaza
*c*Z	*cis*-zeatin
c-Z7G	*cis*-zeatin 7-glukozid
c-Z9G	*cis*-zeatin 9-glukozid
c-ZOG	*cis*-zeatin *O*-glukozid
c-Z9R	*cis*-zeatin 9-ribozid
c-ZRMP	*cis*-zeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
c-Z9ROG	*cis*-zeatin 9-ribozid *O*-glukozid
2,4-D	2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina
DFU	difenilurea
(2D)-HPLC	(dvodimenzionalna) tečna hromatografija pod visokim pritiskom
DHZ	dihidrozeatin
DHZ7G	dihidrozeatin 7-glukozid
DHZ9G	dihidrozeatin 9-glukozid
DHZOG	dihidrozeatin *O*-glukozid
DHZR	dihidrozeatin 9-ribozid
DHZRMP	dihidrozeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
DHZ9ROG	dihidrozeatin 9-ribozid *O*-glukozid
DMAPP	dimetilalil difosfat
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
FAD	kofaktor flavin adenin dinukleotid
GA_3	giberelna kiselina
HMBDP	hidroksimetilbutenil difosfat
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
2iP	N^6-2-izopentenil adenin
iP	N^6-(Δ^2-izopentenil) adenin
iP7G	N^6-(Δ^2-izopentenil) adenin 7-glukozid
iP9G	N^6-(Δ^2-izopentenil) adenin 9-glukozid
iP9R	N^6-(Δ^2-izopentenil) adenin 9-ribozid

iPRMP	N^6-2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-monofosfat
iPRM(D)(T)P	izopentenil adenin ribonukleotid mono(di) (tri) fosfat
IPT	enzim izopentenil transferaza
KIN	kinetin – 6-furfuril-aminopurin
LB	*Luria Bertani Broth* hranljiva podloga
LOG	enzim monofosfat fosforibohidrolaza
LS	Linsmaier & Skoog hranljiva podloga
LSD	*least significant difference* – najmanja statistički značajna razlika
Lys	lizin
MAO	enzim monoaminooksidaza
MEP	metileritritol fosfat
MS	masena spektroskopija
MS	Murashige & Skoog hranljiva podloga
MVA	mevalonska kiselina
NAA	α-naftalen-sirćetna kiselina
NADPH	koenzim nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
NMR	nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija
PCR	*Polymeraze Chain Reaction* – lančana reakcija polimeraze
PEG	polietilen glikol
qRT-PCR	kvantitativni RT-PCR
RM(D)(T)Ps	ribozid -5'- mono (di) (tri) fosfat
RNK	ribonukleinska kiselina
RT	*Reverse Transcription* – reakcija reverzne transkripcije
TBE	tris-boratni-EDTA pufer
T-DNK	*transferred DNA* – deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom
TDZ	tidiaziron – 1-fenil-3-tidiazol-5-urea
TIBA	2,3,5-trijodbenzoeva kiselina
TRIS	tris-hidroksimetil aminometan
tRNK	RNK prevodilac u procesu translacije
tRNK-IPT	enzim tRNK izopentil transferaza
*t*Z	*trans*-zeatin
t-Z7G	*trans*-zeatin 7-glukozid
t-Z9G	*trans*-zeatin 9-glukozid
*t*ZOG	*trans*-zeatin *O*-glukozid
t-Z9R	*trans*-zeatin 9-ribozid
t-ZRMP	*trans*-zeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
t-Z9ROG	*trans*-zeatin 9-ribozid *O*-glukozid
*t*ZRM(D)P	*trans*-zeatin ribonukleotid mono(di)fosfat
UGT	enzim glukoziltransferaza
UV	ultraljubičasta spektroskopija
Z	zeatin – 6-(4-hidroksi-3-metilbut-2-enilamino)purin

1. U V O D

Biljke su već stotinama godina uobičajen izvor mnogih hemijskih jedinjenja koja se koriste u farmaciji. Procenjuje se da četvrtina lekova koji se u današnje vreme prepisuju kao terapija u savremenoj medicini sadrže ekstrakte mnogih biljaka. Usled prekomerne eksploatacije biljaka iz prirode, kao i uništavanjem njihovih prirodnih staništa, mnogim lekovitim biljnim vrstama preti potpuno istrebljenje.

Kultura tkiva predstavlja jedan od alternativnih načina komercijalne proizvodnje velikog broja biljnih vrsta uključujući i lekovite (George i Sherrington, 1984). Primenom kulture tkiva moguće je regenerisati i umnožiti veliki broj biljaka na različitim eksplantatima u kratkom vremenskom periodu. Za regeneraciju biljaka *in vitro* koriste se tri osnovne metode: mikropropagacija, organogeneza i somatska embriogeneza (Terzi i Lo Sciavo, 1990). Kultura tkiva takođe je omogućila proizvodnju sekundarnih metabolita, veoma važnih prirodnih hemijskih jedinjenja (Barz i Ellis, 1981; Deus i Zenk, 1982). Akumulacija sekundarnih metabolita zavisi od sastava hranljive podloge kao i od uslova sredine u kojoj se biljke gaje (Stafford, 1986).

Dobijanje biljaka sa željenim osobinama omogućeno je drugom veoma važnom biotehnološkom tehnikom, genetičkim inženjeringom. Jedna od važnih osobina biljaka koja se može poboljšati tehnikom genetičkih transformacija je proizvodnja sekundarnih metabolita. Genetičke transformacije biljaka mogu omogućiti proizvodnju biljaka *in vitro* koje imaju povećanu količinu sekundarnih metabolita (Naina i sar, 1989; Yun i sar, 1992; Cucu i sar, 2002; Koroch i sar, 2002). Na ovaj način kultura tkiva lekovitih biljaka mogla bi imati komercijalnu primenu u proizvodnji sekundarnih metabolita.

Primenom i razvijanjem navedenih tehnika moguće je očuvati i poboljšati neke od osobina mnogih biljnih vrsta ugroženih u prirodi, među kojima je i *Centaurium erythraea* Rafn.

1.1. Opšte karakteristike vrste *Centaurium erythraea* Rafn.

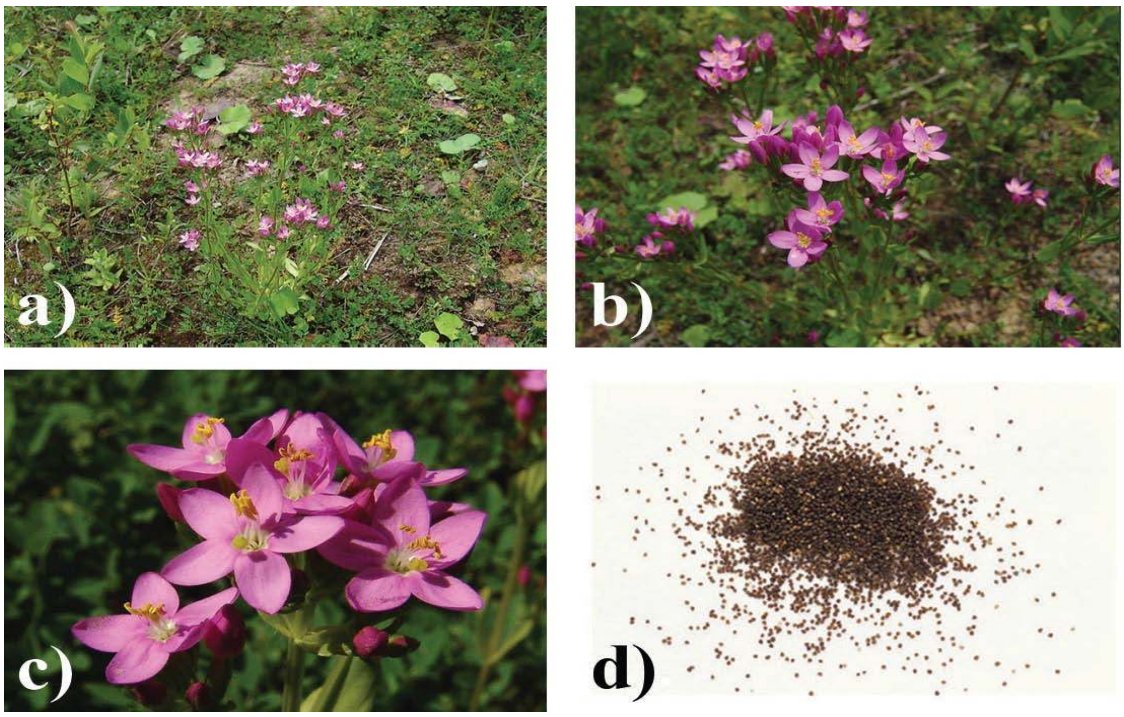
Rod *Centaurium* predstavlja najveći rod u familiji *Gentianaceaea* koja obuhvata oko 50 vrsta koje su na osnovu morfoloških, ekoloških i taksonomskih karakteristika, podeljene u nekoliko sekcija (Tutin, 1972). Sve vrste roda *Centaurium* pripadaju familiji *Gentianaceae*, redu *Gentianales*, nadredu *Gentiananae*, podklasi *Asteridae*, klasi *Magnoliopsida* (Takhtajan, 1980). Ime roda potiče od grčke reči *kentayrion*, jer se otkriće lekovitosti pripisivalo kentauru Hironu iz grčke mitologije. Drugo objašnjenje porekla naziva ovog roda potiče od bukvalnog prevoda njegovog naziva (*centum* = stotina i *aureum* = zlato), što u prevodu znači biljka vredna stotinu zlatnika (Tucakov, 1996).

Sa biogeografske tačke gledišta, vrste roda *Centaurium* su kosmopolitske i uglavnom naseljevaju severnu hemisferu i to Veliku Britaniju, Skandinaviju, Mediteran, jugozapadnu Aziju i severnu Afriku (Chevallier, 2000). Danas se smatra da rod *Centaurium* vodi poreklo iz Mediterana i centralne Amerike. Mnogobrojne vrste ovog roda takođe se mogu naći i u severnoj Americi, i to u Kaliforniji i Meksiku (Jäger, 1978). Biljne vrste ovog roda naseljavaju različite tipove staništa i zemljišta (krečnjak, ilovača, pesak, močvara).

U flori Srbije pored *Centaurium erythraea*, zastupljene su još tri vrste: *C. pulchellum*, *C. tenuiflorum* i *C. ulginosum* (Jovanović-Dunjić, 1977).

Centaurium erythraea Rafn. (sinonimi *C. umbellatum* Gillib i *C. minus* Moench), čiji je narodni naziv kičica (takođe i grozničavka, zlatna žuč, gorko zelje, crveni kantarion, mali stozlatnik), jednogodišnja je ili dvogodišnja zeljasta biljka visine 10-50 cm (**Slika 1a**). Kičica ima uspravno, četvorougaono stablo koje je granato u gornjem delu. Listovi na stablu su naspramni, duguljasto-jajasti do lancetasto-eliptični, prizemni su i uglavnom su raspoređeni u rozetu. Cvetovi formiraju račvastu, štitasto-grozdastu zbijenu cvast, koja je ravna po gornjoj površini, jer su cvetovi uvek u istoj visini (**Slika 1b**). Čašicu gradi pet linearnih, zaoštrenih listića. Krunica je levkasta i ružičasto-crvene boje (**Slika 1c**). Prašnika ima pet, linearnog su oblika i bazalnim delom su spojeni sa dugačkim tubusom koji grade krunični listići. Tučak se sastoji od plodnika koji ima pet oplodnih listića i stubića koji se završava dvorežnjevitim žigom. Posle oplođenja, prašnici se savijaju spiralno i razvija se

uska cilindrična čaura. Kada sazri, čaura puca duž pregrada na dva kapka i oslobađaju se sitna semena koja imaju žiličastu opnu (**Slika 1d**). U prirodi cveta od jula do septembra. Kičica je vrlo česta na suvim pašnjacima, obodu puteva i njiva. Živi na krečnjačkim suvim zemljištima od nizija do planinskih pojasa (do 1400 m). Pripada evropsko-mediteranskom flornom elementu (Tutin, 1972).



Slika 1. *Centaurium erythraea* Rafn. u prirodnom staništu. a) izgled cele biljke, b) štitasto-grozdasta zbijene cvasti, c) levkaste krunice sa tučkom i prašnicima, d) semena (https://www.kuleuven-kulak.be/bioweb).

Biljne vrste roda *Centaurium* široko su zastupljene u tradicionalnoj medicini mnogih naroda. U našem narodu kičica se upotrebljava od davnina. Kičica je drevni lek za sniženje temperature, a zajedno sa pelinom upotrebljava se za sniženje nivoa šećera u krvi. Takođe se koristi za lečenje anemije, žutice i gihta. Upotrebljava se za izradu gorkog čaja za želudac kao i gorke tinkture koji se koriste za jačanje apetita i za povećanje stomačne sekrecije. Zbog ovih, od davnina poznatih lekovitih svojstava, kičica se nalazi u mnogim farmakopejama. U lekovite svrhe koristi se cela biljka (*Centaurii herba*) koja se bere u vreme cvetanja. U današnje vreme, naglom i nerazumnom eksploatacijom, kičica je na

mnogim staništima proređena pa čak i iskorenjena. Upravo zbog toga kičica se smatra ugroženom biljnom vrstom (Tucakov, 1996).

1.2. Pregled literature o regeneraciji vrsti roda *Centaurium in vitro*

Kultura *in vitro* predstavlja značajan skup biotehnoloških tehnika za gajenje ćelija, tkiva ili organa, u kontrolisanim i sterilnim uslovima na veštačkoj hranljivoj podlozi definisanog sastava (Akin-Idowu i sar, 2009). Koncept kulture *in vitro* prvi je razvio Haberlandt davne 1902. godine. On je otkrio da su izolovane biljne ćelije koje se gaje na hranljivim podlogama totipotentne, tj. mogu da se dele, rastu i diferenciraju. Otkrićem biljnih hormona (auksina i citokinina – u prvoj polovini XX veka) kao i sintetičkih regulatora rastenja, tehnike kulture *in vitro* počinju intenzivno da se primenjuju u različitim naučnim oblastima kao što su farmakologija, fitopatologija, molekularna biologija itd. (Winkelmann i sar, 2006). Upotreba tehnika kulture *in vitro* omogućava brzo umnožavanje biljaka tokom cele godine, mogućnost eliminacije patogena iz zaraženog biljnog materijala, kao i uvođenje novih genetičkih svojstava (Akin-Idowu i sar, 2009). Prema dosadašnjim saznanjima, regeneracija biljka *in vitro* odvija se na tri načina: mikropropagacijom (razmnožavanjem aksilarnih izdanaka), organogenezom (*de novo* formiranje adventivnih izdanaka) i somatskom embriogenezom (indukcija somatske ćelije da se razvija u bipolarnu strukturu, tzv. somatski embrion koji formira apikalni meristem izdanka i korena i samim tim podseća na zigotski embrion).

Sredinom osamdesetih godina dvadesetog veka prvi put je neka vrsta roda *Centaurium* uvedena u kulturu. To su bili počeci u istraživanju mogućnosti za mikropropagaciju vrste *C. erythraea* u kulturi tkiva. Barešova i sar. su 1985. godine uspešno uspostavili kulture kalusa kičice od korena i pupoljaka sterilnih klijanaca na LS (Linsmaier i Skoog, 1965) hranljivoj podlozi i prusustvu indol-3-sirćetne kiseline (IAA) 10^{-5} mol/l i kinetina (KIN) 10^{-6} mol/l. Kalusne kulture su uspostavljene i od eksplantata koji su izolovani sa biljke iz prirode i sterilno gajeni na hranljvoj podlozi istog sastava. Nisu uočene razlike u morfogenetskom odgovoru između eksplantata. Na kalusima poreklom od različitih eksplantata u narednim subkulturama formirali su se adventivni pupoljci.

Primenom različitih regulatora rastenja kod kičice su, pored indukcije kalusa, takođe indukovani procesi organogeneze i somatske embriogeneze.

Organogeneza je indukovana u kulturi segmenata listova gajenih na LS hranljivoj podlozi uz dodavanje različitih koncentracija pojedinačnih citokinina. Najčešće su dodavani KIN (Barešova i Herben, 1985) ili N^6-benziladenin (BA) (Laureova i sar, 1986; Čellárová i sar, 1983; Čellárová i sar, 1984). Adventivni pupoljci se takođe formiraju na kalusu gajenom na hranljivim podlogama u koje su, pored citokinina, dodavani i auksini. Međutim, indeks multiplikacije pupoljaka znatno je viši kada se kalus gaji u prisustvu samo citokinina nego kada se gaji na hranljivoj podlozi kojoj su dodati IAA 2,0 mg/l i KIN 0,2 mg/l (Barešova i Herben, 1985). Prisustvo auksina (NAA i 2,4-D) u hranljivoj podlozi inhibira diferencijaciju pupoljaka (Čellárová i sar, 1983). Posle dva meseca gajenja segmenata listova na optimalnim hranljivim podlogama, procesom organogeneze razvija se mnogo pupoljaka rozetaste forme, koji se već posle 4 nedelje mogu dalje gajiti u nesterilnim uslovima.

Regeneracija kičice putem organogeneze počinje intenzivno da se razvija tek početkom XXI veka. Piatczak i sar. su 2003. godine ispitivali morfogenetski potencijal kičice *in vitro*. Pupoljci su regenerisani na različitim eksplantatima (hipokotil, kotiledon, koren, list) gajenim na čvrstoj MS hranljivoj podlozi (Murashige i Skoog, 1962) koja je sadržala IAA (2,85 μM) i BA (0,88 μM). Koren i list su pokazali najveću sposobnost regeneracije pupoljaka, što je potvrđeno najvećim prosečnim brojem regenerisanih pupoljaka po eksplantatu. Subotić i sar. su 2006. godine proučavali spontanu regeneraciju izdanaka kičice u kulturi korenova na čvrstoj MS hranljivoj podlozi, kao i na MS hranljivoj podlozi u koju su dodati različiti regulatori rastenja (IAA, IBA, NAA, 2,4-D, TIBA) u različitim koncentracijama (0,01-3,0 μM). Pokazano je da IAA i IBA, verovatno usled brzog metabolizma u ćeliji, uspešnije indukuju morfogenezu u odnosu na ostale regulatore rastenja. Takođe je ispitivan uticaj pojedinačnih citokinina (KIN, BA, 2iP, CPPU, TDZ, ZEA) u različitim koncentracijama (0.01-3.0 μM) na regeneraciju adventivnih pupoljaka kičice u kulturi korenova. Svi primenjeni citokinini povećavaju prosečan broj regenerisanih pupoljaka po eksplantatu. Primećeno je da TDZ i CPPU utiču na formiranje većeg broja pupoljaka u odnosu na ostale citokinine (Subotić, 2009a).

Somatska embriogeneza kičice prvi put je indukovana u ćelijskoj suspenziji koja vodi poreklo od kalusnih kultura (Barešova i Kaminek, 1984). Kalusi su indukovani na LS hranljivoj podlozi u koju je dodat citokinin KIN (10^{-6} mol/l) i auksini IAA (10^{-5} mol/l) ili 2,4-D (10^{-6} mol/l). Stabilna ćelijska suspenzija dobijena je tek posle 7 pasaža gajenja na svetlosti. U slučaju somatske embriogeneze u ćelijskoj suspenziji kičice IAA je pokazala stimulatorni efekat za razliku od 2,4-D. U suspenziji ćelija tokom 6 nedelja procesom somatske embriogeneze može se dobiti oko 200 embriona u odnosu na početni inokulum od 5 ml ćelijske suspenzije. Somatski embrioni završavaju svoje razviće posle 8 nedelja i tada se mogu dalje gajiti u nesterilnim uslovima. Ćelijsku suspenziju takođe su kasnije uspostavili Meravy (1987) i Beerhues i Berger (1994), ali u cilju proučavanja fenola i sadržaja ksantona kičice *in vitro*. Proces somatske embriogeneze kičice na čvrstoj hranljivoj podlozi uspešno je indukovan tek 2006. godine. Subotić i sar. proučavali su direktnu somatsku embriogenezu u kulturi korenova na čvrstoj MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Potvrđeno je da se kod kičice u kulturi korenova proces somatske embriogeneze odvija paralelno sa procesom organogeneze. Tri godine kasnije Subotić i sar. (2009c) proučavaju proces regeneracije kičice putem somatske embriogeneze u kulturi korenova na čvrstoj MS hranljivoj podlozi u koju su dodati GA_3 ili retardant rastenja, paklobutrazol, u koncentracijama 0,01-3,0 μM. Pokazano je da GA_3 deluje inhibitorno na proces somatske embriogeneze dok paklobutrazol u svim primenjenim koncentracijama deluje stimulativno, što je potvrđeno povećanim prosečnim brojem formiranih somatskih embriona.

U cilju praćenja produkcije sekoiridoida i ksantona praćena je regeneracija biljaka kičice u kulturi korenova. Pokazano je da biljke dobijene regeneracijom *in vitro* proizvode više gorkih glikozida (svarciamarina i genciopikrina) nego biljke iz prirode (Janković i sar, 1997). Takođe je praćen i uticaj različitih regulatora rastenja na produkciju sekundarnih metabolita. Sa povećanjem koncentracije BA u hranljivoj podlozi, u izdancima se povećava se i količina ksantona (eustomina i demetileustomina) u odnosu na izdanke koji su gajeni na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja (Janković i sar, 2000).

Generalno posmatrano, kičica je vrsta roda *Centaurium* koja se najviše istražuje. Prvi i najvažniji razlog je relativno laka manipulacija ovom biljnom vrstom što je čini odličnim model sistemom za ispitivanje organogeneze u kulturi. Kompletan životni ciklus

kičice, od semena do semena, takođe je moguće indukovati *in vitro*. Kičica je samooplodna ili stranooplodna biljna vrsta koja može biti diploidna, tetra i poliploidna. Interspecijska hibridizacija moguća je čak i *in vitro*. Kičica je između ostalog poslužila i kao model sistem za najrazličitija istraživanja kao što su ispitivanje fiziologije stresa i analiza populacione genetike. Imajući u vidu sve navedene razloge, potpuno je razumljivo što kičica predstavlja odličan model organizam koji je, u cilju ispitivanja brojnih fizioloških procesa, proučavalo oko 20 istraživača, tokom više od 20 godina, u laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« u Beogradu.

Za ostale vrste roda *Centaurium* postoji veoma mali broj literaturnih podataka. Sva dosadašnja istraživanja o regeneraciji vrsti roda *Centaurium in vitro* objedinjena su u **Tabeli 1** i **2**.

Tabela 1. Dosadašnja istraživanja o regeneraciji različitih vrsta roda *Centaurium in vitro*.

Biljna vrsta	Početni eksplantat	Hranljiva podloga	Regenerativni proces	Autori
***Centaurium littorale* (Turner) Gilmour**	Kalus i ćelijska suspenzija	LS	Rast kalusa i ćelijske suspenzije	Beerhues i Berger (1994)
***Centaurium rigualli* Esteve**	Segment stabla Izdanak	MS + NAA + BAP MS + IBA	Organogeneza (pupoljak i koren)	Iriondo i Pérez (1996)
***Centaurium scilloides* L.**	Klijanac Vrh korena Vrh korena (suspenzija)	MS ½ MS / WP WP + IAA	Organogeneza (pupoljak i koren)	Nishikawa i sar. (1997)
***Centaurium pulchellum* (Sw.) Druce**	Klijanac	MS + IBA	Organogeneza (pupoljak i koren)	Janković i sar. (1997)
	Klijanac	MS	Organogeneza (pupoljak i koren)	Krstić i sar. (2003)
	Cvetni pupoljak	MS + različite konc. saharoze	Organogeneza (cvetni pupoljak i semena)	Todorović i sar. (2006)
	Klijanac Seme	MS + $MnSO_4$	Oragnogeneza (pupoljak i koren) Klijanje	Todorović i sar. (2009)
***Centaurium maritimum* L.** ***Centaurium spicatum* L.**	Vrh korena Vrh korena (suspenzija)	½ MS ½ MS + NaCl	Organogeneza (pupoljak i koren)	Mišić i sar. (2011)

Tabela 2. Hronološki prikaz istraživanja o regeneraciji vrste *Centaurium erythraea* Rafn. *in vitro*.

Početni eksplantat	Hranljiva podloga	Regenerativni proces	Autori
List	LS LS + NAA + 2,4-D	Rast kalusa	Čellárová i sar. (1983)
List ili kalus	LS + BA	Organogeneza (pupoljak)	Čellárová i sar. (1984)
Ćelijska suspenzija	LS + IAA + KIN	Somatska embriogeneza	Barešová i Kaminek (1984)
List	LS + IAA + KIN	Rast kalusa i organogeneza (pupoljak i koren)	Barešová i sar. (1985)
List	LS + IAA LS + KIN	Rast kalusa i organogeneza (pupoljak i koren)	Barešová i Herben (1985)
List	LS + BA	Organogeneza (pupoljak)	Laurova i sar. (1986)
Kalus	LS + 2,4-D + Lys	Rast kalusa	Laurova i sar. (1986)
Kalus i ćelijska suspenzija	LS + 2,4-D	Rast kalusa i ćelijske suspenzije	Meravy (1987)
Kalus i ćelijska suspenzija	LS	Rast kalusa i ćelijske suspenzije	Beerhues i Berger (1994)
Klijanac	MS + IBA	Organogeneza (pupoljak i koren)	Janković i sar. (1997)
Klijanac Klijanac (suspenzija) Pupoljak	MS MS + različite konc. saharoze MS + IAA + BAP	Organogeneza (pupoljak i koren)	Janković i sar. (2000)
Pupoljak Hipokotil Kotiledon List Vrh korena	MS + IAA + BAP	Organogeneza (pupoljak)	Piatczak i sar. (2003)
Izdanak Vrh korena Vrh korena Vrh korena	½ MS + IAA + BAP (tečna) ½ MS + IBA (tečna) ½ MS + IBA ½ MS + IAA / IBA / NAA / 2,4-D / TIBA	Organogeneza (pupoljak) Organogeneza (pupoljak) Somatska embriogeneza Organogeneza (pupoljak)	Subotić i sar. (2006)
Klijanac	½ MS + različite koncentracije NaCl	Organogeneza (pupoljak i koren)	Šiler i sar. (2007)
Vrh korena	½ MS + BA / CPPU / 2iP / KIN / TDZ / ZEA	Organogeneza (pupoljak i/ili koren)	Subotić i sar. (2009a)
Vrh korena	½ MS	Organogeneza (pupoljak i koren)	Subotić i sar. (2009b)
Vrh korena	½ MS + GA_3 / paclobutrazol	Somatska embriogeneza	Subotić i sar. (2009c)

1.3. Genetičke transformacije biljaka

Genetičko inženjerstvo biljaka predstavlja posebnu oblast biotehnologije u kojoj se manipuliše genima i drugim DNK sekvencama u cilju dobijanja biljaka sa određenim željenim osobinama. Osnovni koraci u genetičkom inženjerstvu su izolacija gena od interesa i njegova modifikacija, zatim konstrukcija vektora, transformacija i na kraju selekcija transgenih biljaka. Pojam genetičke transformacije biljaka podrazumeva stabilnu inkorporaciju stranih gena u genom biljke (Slater i sar, 2004).

Metodološki, genetičku transformaciju biljaka moguće je ostvariti na dva načina:

1. Tehnikama direktnog transfera gena (mikrobombardovanje – *biolistic* metoda, mikroinjektiranje, elektroporacija, PEG metoda, fuzija protoplasta)
2. Tehnikama transfera gena posredstvom bioloških vektora (virusa ili bakterija – *Agrobacterium rhizogenes* i *Agrobacterium tumefaciens*).

Navedene grupe tehnika se već dugi niz godina veoma uspešno koriste za genetičku transformaciju biljaka. Tehnike direktnog transfera gena se revolucionarno razvijaju, ali njihov najveći nedostatak je što se kao rezultat genetičke transformacije dobija veoma veliko variranje u stabilnosti, integraciji i ekspresiji uvedenog gena. Sa druge strane, tehnike transfera gena posredstvom bakterija roda *Agrobacterium* pokazale su se, tokom niza godina, veoma efikasnim i jednostavnim (Vergunst i sar, 1999). Potvrđeno je da ove tehnike omogućavaju precizniju i stabilniju integraciju željenog gena u genom biljke (Komari i Kubo, 1999; Shou i sar, 2004).

1.3.1. Rod *Agrobacterium*

Bakterije koje pripadaju rodu *Agrobacterium* su Gram-negativni, štapićasti, pokretni, zemljišni organizmi. Klasifikacija vrsta ovog roda urađena je na osnovu reakcije koju izazivaju kod biljke domaćina i koja zavisi od tipa plazmida koji nosi bakterija:

1. *A. rhizogenes* – izaziva pojavu adventivnih korenova tzv. *hairy root* bolest (Riker i sar, 1930)
2. *A. tumefaciens* – izaziva pojavu tumora na povređenim biljkama tzv. *crown gall* bolest (Raven i sar, 1999; Dale i von Schantz, 2002)
3. *A. rubi* – izaziva tumor kod biljaka roda *Rubus* tzv. *cane gall* bolest (Depicker i sar, 1983)
4. *A. vitis* – izaziva tumor na vinovoj lozi i na još nekoliko drugih biljnih vrsta (Otten i sar. 1984)
5. *A. radiobacter* – saprofitna, avirulentna bakterija koja ne izaziva pojavu tumora kod biljaka

Za razliku od divljih, prethodno pomenutih, sojeva bakterija roda *Agrobacterium*, laboratorijski sojevi se koriste za genetičku transformaciju veoma velikog broja biljnih vrsta (Gelvin, 2003). Bakterije roda *Agrobacterium* mogu biti prisutne u biljci (u sprovodnim elementima), a da ne dođe do pojave oboljenja što ukazuje da ne dolazi uvek do interakcije bakterijskih i biljnih ćelija. Do infekcije i oboljenja biljnog tkiva dolazi samo posle povrede neke od biljnih ćelija. Takođe, različite biljne vrste pokazuju različitu osetljivost na infekciju bakterijama roda *Agrobacterium*. Različit stepen osetljivosti postoji i unutar samih biljnih vrsta pa tako različite sorte i ekotipovi mogu da pokazuju drugačiji stepen osetljivosti (Anderson i Moore, 1979; De Cleene i DeLey, 1976; Porter, 1991; Cheng i sar, 2004). Generalno gledano dikotiledone biljke su više osetljive na infekciju bakterijama roda *Agrobacterium* nego monokotiledone. Imajuću u vidu navedeno, razumljiva je masovna upotreba pomenutih bakterija za genetičke transformacije različitih biljnih tkiva dikotiledonih biljka. Međutim, u poslednje vreme primećen je značajan napredak u genetičkoj transformaciji monokotiledonih biljaka (pirinač – Toki , 1997; Kant i sar, 2007; kukuruz – Ishida i sar, 1996; ječam – Tingay i sar, 1998; pšenica – Cheng i sar, 1997).

1.3.2. Plazmidi bakterija roda *Agrobacterium*

Do patoloških promena u biljnom tkivu dolazi posle povrede samog tkiva i oslobađanja fenolnih jedinjenja koja kod agrobakterija prouzrokuju pozitivnu hemotaksičnu reakciju i na taj način dolazi do njihove interakcije. Fenolna jedinjenja zatim indukuju gene odgovorne za virulenciju bakterija. Pomenuti geni se nalaze na hromozomalnoj i plazmidnoj DNK. Plazmidi u bakterijskim ćelijama služe kao vektori prilikom genetičkih transformacija. Bakterije roda *Agrobacterium* imaju velike konjugovane plazmide (200-250 kb), čiji se delovi tokom transformacije integrišu u genom biljke (Van Larebeke i sar, 1975). Kod ovih bakterija postoje dva osnovna tipa plazmida koji su označeni po vrsti oboljenja koje izazivaju:

1. Ti – plazmid (*tumor inducing*) kod *A. tumefaciens*
2. Ri – plazmid (*root inducing*) kod *A. rhizogenes*

Veoma važan deo plazmida, koji omogućava bakterijama da koristi opine, kondenzacione produkte aminokiselina i ketokiselina ili šećera, koji se sintetišu u biljci posle infekcije biljnog tkiva i inkorporacije gena koji ih kodiraju u genom biljke, označava se kao *vir* region (*virulence region*). Do sada je identifikovno više od 20 vrsta opina koji predstavljaju markere genetičke transformacije pomoću bakterija roda *Agrobacterium*. Posle infekcije biljnog tkiva sa *A. tumefaciens* sintetišu se oktopin, nopalin, manopin, agropin, leucinopin ili sukcinamopin, dok se posle infekcije sa *A. rhizogenes* sintetišu agropin (Ri plazmidi *pRiA4*, *pRi1855*, *pRiHR1*, *pRi15834* i *pRiLBA9402*), manopin (*pRi8196*), mikimopin (*pRi1724*) ili kukumopin (*pRi2659*) (Venna i Taylor, 2007). Opini se akumuliraju u transformisanim ćelijama, ali biljka nema odgovarajuće enzime koji mogu da ih razgrade tako da ih ne može koristiti. Oslobođeni opini se transportuju i patogene bakterije ih koriste kao izvor ugljenika i azota. Katabolizam ovih opina obavlja se enzimima koje kodiraju geni na samom plazmidu pri čemu se razgrađuje onaj opin čija se

sinteza indukuje u transformisanom tkivu (Pettit i sar, 1983). Opini su veoma važna jedinjenja jer predstavljaju metaboličke markere za genetičke transformacije.

Oba tipa plazmida sadrže tri genetička regiona koja su neophodna za proces transformacije i to su:

1. T-DNK (*transferred DNA*) – deo plazmidne DNK veličine 10-30 Kbp, čiji transport u biljnu ćeliju omogućava bakteriji da eksprimira svoje gene u samoj biljci (Baron i Zambryski, 1995)
2. *Vir* region (*virulence region*) veličine 35 Kbp, koji se sastoji od više velikih lokusa (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virH* i *virJ*). *Vir* geni kodiraju sintezu *vir* proteina, koji su odgovorni za proces prepoznavanja specifičnih jedinjenja koja sintetiše biljna ćelija nakon povrede i transfer T-DNK u ćeliju domaćina.
3. Region bakterijskog hromozoma koji čine *chv* (»*chromosomal virulence*«) geni koji regulišu bakterijski hemotaksis i vezivanje bakterije za povređenu biljnu ćeliju (Watson i sar, 1975). Prema Simonović (2011) geni *chvA* i *chvB* su odgovorni za produkciju i sekreciju cikličnih 1,2-glikana, dok produkt *chvE* obrazuje transmembranski receptorski kompleks zajedno sa produktom plazmidnog *virA*.

Razvijanje tumorskog tkiva biljke dešava se pošto se deo plazmidne DNK (T-DNK) transportuje i ugrađuje u DNK biljke. Onkogeni, geni koji su odgovorni za formiranje tumora, T-DNK Ti plazmida kodiraju enzime koji katalizuju sintezu auksina i citokinina. Transkripcija ovih gena dovodi do povećanja količine ovih biljnih hormona što stimuliše nekontrolisane ćelijske deoba tj. razvijanje tumora (Chilton i sar, 1977). T-DNK Ri – plazmida nosi onkogene za sintezu auksina i *rol* gene čiji produkti povećavaju osetljivost transformisane biljne ćelije na delovanje auksina. Ekspresijom ovih gena dolazi do disbalansa biljnih hormona što dovodi do masovne proliferacije transformisanih ćelija.

1.3.2.1. Ti – plazmid

Ti – i Ri – plazmid pokazuju veliki stepen homologije zbog najveće sličnosti u građi *vir* regiona u odnosu na sve ostale sekvence DNK plazmida (Nester i sar, 1984).

Svi virulentni sojevi *A. tumefaciens* sadrže jedan veliki plazmid (Ti – plazmid), koji izaziva već pomenute *crown gall* tumore. Ti-plazmid se sastoji od oko 200-800 kb parova nukleotida (Gelvin, 2003) i poseduje pet regiona:

1. T-DNK (»*transferred DNA*«) region
2. *tra* – region odgovoran za konjugaciju plazmida
3. *ori* – region odgovoran za replikaciju plazmida
4. *vir* – region koji učestvuje u procesu infekcije
5. *cat* – region sa genima za katabolizam opina

Na T-DNK regionu nalaze se geni za sintezu biljnih hormona auksina i citokinina što indukuje ekspresiju tumorskog fenotipa, zatim i sintezu opina. Sekvenca T-DNK za sintezu kukumopina, nopalina i sukcinamopina Ti – plazmida i agropina Ri – plazmida je jedinstvena. Za oktopin i leucinopin Ti – plazmida na samoj T-DNK postoje dve sekvence (T_L-DNK i T_R-DNK). Ova dva regiona mogu se nezavisno transportovati u biljnu ćeliju (Bundock i Hooykass, 1998).

Na Ti – plazmidu postoje lokusi čijom ekspresijom dolazi do indukcije razvića tumora i to su:

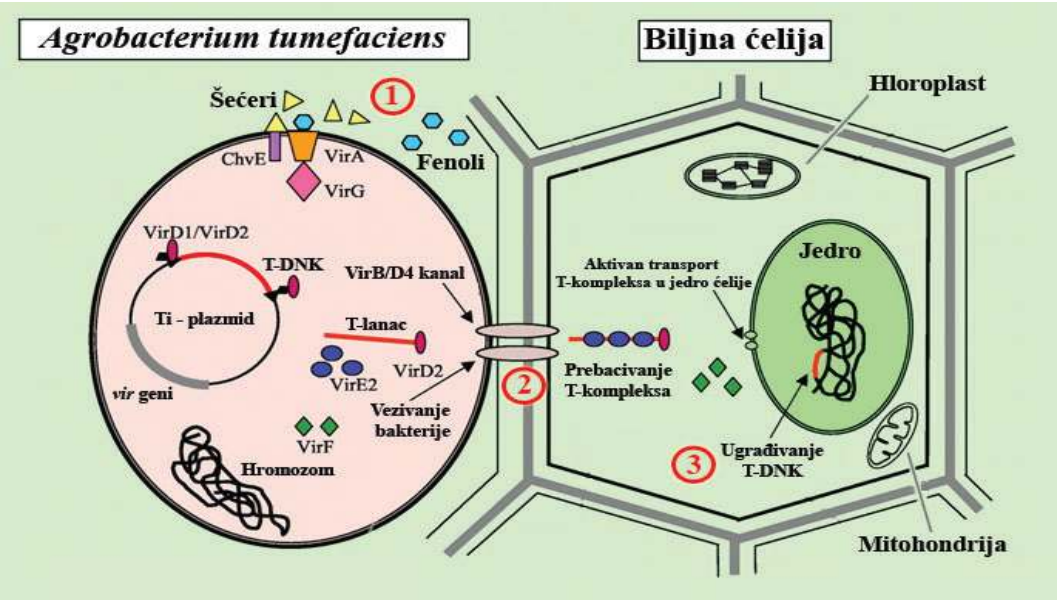
1. *tms – tumor morfology shooty*
2. *shi – shoot induction* lokus sa genima *IaaM* (Thomashow i sar, 1986; van Onckelen i sar, 1986) i *IaaH* (Thomashow i sar, 1984) koji kodiraju sintezu IAA
3. *tmr – tumor morphology rooty* lokus na kojem se nalazi *ipt* gen koji kodira enzim izopentil-transferazu koja učestvuje u sintezi citokinina (Akyoshi i sar, 1984; Barry i sar, 1984; Buchmann i sar, 1985)

1.3.3. Mehanizam genetičke transformacije biljne ćelije bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*

Kako bi transformacija biljaka bakterijama roda *Agrobacterium* bila uspešna, neophodno je imati bakterijski soj odgovarajuće gustine, prekulturu eksplantata, izvršiti povredu eksplantata, odrediti podlogu za kokultivaciju, kokultivaciono vreme, kao i temperaturu i selekcioni režim (Chandler i Lu, 2005).

Kao što je već prethodno opisano u poglavlju 1.3.2. kod divljih sojeva bakterija roda *Agrobacterium* Ti – i Ri – plazmidi imaju T-DNK region koji je podeljen u dve sekvence (T_L i T_R) između kojih je T_C sekvenca koja se ne prenosi u genom biljke (Veluthambi i sar, 1988). Na T_L sekvenci se nalaze onkogeni, a na T_R sekvenci su locirani geni za sintezu opina. U laboratorijskim sojevima bakterija roda *Agrobacterium* prirodna T-DNK zamenjena je genom od interesa koji želimo genetičkom transformacijom da uvedemo u biljni genom.

Genetička transformacija biljaka bakterijama roda *Agrobacterium* je proces koji se, grubo rečeno, sastoji od tri koraka (**Slika 2**):



Slika 2. Prikaz infekcije biljne ćelije bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* (prema Zhu i sar, 2003). 1 - Prepoznavanje i »napad« biljne ćelije od strane bakterije, 2 - Prebacivanje T-DNK u biljnu ćeliju, 3 - Ugrađivanje T-DNK u biljni genom

1. Prepoznavanje i »napad« biljne ćelije od strane bakterije

Već je pomenuto da do infekcije bakterijom dolazi samo u slučaju povrede biljne ćelije. Povređene biljne ćelije počinju da sintetišu specifična jedinjenja (amino kiseline, šećere i organske kiseline). Kod dikotila to su fenolni derivati, siringon i acetosirngon (Stachel i sar, 1985), a kod monokotila to je etil-ferulat (Messens i sar, 1990). Ova jedinjenja su deo odbrambenog sistema biljke i takođe učestvuju u sintezi fitoaleksina i lignina. Ova jedinjenja izazivaju pozitivnu hemotaksičku reakciju koja dovodi do interakcije biljne ćelije i bakterije. Ova interakcija, tj. vezivanje bakterije za biljnu ćeliju predstavlja prvi korak mehanizma genetičke transformacije. Veza između bakterije i biljke uspostavlja se zahvaljujući ekspresiji *attR* gena bakterije koji je odgovoran za sintezu specifičnog polisaharida koji učestvuje u inicijalnom vezivanju za biljnu ćeliju, a potom proizvodi mrežu celuloznih mikrofibrila kojima se ova veza ojačava. Bakterijski hromozomski geni *chvA* i *chvB* odgovorni su za izlučivanje β-1,2-glukana, koji pričvršćuje bakteriju za biljnu ćeliju. Protein čiju sintezu kodira *chvE* gen, vezuje ugljene hidrate iz signalnih jedinjenja biljke i prenosi signal membranskom VirA proteinu (histidin protein kinaza). Ovaj protein je primarni receptor signala bakterije. Signalni molekuli reaguju sa ovim proteinom i dovode do konformacionih promena na molekulu. Fosforilisan VirA protein prenosi fosfatnu grupu na VirG protein (Jin i sar, 1990). Fosforilisani VirG protein aktivira transkripciju *vir* gena (Pazour i sar, 1990; Tamamoto i sar, 1990). VirG protein može se i nefosforilisan vezati za *vir* promotore, ali fosforilacija povećava njegov afinitet za DNK (Shen i Citovsky, 1996). Fosforilacija VirA, a zatim i VirG kompleksa dovodi do ekspresije svih *vir* gena.

2. Prebacivanje T-DNK u biljnu ćeliju

Glavnu ulogu u formiranju jednolančane T-DNK, njenom isecanju i prenosu u biljnu ćeliju imaju VirD i VirE proteini. Produkti VirD regiona (VirD1 i VirD2 proteini) su deo endonukleaznog kompleksa koji katalizuje specifične jednolančane prekide kojima se iz Ti plazmida oslobađa segment jednolančane T-DNK. Posle isecanja, T-lanac se polarno izmešta (od desnog ka levom graničniku) i dolazi do kovalentnog vezivanja VirD2

proteina. Ovaj protein štiti T-lanac od destrukcije i tu ostaje tokom transporta u biljnu ćeliju.

Kompleks VirD2/T-DNK naziva se nezreli T-kompleks (*immature T-complex*). Transport ovog kompleksa u citoplazmu ćelije domaćina, zajedno sa još nekoliko drugih vir proteina (VirE2, VirF i VirE3), vrši se kroz specijalizovani membranski transportni sistem. Posle ulaska u citoplazmu biljne ćelije dolazi do spajanja VirE2 molekula sa nezrelim T-kompleksom i formira se zreli T-kompleks (*mature T-complex*) koji je zaštićen od dejstva nukleaza tokom putovanja kroz citoplazmu biljne ćelije do jedra (Tzfira i Citovsky, 2006). Za aktivan ulazak T-kompleksa u jedro nephodno je prisustvo NLC (*nuclear localization signal*) sekvence koja se nalazi na VirD2 i VirE2 proteinima (Howard i sar, 1992). VirE2 protein interaguje sa različitim biljnim citoplazmatičnim proteinima (VIP1 i VIP2) i na taj način se kroz jedarne pore (NPC – *nuclear pore complex*) omogućava aktivan transport T-kompleksa u jedro ćelije domaćina (Tzfira i sar, 2001). Posle ulaska T-kompleksa u jedro VIP1 protein se vezuje za histone (Li i sar, 2005; Loyter i sar, 2005) što je veoma značajno za pozicioniranje ovog kompleksa na mesto integracije. Pre same integracije dolazi do uklanjanja svih proteina koji su vezani za T-DNK (*T-DNK incoating*) uz pomoć VirF proteina (Tzfira i sar, 2004a).

3. Ugrađivanje i ekspresija gena T-DNK

Poslednji, a verovatno i najvažniji korak genetičke transformacije, je integracija T-DNK u genom domaćina. Integracija u genom biljke dešava se nehomologom rekombinacijom koja se može dogoditi na bilo kom delu genoma, ali do integracije dolazi u regionima sa većim procentom AT veza (Tzfira i sar, 2004b).

Ekspresija transgena zavisi od niza faktora kao što su broj kopija uvedenog gena kao i od mesta njegove integracije (Matzke i sar, 1994; Assaad i sar, 1993; Maessen i sar, 1997). Stabilno integrisana T-DNK prenosi se u sledeću generaciju (Hansen i Wright, 1999).

Mehanizam genetičke transformacije u današnje vreme podrazumeva korišćenje tzv. »razoružanih« sojeva *A. tumefaciens*, kod kojih su onkogeni (*onc*) odstranjeni iz plazmida. Sistem binarnih vektora kojim se obavljaju genetčke transformacije deli originalni Ti-plazmid na dva plazmidna vektora: veštački (rekombinantni) Ti-plazmid koji nosi gen od interesa i pomoćni plazmid koji kodira za *vir* funkcije (An, 1995). U svaki binarni plazmid, pored stranog gena od interesa, ubacuju se i marker geni koji se dele na **selektivne i reporter gene** (Reynaerts i sar, 1988).

Selektivni marker geni su najčešće prokariotski geni koji kodiraju rezistenciju prema nekom antibiotiku (kanamicin, higromicin i dr.). Ova, tzv. negativna selekcija primenom selektivne podloge omogućava razdvajanje transformisanih biljnih ćelija od netransformisanih. Genetičke transformacije se najčešće obavljaju uvođenjem selektivnog marker gena za negativnu selekciju. Pored selektabilnih markera za negativnu selekciju koriste se i markeri za pozitivnu selekciju i markeri za vizuelnu selekciju (geni za enzime koji daju bojene reakcije ili fluorescentne proizvode). Ekspresija vizuelnih selektabilnih markera može se lako pratiti bez ekstrakcije DNK i elektroforeze.

Reporter geni su uobičajeni delovi binarnog vektora, ali se ponekad konstruišu i bez njih. Ovi geni kodiraju produkte na osnovu kojih je moguće pratiti transformaciju (rast transformisanih ćelija, efikasnost regeneracije, rast transgenih biljka). Na izbor reporterskog marker gena utiče jednostavnost i specifičnost detekcije. Kvantitativna metoda detekcije razvijena je za *uidA* gen iz *Escherichia coli* koji kodira β-glukuronidazu, tj. GUS enzim (Jefferson i sar,1987). Sve više se primenjuju vizuelni reporter geni, kao što su gen za sintezu pigmenta antocijanina (Ludwig i sar, 1989; Goff i sar, 1990) i gen za sintezu zelenog fluorescentnog proteina – *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) (Sheen i sar, 1995; Chiu i sar, 1996). Prednost vizuelnih reporter gena je što ne zahtevaju posebne veštačke supstrate za detekciju, a njihova ekspresija se lako vizuelno detektuje u tkivu, bez uništavanja posmatranog tkiva.

1.3.4. Genetičke transformacije lekovitih biljnih vrsta bakterijama roda *Agrobacterium*

Genetičke transformacije vremenom su postale veoma pogodan sistem za ubacivanje željenih gena u biljke. Do danas je genetski modifikovano preko 60 rodova lekovitih i aromatičnih biljaka koje imaju široku primenu. Glavni ciljevi genetske modifikacije ovih biljaka su:

1. Proizvodnja sekundarnih metabolita (povećana količina već postojećih ili sinteza novih jedinjenja)
2. Regeneracija biljaka koje su otporne na različite herbicide, bolesti i/ili štetočine
3. Regeneracija biljaka sa različitim morfološkim karakteristikama
4. Dobijanje transgenih biljaka koje se dalje mogu koristiti za proizvodnju različitih seruma

Pomoću *A. rhizogenes* inficirano je više od 450 različitih vrsta biljaka (Tepfer, 1984; Porter 1991), uključujući različite familije dikotiledonih, malobrojne familije monokotiledonih biljka i neke golosemenice (Veena i Taylor, 2007). Do danas su transformisane brojne lekovite i aromatične biljne vrste. Pokazalo se da *hairy roots* brzo rastu i lako se umnožavaju u kulturi *in vitro*. Takođe se pokazalo da su genetski i fiziološki stabilni. Upravo zbog navedenih karakteristika *hairy roots* su veoma pogodni za masovnu proizvodnju sekundarnih metabolita, kao i za identifikaciju nepoznatih metabolita (Giri i Narasu, 2000). Uslovi kontrolisane proizvodnje 98 različitih sekundarnih metabolita proučavani su kod 79 biljnih vrsta gajenih *in vitro* (Giri i Narasu, 2000).

Genetičke transformacije lekovitih biljnih vrsta takođe su rađene pomoću *A. tumefaciens*. Prva uspešna genetička transformacija pomoću ove bakterije urađena je davne 1989. godine na dve nedelje starim klijancima *Azadirachta indica* (Naina i sar, 1989). U većini eksperimenata u kojima je transformacija rađena pomoću *A. tumefaciens* kao početni eksplantati korišćeni su segmenti listova i stabla koji su zaražavani bakterijom. Ne

postoje literaturni podaci koji govore o upotrebi korena ili dela korena kao inicijalnog eksplantata za genetičku transformaciju. U **Tabeli 3** prikazan je pregled literature o lekovitim vrstama koje su do sada genetički transformisane pomoću *A. tumefaciens*.

Tabela 3. Pregled dosadašnjih radova na transformacijama lekovitih vrsta pomoću *A. tumefaciens* (modifikovano prema Gómez-Galera, 2007).

Vrsta	Tip eksplantata	Autori
Acacia mangium	segmenti stabla	Xie i Hong, 2002
Aesculus glabra	suspenzija ćelija	Trick i Finer, 1999
Azadirachta indica	klijanci	Naina i sar, 1989
Drosera rotundifolia	odsečci listova	Hirgikopi i sar, 2002
Echinacea purpurea	odsečci listova i petiole	Wang i To, 2004
Euphorbia nivulia	kalus	Sunandakumari i sar, 2005
Lathyrus sativus	epikotil	Barik i sar, 2005
Lavandula intermedia	odsečci listova	Dronne i sar, 1999
Panax quinquefolium (American ginseng)	epikotil	Chen i Punja, 2002
Plumbago zeylanica	kotiledoni hipokotil petiole	Wei i sar, 2006
Ruta graveolens	hipokotil	Lievre i sar, 2005
Scrophularia buergeriana	odsečci listova	Park i sar, 2003b
Taraxacum platycarpum	odsečci listova	Bae i sar, 2005
Taxus brevifolia	segmenti stabla	Han i sar, 1994
Taxus bacata		
Taxus cuspidata	suspenzija ćelija	Kim i sar, 2000
Thalictrum flavum	kotiledoni	Samanani i sar, 2002

Brojni faktori mogu uticati na efikasnost transformacije: genotip biljke, povrede biljnog tkiva, aktivacija *vir* gena, prenos T-DNK u biljnu citoplazmu, translokacija T-DNK u jedro i integracija T-DNK (Gelvin, 2000).

Postoji veoma mali broj literaturnih podataka o direktnom transferu gena u neke lekovite vrste. Mikrobombardovanje ciljanim genom do danas je urađeno samo kod tri lekovite biljne vrste i to kod *Dioscorea alata* (Tor i sar, 1993), *Lathyrus sativus* (Barna i Mehta, 1995) i *Gentiana sp* (Hosokawa i sar, 2000).

1.3.4.1. Genetičke transformacije biljnih vrsta familije *Gentianaceae*

U okviru familije *Gentianaceae*, biljne vrste su u većini slučajeva genetički transformisane pomoću *A. rhizogenes*. Hosokawa i sar. su 1997. godine pokušali da urade transformaciju *Gentiana triflora x G. Scabra* pomoću *A. tumefaciens* (sojevi LBA4404 i EHA101), ali nisu u tome uspeli. Pomoću *A. tumefaciens* do sada su uspešno transfomisane samo tri biljne vrste u okviru pomenute familije, i to *Eustoma grandiflorum* Grise., *Gentiana punctata* i *G. dahurica*. Iako genetičke transformacije pomoću *A. tumefaciens* omogućavaju precizno i stabilno ugrađivanje transgena u genom biljke (Karami i sar, 2009), ova tehnika transformacije nije mnogo primenjivana na vrstama familije *Gentianaceae*, a pogotovo ne među vrstama roda *Centaurium*.

Mikrobombardovanje ciljanim genom urađeno je samo kod dve biljne vrste: *Eustoma grandiflorum* Grise. i *Gentiana triflora x G. scabra*.

Sva navedena istraživanja uglavnom su se bavila problematikom efikasnosti regeneracije i selekcije transformisanih biljnih tkiva. Iscrpan pregled literature o tehnikama genetičkih transformacija, koje su do danas primenjene na vrstama familije *Gentianaceae*, dat je u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Detaljan pregled dosadašnjih istraživanja o genetičkim transformacijama biljnih vrsta familije *Gentianaceae*.

Vrsta	Način transformacije	Autori
Gentiana scabra Bunge var. *buergeri* Maxim	***A. rhizogenes*** (soj MAFF03-01724)	Suginuma i Akihana, 1995
Gentiana acualis	***A. rhizogenes*** (soj A4M70GUS)	Momčilović i sar, 1997
Gentiana cruciata	***A. rhizogenes*** (soj A4M70GUS)	Momčilović i sar, 1997
	A. rhizogenes (sojevi A4, 15834, 8196, R1000)	Hayta i sar, 2011
Gentiana lutea	***A. rhizogenes*** (soj ATCC15834)	Momčilović i sar, 1997
Gentiana purpurea		
Gentiana triflora x G. scabra	***A. rhizogenes*** (soj ATCC43057)	Hosokawa i sar, 1997
	A. tumefaciens **- neuspešno** (sojevi LBA4404 i EHA101)	
Gentiana punctata	***A. rhizogenes*** (soj A4M70GUS)	Vinterhalter i sar, 1999
	A. tumefaciens (soj C58C1)	Vinterhalter i sar, 2000
Gentiana triflora x G. scabra	**mikrobombardovanje**	Hosokawa i sar, 2000
Gentiana triflora x G. scabra	***A. rhizogenes*** (soj ATCC43057)	Mishiba i sar, 2006
Gentiana macrophylla	***A. rhizogenes*** (sojevi A4GUS, R1000, LBA9402, ATCC11325)	Tiwari i sar, 2007
Gentiana macrophylla	***A. rhizogenes*** (soj R1000)	Znahg i sar, 2010
Gentiana dahurica Fish.	***A. tumefaciens*** (soj GV3130)	Sun i Meng, 2010
Eustoma grandiflorum Grise.	***A. rhizogenes*** (soj MAFF02-10266)	Handa i sar, 1992
	A tumefaciens (soj A722)	Deroles i sar, 1993
	A. rhizogenes (soj MAFF0301724)	Handa i sar, 1995
	mikrobombardovanje	Semeria i sar, 1995
	A. rhizogenes (soj NCPPB1855)	Govannini i sar, 1996
	A. tumefaciens (sojevi A281 i EHA105)	Semeria i sar, 1996
	A. tumefaciens (soj A722)	Ledger i sar, 1997
	A. tumefaciens (soj A722)	Schwinn i sar, 1997
	mikrobombardovanje	Takahashi i sar, 1998
Swertia japonica	***A. rhizogenes*** (soj ATCC15834)	Ishimaru i sar, 1990
Centaurium erythraea Rafn	***A. rhizogenes*** (soj A4M70GUS)	Subotić i sar, 2003/4
	A. rhizogenes (soj LBA9402)	Piatczak i sar, 2006

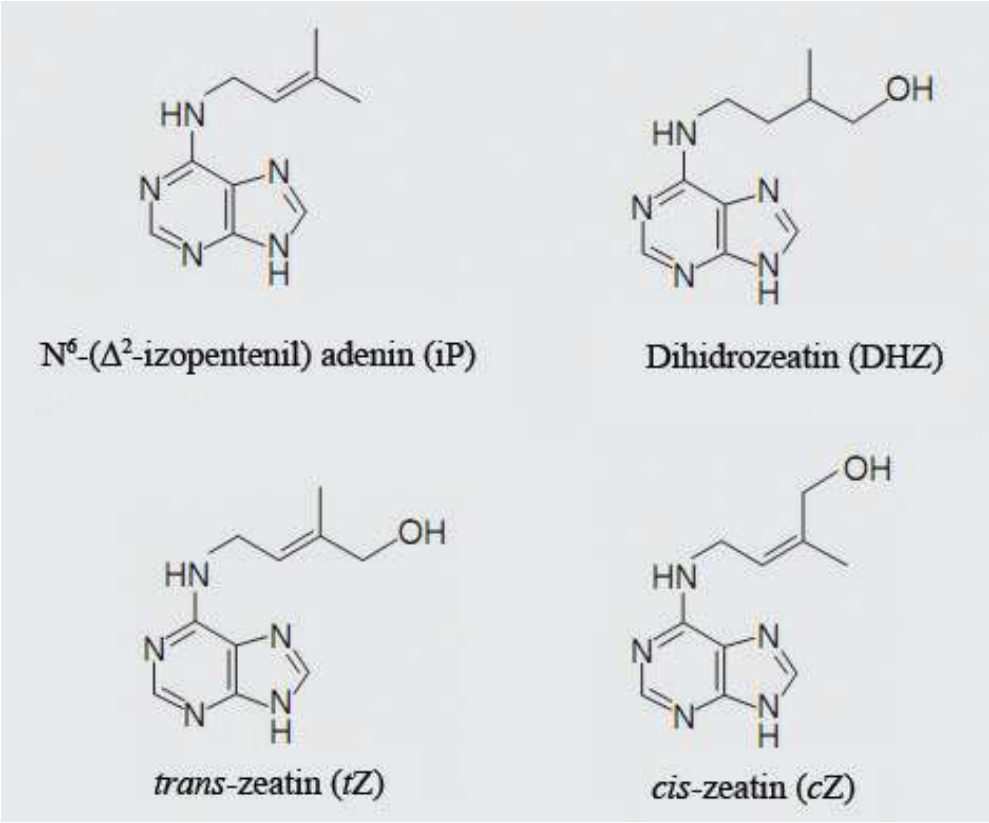
1.4. Citokinini

Citokinini su biljni hormoni koji pojedinačno ili u kombinaciji sa nekim drugim biljnim hormonima regulišu brojne razvojne i fiziološke procese u biljnom tkivu. Ime su dobili po prvobitno otkrivenoj funkciji, a to je stimulacija citokineze, tj. deobe ćelija. Davne 1955. godine otkriveno je da kokosovo mleko (tečni endosperm kokosovog oraha) stimuliše deobu ćelija stabla duvana (Skoog i Miller, 1955a, 1955b). Iste godine identifikovan je regulator rastenja biljaka, kinetin, sa citokininskim efektom. Ubrzo posle otkrića kinetina, identifikovana su brojna jedinjenja koja imaju citokininsku aktivnost. Među njima je i prirodni citokinin zeatin koga je iz nezrelog semena kukuruza (*Zea mays*) izolovao Letham 1963. godine.

Citokinini se po poreklu dele u dve velike grupe – prirodne i sintetičke:

1. Prirodni citokini – po svojoj hemijskoj strukturi predstavljaju derivate adenina. U zavisnosti od komponente koja se vezuje za adeninski prsten, prirodni citokinini se dalje dele u dve grupe:

1. Izoprenoidni citokinini – nastaju kada se za N^6 atom adenina veže jedna izoprenoidna C_5 jedinica (Mok i Mok, 2001). U prirodne izoprenoidne citokinine spadaju tzv. slobodne baze koje čine: N^6-(Δ^2-izopentenil) adenin (označen kao iP), *trans*-zeatin (*t*Z), *cis*-zeatin (*c*Z) i dihidrozeatin (DHZ). Hemijske strukture izoprenoidnih citokinina prikazane su na **Slici 3**. *Trans*- i *cis*-izomeri zeatina nastaju modifikacijom, tj. hidroksilacijom bočnog lanca iP u *trans*- ili *cis*-položaju, dok DHZ nastaje posle zasićenja dvostruke veze u zeatinu. U najrasprostranjenije prirodne izoprenoidne citokinine spadaju *t*Z i iP, mada postoje brojne varijacije u sadržaju pojedinačnih izoprenoidnih citokinina, kako u različitim biljnim vrstama tako i u samom biljnom tkivu tokom različitih stadijuma razvića. Tako na primer, *t*Z i iP su glavni tipovi citokinina koji se sreću kod *Arabidopsis thaliana*, dok je *c*Z dominantan tip citokinina kod kukuruza (Veach i sar, 2003), pirinča (Izumi i sar, 1988) i leblebije (Emery i sar, 1998). U novije vreme *c*Z takođe je otkriven u algama (Stirk i sar, 2003) i mahovinama (Von Schwartzenberg i sar, 2007).

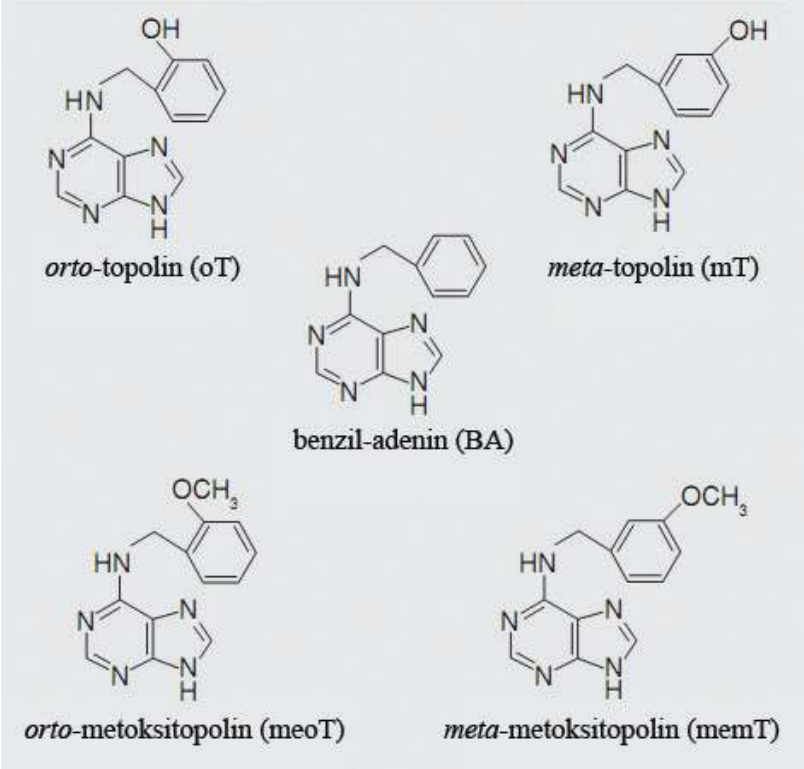


Slika 3. Hemijske strukture prirodnih izoprenoidnih citokinina (prema Sakakibara, 2006).

Istraživanja egzogeno primenjivanih citokinina na duvanu (Schmitz i Skoog, 1972) i mahovini *Funaria hygrometrica* (Spiess, 1975) ukazuju na to da su slobodne baze i ribozidi, prekursori slobodnih baza, biološki aktivne forme citokinina, s tim da *t*Z i iP imaju veću aktivnost u poređenju sa *c*Z čija je aktivnost veoma mala ili je čak uopšte i nema. Međutim, brojna istraživanja vremenom su dala različite rezultate o aktivnosti pojedinih slobodnih baza citokinina. Poslednjih godina značajno se ispituje aktivnost *c*Z za koji se ranije smatralo da ima najmanju aktivnost od svih biološki aktivnih formi citokinina. Ipak, zajednički zaključak svih istraživanja je da egzogeno primenjene slobodne baze u biljnim tkivima brzo metabolišu u odgovarajuće nukleotide i nukleozide (Singh i sar, 1988; Letham i Zhang, 1989; Moffatt i sar, 1991; Yonekura-Sakakibara i sar, 2004).

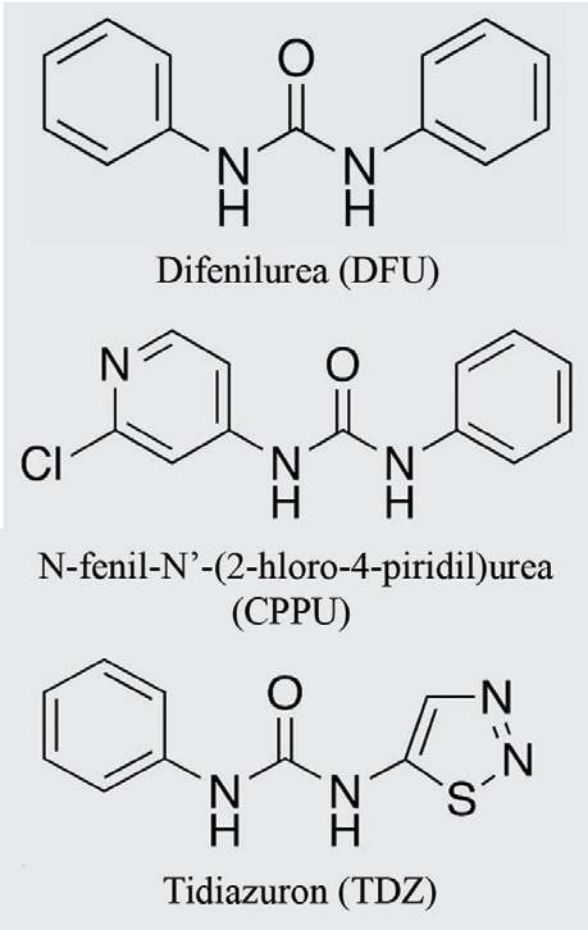
2. Aromatični citokinini – nastaju kada se za N^6 atom adenina veže aromatični prsten koji može biti supstituisan hidroksi- ili metoksi-grupom (Strnad, 1977). Prvi

aromatični citokinin BA (benzil-adenin) izolovan je iz topole početkom sedamdesetih godina XX veka (Horgan i sar, 1973; Horgan i sar, 1975), a nešto kasnije i iz kale *Zantedeshia* (Chaves das Neves i Pais, 1980), anisa (Ernst i sar, 1983), paradajza (Nandi i sar, 1989), *A. thaliana* (Tarkowska i sar, 2003). Još uvek nije u potpunosti jasno do koje mere se aromatični citokinini rasprostiru u biljnom svetu (Tarkowska i sar, 2003). Supstitucijom aromatičnog prstena hidroksi grupom nastaju hidroksil-derivari: *orto*-topolin (oT) i *meta*-topolin (mT), dok supstitucijom metoksi-grupom nastaju metoksi-derivati: *orto*-metoksitopolin (meoT) i *meta*-metoksitopolin (memT). Najveću aktivnost od svih derivata pokazuje *meta*-topolin. Hemijske strukture prirodnih aromatičnih citokinina prikazane su na **Slici 4**.



Slika 4. Hemijske strukture prirodnih aromatičnih citokinina (prema Sakakibara, 2006).

2. Sintetički citokinini – po svojoj hemijskoj strukturi predstavljaju derivate feniluree. Sintetički citokinini su supstance koje takođe imaju citokininski efekat, ali do danas nije otkriveno da se u biljnim tkivima sintetišu uobičajenim metaboličkim putevima. Prvi identifikovani sintetički citokinin bila je difenilurea (DFU), koju su davne 1955. godine otkrili Shantz i Steward. Neočekivano otkriće ovog jedinjenja stimulisalo je sintezu njegovih brojnih analoga, od kojih su najvažniji CPPU (*N*-fenil-*N*'-(2-hloro-4-piridil)urea) i TDZ (tidiazuron). Navedeni sintetički citokinini (**Slika 5**) visoko su stabilni i imaju jaču citokininsku aktivnost u poređenju sa zeatinom (Takahashi i sar, 1978; Mok i sar, 1982; Mok i sar, 1987; Shudo, 1994).



Slika 5. Hemijske strukture sintetičkih citokinina

1.4.1. Modifikacije prirodnih citokinina

Modifikacijom izoprenoidnog lanca koji je vezan za N^6 atom adenina, slobodne citokininske baze mogu biti prevedene u odgovarajuće nukleozide i nukleotide (Letham, 1994) i to u:

1. Ribozide (ribonukleozide) – nastaju vezivanjem riboze za N^9 atom adeninskog prstena
2. Ribotide (ribonukleotide) – nastaju vezivanjem ribozida preko $C^{5'}$ atoma riboze za jedan, dva ili tri fosfatna ostatka čime se dobija ribozid -5'- monofosfat (RMPs), ribozid -5'- difosfat (RDPs) ili ribozid -5'- trifosfat (RTPs)
3. *O*-glukozide ili *O*-ksilozide – nastaju vezivanjem glukoze ili ksiloze na neki od atoma kiseonika bočnog lanca slobodnog *trans*-, *cis*-zeatina ili dihidrozeatina, ali ne i njihovih ribozida ili ribotida.

Ove konverzije omogućavaju nespecifični enzimi koji uobičajeno učestvuju u fosforilaciji adenina, adenozina, AMP i ADP (Chen, 1997). Prevođenje slobodnih citokininskih baza u ribozide, ribotide, *O*-glukozide i *O*-ksilozide je reverzibilan proces. Deglukozilacija tj. vraćanje *O*-glukozida i *O*-ksilozida u slobodnu formu vrši enzim β-glukozidaza (Brzobohaty i sar, 1993).

Ribozilacija ima veoma važnu ulogu u transportu citokinina. Većinski transport citokinina vrši se kroz ksilem biljke u formi zeatin-ribozida (koji se potom u listovima aktivira ili inaktivira prevođenjem u slobodnu formu ili glukozide) i kroz floem biljke u formi iP-ribozida (Noodén i Lethman, 1993). Sa druge strane, *O*-glukolizacija ima veoma važnu ulogu u skladištenju rezervi citokinina. Važno je ponoviti da su *O*-glukozidi reverzibilni i stabilni i, što je najvažnije, otporni su na degradaciju citokinin-oksidazom/dehidrogenazom (Veach i sar, 2003).

Modifikacijom adeninskog prstena mogu nastati:

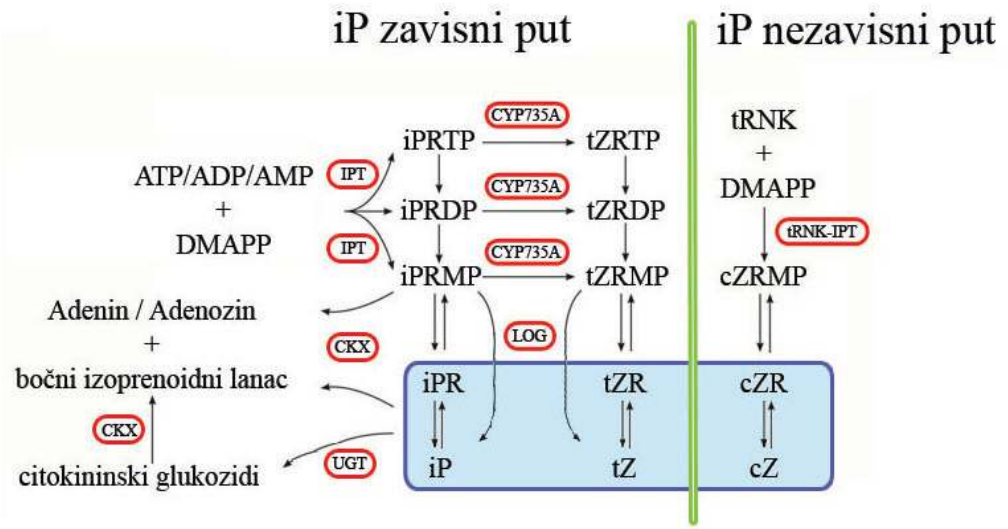
1. *N*-glukozidi – nastaju vezivanjem glukoze za neki od *N* atoma (N^3, N^7 ili N^9) adeninskog prstena citokinina, njihovih ribozida ili ribotida

2. lipinska kiselina – nastaje konjugacijom alanina za N^9 atom adeninskog prstena

N-glukolizacija i konjugacija sa alaninom je ireverzibilna reakcija što znači da se iz formiranih *N*-glukozidi i konjugata više ne mogu regenerisati slobodni citokinini. Iako se zna da su produkti modifikacije adeninskog prstena stabilni i dugoživeći molekuli, još uvek njihova biološka uloga nije u potunosti jasna (Hou i sar, 2004).

1.4.2. Metabolizam citokinina

Uprkos velikom broju informacija koje opisuju fiziologiju citokinina, još uvek se ne može pouzdano reći na koji način se citokinini sintetišu u biljkama. Mnoga značajna jedinjenja metaboličkog puta citokinina jesu identifikovana (**Slika 6**), međutim njihova uloga u regulaciji samog metaboličkog puta nije još uvek u potpunosti razjašnjena.



Slika 6. Šematski prikaz metabolizma citokinina kod biljaka (prema Werner i Schmülling, 2009). IPT – izopentil transferaza, CYP735As – membranska monooksigenaza, CKX – citokinin oksidaza/dehidrogenaza, UGT – glukoziltransferaza, tRNK-IPT – tRNK izopentil transferaza. Biološki aktivni citokinini označeni su plavom bojom.

1.4.2.1. Biosinteza citokinina

Citokinini se sintetišu u meristemu izdanka i mladim listovima, ali u najznačajnijoj meri sintetišu se u meristemu korena. Postoje dva puta u biosintezi citokinina: »iP zavisni put« i »iP nezavisni put«.

Prvi korak u sintezi prirodnih izoprenoidnih citokinina je vezivanje N^6 atoma adenozin 5'-fosfata (AMP, ADP ili ATP) za dimetilalil difosfat (DMAPP) ili hidroksimetilbutenil difosfat (HMBDP). Ova reakcija vrši se uz pomoć ključnog enzima biosinteze citokinina, izopentenil transferaze (IPT). Dugi niz godina mislilo se da su DMAPP i AMP jedini supstrati ovog enzima, međutim danas je već jasno da specifičnost supstrata enzima izopentenil transferaze zavisi od porekla samog supstrata kao i od biljne vrste. DMAPP je biološki izoprenoid koji nastaje kao produkt dva biosintetska puta, metileritritol fosfatnog (MEP) i mevalonatnog (MVA) puta (Astot i sar, 2000). Izopentenil transferaza prebacuje izopentenil grupu sa DMAPP na ADP ili ATP i tako nastaje ribotid forma biološki aktivnog citokinina iP, tj. izopentenil adenin ribonukleotid difosfat ili trifosfat (iPRDP ili iPRTP) (Kasahara i sar, 2004). Identifikacija prvog supstrata enzima izopentenil transferaze otkrivena je kod *Dyctiostelium discoideum* (Abe i sar, 1976).

U sledećem koraku iPRMP i iPRDP postaju supstrat za membranski enzim citohrom P450 monooksigenazu (CYP735As) koja vrši hidroksilaciju bočnog izopentenil lanca. Ovaj enzim kao supstrate koristi samo iPRMP i iPRDP, ali ne i iPRTP kao ni slobodne baze ni nukleozide (Takei i sar, 2004). Kao produkt ove reakcije nastaje *t*ZRMP odnosno *t*ZRDP. iPRMP i *t*ZRMP se, enzimom monofosfat fosforibohidrolazom (LOG), direktno konvertuju u odgovarajuće slobodne citokininske baze.

Pored ovog zavisnog, *t*Z može biti sintetisan i tzv. »iP nezavisnim putem«. Međutim, detaljni koraci ovog biosintetskog puta još uvek nisu u potpunosti poznati (Astot i sar, 2000). Kod *A. thalina* je pokazano da se *c*Z sintetiše »iP nezavisnim putem« tRNK-IPT enzimom koji kao supstrat koristi isključivo tRNK (Miyawaki i sar, 2006). Enzim *cis-trans* izomeraza vrši dalju interkonverziju *t*Z u *c*Z i obrnuto (Takei i sar, 2004).

Prva karakterizacija *IPT* gena urađena je kod *A. tumefaciens* (Akiyoshi i sar, 1984; Barry i sar, 1984). Otkriveno je da ova bakterija ima dva *IPT* gena: *Tmr* - koji se nalazi u T-DNK regionu i *Tzs* - koji se nalazi u virulentnom regionu Ti nopalinskog plazmida (John i Amasino, 1988; Powell i sar, 1988). Bakterijski enzim izopentenil transferaze kao supstrat koristi samo AMP za koji se vezuje HMBDP i tako nastaje tZRMP.

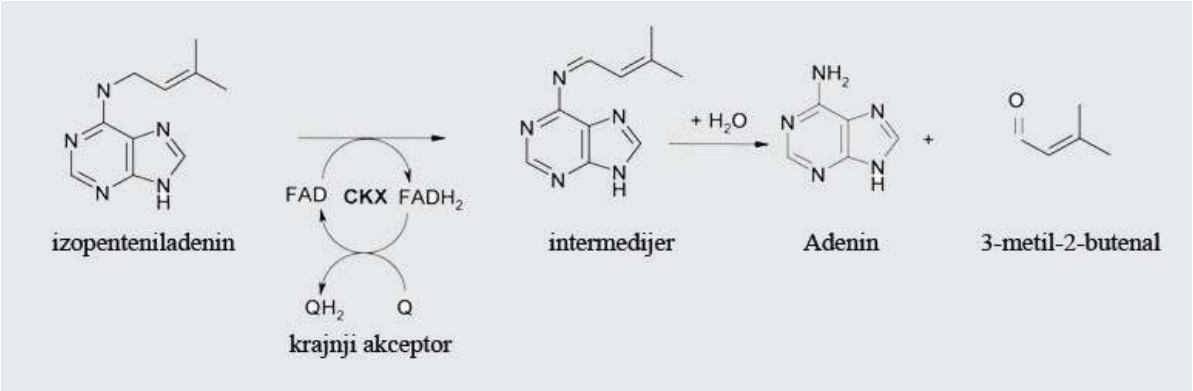
Tek posle dvadesetak godina identifikovani su *IPT* geni viših biljaka i to kod *A. thaliana* (Kakimoto, 2001; Takei i sar, 2001), petunije (Zubko i sar, 2002) i hmelja (Sakano i sar, 2004). U genomu *A. thaliana* otkriveno je 9 gena koji kodiraju enzim izopentenil transferazu. Gen *AtIPT2* predstavlja *tRNA-IPT*, a gen *AtIPT9* kodira protein sličan *tRNA-IPT* koji je pronađen kod cijanobakterija. Ostalih 7 gena (*AtIPT1* i *AtIPT3-8*) ima različitu tkivnu specifičnost i učestvuje u biosintezi citokinina. Na subćelijskom nivou detektovane su različite izoforme enzima izopentenil transferaze. Primećeno je da je ukupna količina ovog enzima najveća u plastidima, organelama koje predstavljaju najznačajniji izvor citokinina (Kasahara i sar, 2004). Međutim, još uvek nisu poznati mehanizmi translokacije citokinina kroz membrane plastida u citosol biljne ćelije.

Biosinteza i degradacija prirodnih aromatičnih citokinina (BA i topolina) još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se da je mehanizam glukozilacije aromatičnih citokinina, kao i njihova interakcija sa ćelijskim signalnim sistemom, veoma sličan kao kod prirodnih izoprenoidnih citokinina. Izgleda da enzimi i receptori koji su uključeni u navedene procese prepoznaju kako izoprenoidne tako i aromatične citokinine (Inoue i sar, 2001; Mok i Mok, 2001; Mok i sar, 2005; Yamada i sar, 2001).

1.4.2.2. Katabolizam citokinina

Tokom različitih stadijuma razvića u biljnim tkivima se ispoljava visok, ali promenljiv nivo ukupnih biljnih hormona citokinina. Smanjenje količine citokinina je u direktnoj vezi sa povećanjem aktivnosti enzima citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX). Ovaj enzim vrši ireverzibilnu degradaciju citokinina tako što uklanja bočni izoprenski lanac i na taj način onemogućava aktivnost samih citokinina. Kao produkt hemijske reakcije

razgradnje citokinina nastaju adenin i nezasićen aldehid 3-metil-2-butenal (McGaw i Horgan, 1983, **Slika 7**). Do danas, CKX je jedini poznati enzim koji učestvuje u katabolizmu specifičnih citokinina i samim tim on je ključni faktor u kontroli nivoa citokinina u biljnim tkivima. Na dejstvo CKX osetljivi su iP, *t*Z i njihovi nukleozidi, dok je *c*Z manje osetljiv (Galuszka i sar, 2007). Dugo se mislilo da *O*-glukozidi, DHZ, aromatični citokinini i njihovi derivati nisu osetljivi na dejstvo CKX (Armstrong, 1994; Van Staden i Crouch, 1996; Bilyeu i sar, 2001). Međutim, Galuszka i sar. su 2007. godine otkrili da aromatični citokinini, N^9-glukozidi i citokininski fosfati, ipak mogu biti supstrati za CKX.



Slika 7. Hemijska reakcija ireverzibilne degradacije citokinina CKX enzimom

Po hemijskoj strukturi CKX enzim je flavoprotein za koji je kovalentno vezan kofaktor flavin adenin dinukleotid – FAD (Schmülling i sar, 2003; Popelková i sar, 2004). Aktivnost CKX enzima stimuliše se povećanjem količine citokininskih supstrata.

CKX enzim prvi put je otkriven kod duvana (Pačes i sar, 1971), a vremenom je pokazano da je ovaj enzim široko rasprostranjen u biljnim tkivima. Izolovan je iz kukuruza (Whitty i Hall, 1974), tumornog tkiva vrste *Vinca rosea* (McGaw i Horgan, 1983), kalusnog tkiva *Phaseolus vulgaris* (Chatfield i Armstrong 1987, 1988), pšenice (Laloue i Fox, 1989) i kalusnog tkiva duvana i topole (Motyka i Kaminek, 1992).

CKX enzim kodiran je malom familijom gena čiji broj varira od vrste do vrste. Kod *A. thaliana* otkriveno je sedam gena koji su odgovorni za sintezu CKX enzima (*AtCKX1-7*).

Ovi geni se različito eksprimiraju u različitim biljnim tkivima (Werner i sar., 2003b, 2006). Pojedini *AtCKX* geni se eksprimiraju u istom tkivu ili u neposrednoj blizini tkiva u kojem se sintetišu citokinini (aksilarni pupoljci, trihomi i vaskularna tkiva). Kod pirinča je otkriveno 11 gena (*OsCKX1-11*) koji su odgovorni za sintezu CKX enzima. Geni koji kodiraju CKX enzim klonirani su još iz kukuruza (Houba-Hérin i sar, 1999; Morris i sar, 1999; Biley i sar, 2001; Massonneau i sar, 2004; Šmehilová i sar, 2009), orhideja roda *Dendrobium* (Yang i sar, 2002, 2003a; Wang i sar, 2009), ječma (Galuszka i sar, 2004), graška (Vaseva-Gemisheva i sar, 2005), pšenice (Feng i sar, 2008) i pamuka (Zeng i sar, 2011).

Genetičke transformacije biljaka specifičnim genima koji kodiraju CKX enzim (naročito *AtCKX* genima) koriste se u cilju proučavanja homeostaze citokinina. Na ovaj način dobijaju se biljke sa povećanom ekspresijom *CKX* gena i sniženom količinom endogenih citokinina, što može značajno uticati na metabolizam ukupnih endogenih citokinina u izdanku i korenu. Transgene *CKX* biljke mogu poslužiti kao dobar model sistem za proučavanje fizioloških i morfoloških procesa koji su pod kontrolom biljnih hormona citokinina. Uticaj ekspresije različitih *CKX* gena na metabolizam citokinina, do danas je ispitivan kod nekoliko biljnih vrsta, i to kod duvana (Werner i sar., 2001), *A.thaliana* (Werner i sar, 2003b; Yang i sar, 2003b), mahovine *Physcomitrella patens* (Von Schwartzenberg i sar, 2007), i krompira kod sorte Solara (Hartmann i sar, 2011) i sorte Désirée (Raspor i sar, 2012). Pokazano je da ekspresija *CKX* gena kod duvana i *A.thaliana* značajno utiče na fenotip transformisanih biljaka izazivajući tzv. sindrom nedostatka citokinina (*cytokinin deficiency syndrome*). Kod biljaka sa ovim sindromom smanjuje se apikalna dominacija, izdanci sporije rastu, smanjuje se veličina listova, biljke kasnije cvetaju i imaju manji broj cvetova. Takođe je zapažen pojačan rast korena, smanjenje veličine i aktivnosti apikalnog meristema izdanka, kao i povećanje veličine i aktivnosti apikalnog meristema korena. Navedeni simptomi su izraženiji kod biljaka u čiji genom je uved *AtCKX1* gen nego kod onih sa *AtCKX2* genom (Werner i sar, 2001, 2003b).

1.4.3. Fiziološka uloga citokinina

Sva ranija saznanja o citokininima potiču od egzogeno primenjivanih citokinina. Od specifičnih citokininskih transformanata, koji imaju snižen nivo endogenih citokinina, očekuje se da pomognu u rasvetljavanju procesa koji su pod kontrolom ove grupe biljnih hormona.

- **Citokini u izdanku**

Stimulišu funkciju apikalnog meristema izdanka i ćelijske deobe – Ova uloga citokinina otkrivena je davno (Skoog i Miller, 1957) i potvrđena je mnogo godina kasnije analizom transgenih *AtCKX* biljaka *A. thaliana* koje imaju snižen nivo endogenih citokinina. Kod ovih biljaka zapaženo je značajno smanjenje veličine apikalnog meristema izdanka što uzrokuje sporiji rast lisnih primordija. Poznato je da ćelijski ciklus reguliše familija ciklin-zavisnih protein kinaza. Ovi enzimi, fosforilacijom niza proteina, regulišu prelazak ćelije iz jedne u drugu fazu ćelijskog ciklusa. Ekspresija ovih enzima zavisna je od citokinina (Zhang i sar, 1996). Citokini stimulišu ćelijski ciklus još jednim mehanizmom, povećavaju ekspresiju *CYCD3* gena koji kodira ciklin tipa D. Pomenuti protein je ključni faktor prelaska ćelijskog ciklusa iz G_1 u S fazu (Dewitte i sar, 2007). Ultrastrukturalnom analizom ćelija apikalnog meristema izdanka transgenih *AtCKX* biljaka *A. thaliana*, uočene su jasne citološke promene koje ukazuju na zaustavljanje ćelijskih deoba i ubrzanu diferencijaciju ćelija (Werner i sar, 2008).

Regulišu razviće vaskularnih elemenata – Optimalna koncentracija citokinina zajedno sa auksinima utiče na formiranje floema (Aloni, 1995). U izdancima transgenih *AtCKX* biljaka *A. thaliana* pokazano je da su ksilem i floem redukovani (Werner i sar, 2003b).

Kontrolišu formiranje i rast lista – Ekspresija *CKX* gena kod transgenih *AtCKX* biljaka *A. thaliana* značajno redukuje površinu lista i utiče na rani završetak diferencijacije ćelija lista, što je svakako u vezi sa deobama ćelija koje su prethodno opisane (Werner i sar, 2003b).

Odlažu senescenciju – Senescencija je proces razgradnje proteina, lipida, RNK i hlorofila i predstavlja završnu fazu u životu listova. Prvi simptom senescencije predstavlja degradacija hlorofila u listovima. Određivanje smanjenja količine hlorofila može pomoći u ranom otkrivanju senescencije. Pokazano je da citokinini ne mogu u potpunosti sprečiti, ali mogu značajno odložiti proces senescencije (Gan i Amasino, 1995). Samim tim može se pretpostaviti da snižena količina citokinina ubrzava senescenciju. Uprkos ovim očekivanjima, listovi transgenih *AtCKX* biljaka *A. thaliana* nisu pokazali ubrzanu senescenciju (Werner i sar, 2003b).

Utiču na reproduktivni razvoj – O ulozi citokinina tokom reproduktivnog razvoja biljke svedoče transgene *AtCKX* biljke *A. thaliana* koji formiraju manji broj cvetova (Werner i sar, 2003b). Kod ovih biljaka takođe su uočeni povećani embrioni što ukazuje na verovatnu ulogu citokinina u ćelijskim deobama tokom embriogeneze. Povećani embrioni mogli bi se objasniti ekspresijom *CKX* gena koja se dešava tek u kasnijim stadijumima embriogeneze (Custers i sar, 1999).

- **Citokinini u korenu**

Inhibiraju funkciju apikalnog meristema korena – Za razliku od izdanka, citokinini inhibiraju funkciju apikalnog meristema korena. Transgene *AtCKX* biljke *A. thaliana* potvrđuju da snižen nivo citokinina jača korenov sistem, tj. stimuliše izduživanje glavnog i bočnih korenova. Rast glavnog korena je u direktnoj vezi sa intenzivnim ćelijskim deobama u meristemu korena transgenih *AtCKX* biljaka *A. thaliana* (Werner i sar, 2003b). Rezultati dobijeni na prethodno pomenutim transformantima saglasni su sa rezultatima Beemster i Baskin-a koji su 2000. godine pokazali da egzogeno primenjeni citokinini inhibiraju izduživanje korena netransformisanih biljaka smanjenjem veličine apikalnog meristema korena kao i smanjenjem broja ćelijskih deoba.

Inhibiraju grananje korena – Poznato je da višak auksina u odnosu na citokinine podstiče rastenje korena. Brojna istraživanja su pokazala da grananje korena zavisi od polarnog transporta auksina (Ruegger i sar, 1997; Reed i sar, 1998; Casimiro i sar, 2001). Potvrđeno je da *stm1* mutant *A. thaliana* kojem je snižen endogeni nivo auksina u izdanku

ima manji broj korenova u poređenju sa netransformisanim biljkama (Casimiro i sar, 2001). Biljke transformisane *CKX* genima imaju izdanke sa sniženim nivoom citokinina i moglo bi se očekivati da im je inhibirano grananje korena. Međutim, iznenađujuće je da transgene *AtCKX* biljke *A. thaliana* razvijaju brojne bočne korenove koji se brzo izdužuju (Werner i sar., 2003b). Ovo otkriće ukazuje na to da citokinini i auksini, kada je u pitanju formiranje bočnih korenova, deluju antagonistički.

Stimulišu razviće vaskularnih elemenata u korenu – Jedini proces koji citokinini stimulišu u korenu je razviće ksilema i floema. Potvrđeno je da mutacija citokininskog receptora *A. thaliana* sprečava razvoj floema u korenu. U prvoj fazi diferencijacije nastaje ksilem i usled nedovoljnog broja vaskularnih stem-ćelija u korenu ne dolazi do razvijanja floema (Mähönen i sar, 2000).

1.4.3.1. Interakcija citokinina i auksina

Od kada su otkriveni, pokazano je da citokinini i auksini međusobno intereaguju tokom nekoliko fizioloških i razvojnih procesa biljaka uključujući apikalnu dominaciju, regulaciju ćelijskog ciklusa, grananje korena, regulaciju senescencije i razviće vaskularnih elemenata (Coenen i Lomax, 1997; Swarup i sar, 2002). Interakcija citokinina i auksina može biti sinergistička, kao što je u slučaju regulacije ćelijskog ciklusa, ili antagonistička, kao što je u slučaju regulacije razvića meristema aksilarnih pupoljaka i grananja korena. Ispitivanje interakcije citokinina i auksina vrši se već dugi niz godina. Prva istraživanja zasnivala su se na odstranjivanju biljnog organa u kojem se određeni biljni hormon sintetiše i na dalje praćenje razvojnih procesa biljke. Vremenom, naprednija istraživanja su omogućila dobijanje transgenih biljaka koje hiperprodukuju citokinine i auksine (Klee i Estelle, 1991; Klee, 1994; Davies, 1995). Može se reći da je odnos citokinina i auksina prilično međusobno zavisan. U većini slučajeva promena endogenog nivoa jednog biljnog hormona utiče na promenu endogenog nivoa drugog (Coenen i Lomax, 1997). Generalno, može se reći da **auksini negativno utiču na nivo citokinina**, tj. porast nivoa auksina utiče na sniženje nivoa citokinina i obrnuto. Tako je kod *iaaM* i *iaaH* mutanata duvana pokazano

da porast nivoa endogenih auksina utiče na sniženje nivoa citokinina (Eklöf i sar., 1997). Auksini utiču na snižavanje nivoa citokinina na dva načina, i to tako što stimulišu CKX aktivnost (Palni i sar, 1988; Zhang i sar, 1995) ili onemogućavaju *de novo* sintezu citokinina (Nordström i sar., 2004). Ovu teoriju da auksini negativno utiču na citokinine potvdili su i *ipt* mutanti graška koji imaju povećanu količinu sintetisanih citokinina, a značajno sniženu količinu auksina (Tanaka i sar, 2006).

Međutim, takođe je pokazano da je uticaj citokinina na nivo auksina prilično promenljiv. U nekim slučajevima **citokinini pozitivno utiču na količinu auksina**, tj. povećanje količine citokinina utiče na povećanje nivoa auksina i obrnuto. Tako npr. kod *ipt* mutanata *Nicotiana glutinosa* povećanje nivoa citokinina uzrokuje povećanje količine slobodne IAA (Binns i sar, 1987). Egzogena primena citokinina utiče na porast nivoa IAA u korenu kukuruza i graška (Bourquin i Pilet, 1990; Bertell i Eliasson, 1992). Takođe je pokazano da kod *A. thaliana* povećana aktivnost CKX enzima snižava nivo endogenih citokinina što utiče na smanjenje količine endogenih auksina (Werner i sar, 2001; Jones i sar, 2010).

Ipak, postoji i nekoliko istraživanja koja ukazuju na suprotan efekat, a to je da **citokinini negativno utiču na nivo auksina**. Pokazano je da kod *ipt* mutanata duvana i *A. thaliana* povišen nivo citokinina utiče na smanjenje količine IAA (Eklöf i sar, 1997; Nordström i sar, 2004). Negativan uticaj citokinina na nivo auksina potvrđen je i kod *pls* mutanata *A. thaliana* (Liu i sar, 2010).

Iz svega navednog može se zaključiti da je odnos citokinina i auksina prilično zavisan i složen. Ipak, potvrđeno je da je regulacija biosinteze citokinina posredstvom auksina brza i direktna, dok je regulacija količine IAA posredstvom citokinina spora i indirektna (Nordström i sar, 2004).

1.5. Sekundarni metaboliti biljaka

Primarni metaboliti su jedinjenja koja nastaju kao rezultat različitih biohemijskih reakcija u ćeliji i služe kao gradivne supstance za dalju biosintezu molekula. U primarne metabolite spadaju aminokiseline, nukleotidi, vitamini, svi intermedijeri koji nastaju u procesu glikolize itd. Prema Luckner (1977) sekundarni metaboliti nastaju kao proizvod biosinteze, transformacije i degradacije endogeno proizvedenih komponenata. Primarni metabolizam je definisan kao univerzalan, konzervativan i neophodan za normalno funkcionisanje biljnog organizma, dok je sekundarni metabolizam jedinstven, prilagodljiv i nebitan za rastenje i razviće, ali veoma važan za opstanak organizma u celini (Hartmann, 1996). Za razliku od životinja, koje najveći deo sekundarnih metabolita izbacuju ekskrecijom, biljke akumuliraju produkte sekundarnog metabolizma van ćelija ili u metabolički neaktivnim komponentama (Conn i sar, 1991). Većina ovih prirodnih proizvoda nastaje u kasnim fazama razvoja i nema ključnu ulogu u osnovnim životnim procesima same biljke. Sekundarni metaboliti obuhvataju različita hemijska jedinjenja kao što su antibiotici, steroidi, alkaloidi i niz drugih jedinjenja koja imaju veoma važnu ulogu u interakciji biljaka, mikroorganizama i životinja. Poznato je da se biljke sekundarnim metabolitima štite od napada bakterija i gljiva (protektanti), raznih štetočina (repelenti), ali njima i privlače insekte za oprašivanje (atraktanti) (Wilson, 1990). Sekundarni metaboliti su prvo nađeni kod viših, a kasnije i kod nižih biljaka, a takođe i u bakterijama i gljivama.

Biljke proizvode ogroman broj sekundarnih metabolita. Do danas je otkriveno više od 100 000 produkata sekundarnog metabolizma koje produkuju različite biljne vrste, a očekuje se da će se u međuvremenu otkriti još novih (Hadacek, 2002). Produkti sekundarnog metabolizma biljaka imaju široku primenu u medicini, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, poljoprivredi, industriji hrane itd. Poslednjih 60 godina većina ovih veoma važnih jedinjenja zamenjena je sintetičkim, ali biljke su i dalje ostale najvažniji izvor mnogih komponenata koje je teško ili neekonomično dobijati na neki drugi način.

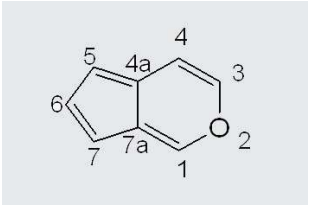
Biljne vrste familije *Gentianaceae* karakteriše prisustvo tri vrste sekundarnih metabolita: iridoidi, ksantoni i flavonoidi. U ovom radu detaljnije će biti reči samo o

iridoidima i ksantonima jer su to sekundarni metaboliti koji preovlađuju u vrstama roda *Centaurium*.

1.5.1. Iridoidi

Naziv iridoid potiče od iridoidala, iridomirmecina i drugih srodnih jedinjenja koja su izolovana iz odbrambenog sekreta koji luče australijski mravi vrste *Iridomyrmex detectus* (Cavill i sar, 1956; Cavill i Ford, 1960).

Iridoidi su prirodna jedinjenja koja pripadaju klasi monoterpena. Široko su rasprostranjeni u biljnom svetu i mogu se naći u oko 60 biljnih familija, među kojima je i familija *Gentianaceae*. Do danas je identifikovano više do 1200 različitih iridoida i sekoiridoida (Rodriguez i sar, 1998). Osnovnu strukturu iridoida čini ciklopenta-(c)-piranski prsten (**Slika 8**).



Slika 8. Osnovna struktura iridoida (ciklopenta-(c)-piranski prsten).

Iridoidi se u prirodi javljaju kao glukozidi ili estri (Junior, 1990). Na osnovu hemijskih osobina i biosinteze, oni se dele na šest grupa:

1. **Iridoidi** – osnovni skelet ove grupe čini iridoidal koji se javlja u dialdehidnoj ili poluacetalnoj formi. Na osnovu broja C-atoma u osnovnom skeletu iridoidi se dele na C8 iridoide (predstavnik je unedozid), C9 iridoide (aukubin i katalpol) i C10 iridoide (loganin i asperulizid).
2. **Sekoiridoidi** – imaju otvoren osnovni iridoidni prsten između sedmog i osmog C-atoma (lat. *seco, secare* = prekinuti, otvoriti). Sekoiridoidi se javljaju kod četiri familije: *Gentianaceae*, *Apocinaceae*, *Rubiaceae* i *Oleaceae*. Sverozid,

sverciamarin i genciopikrin (**Slika 9**) tipični su sekoiridoidi koje karakteriše prisustvo δ-laktonske strukture. Rasprostranjeni su u vrstama roda *Gentiana* i *Centaurium*.

3. **Dimerni iridoidi** – kod ovih jedinjenja dva iridoidna molekula povezana su estarskom vezom. Predstavnik ove grupe iridoida je argiliozid izolovan iz vrste *Argylia radiata*.
4. **Bisglikozidni iridoidi i sekoiridoidi** – ova jedinjenja sastoje se od sekoiridoidne jedinice i iridoidnog laktona sa C9 skeletom koji su povezani estarskom vezom.
5. **Dimerni sekoiridoidi** – kod ovih jedinjenja dva iridoidna molekula povezana su C-C vezom. Tipičan predstavnik ove grupe jedinjenja je centaurozid koji je izolovan iz *C. erythraea*.
6. **Iridoidi konjugovani sa monoterpenima** – prvo jedinjenje ovog tipa, amarelozid, izolovano je iz vrste *Tecoma dirysantha* (*Bignoniaceae*). Sastoji se iz 6-epiaukubina koji je estarski povezan sa monoterpenom geraniol-tipa.

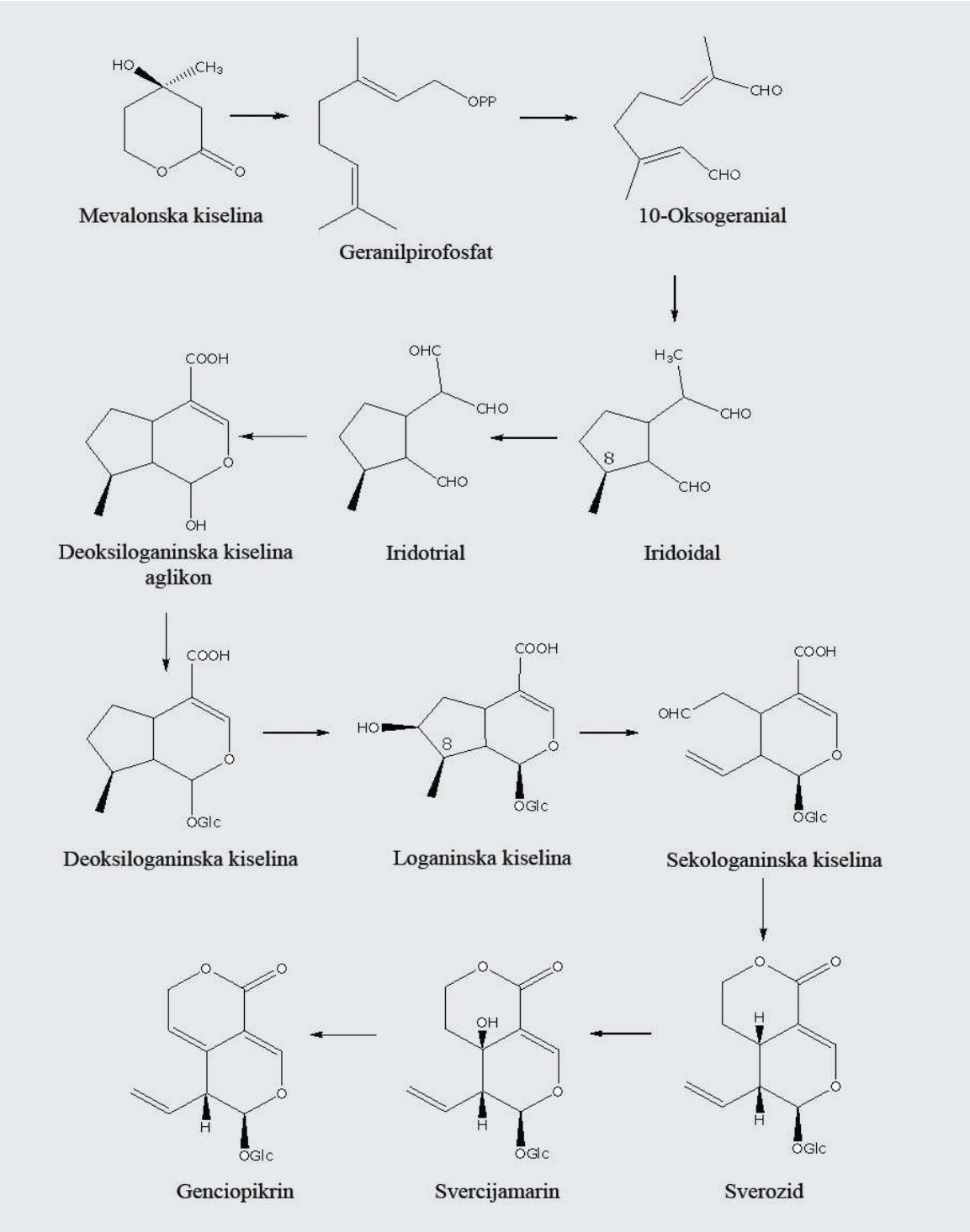
1.5.1.1. Biosinteza iridoida

Iridoidi po hemijskoj strukturi pripadaju monocikličnim monoterpenima. Svi molekuli terpena i steroida vode poreklo od acetata odnosno acetil-koenzima A (acetil-CoA) i nastaju u tzv. putu mevalonata. Kondenzacijom tri molekula acetil-CoA, a zatim i redukcijom tako nastalog jedinjenja, 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA), pomoću NADPH u prisustvu HMG-CoA reduktaze nastaje mevalonska kiselina. Utvrđeno je da je biološki aktivna samo *R*-mevalonska kiselina. Fosforilacijom ove kiseline nastaje izopentenil-pirofosfat. Ovo jedinjenje ima pet C-atoma i osnovna je jedinica u biosintezi terpena i steroida. Enzimskom izomerizacijom izopentenil-pirofosfata nastaje prenil-difosfat. Polimerizacijom prenil-difosfata i izopentenil-pirofosfata nastaje glavni prekursor u biosintezi iridoida geranil-pirofosfat (prema Grujić-Injac i Lajšić, 1983). Hidroksilacijom geranil-pirofosfata u položaju 10 nastaje 10-hidroksi-geraniol. Od ovog trenutka biosinteza ide u dva pravca: jedan vodi ka ciklizaciji u iridoidal koji kasnije daje niz iridoidalnih

glikozida, dok drugi vodi ka izomerizaciji 10-hidroksi-geraniola u 10-hidroksi-nerol. Od 10-hidroksi-nerola i 10-hidroksi-geraniola nastaje molekul loganina (Coscia i Guarnaccia, 1968). Kod biljnih vrsta familije *Gentianaceae* naročito je važan dalji biosintetski put koji ide u pravcu formiranja struktura sekologaninskog tipa (Inouye i Uesato, 1986; Jensen, 1991). Otvaranjem ciklopentanskog prstena loganina između sedmog i osmog C-atoma formira se intermedijer iz kojeg nastaje sekologanin koji se dalje transformiše do sverozida, sverciamarina i na kraju do genciopikrina koji se najčešće sreću kod vrsta roda *Centaurium* (**Slika 9**). Iridoidi koji su do danas otkriveni kod kičice prikazani su u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Iridoidi koji se sintetišu kod vrste *C. erythraea* (modifikovano prema Jensen i Schripsema, 2002)

IRIDOIDI	Autori
Karbociklični iridoidi:	Do i sar, 1987 Rulko i Witkiewicz, 1972 Sakina i Aota, 1976 Tagaki i sar, 1982 Van der Sluis i sar, 1983 Van der Sluis i Labadie, 1981
6' – *m* – hidroksibenzologanin dihidrokomin	
Sekoiridoidi:	
1. Glikozidi sekologaninske kiseline: Sekologanin Centaurozid	
2. Sverozid i derivati: Sverozid Deacetilcentapikrin Centapikrin	
3. Sverciamarin	
4. Genciopikrin i derivati: Genciopikrin Gencioflavon Gencianin	



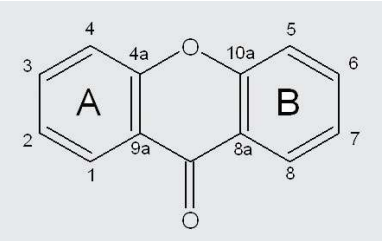
Slika 9. Šema biosinteze sekoiridoida kod vrsta koje pripadaju familiji *Gentianaceae* (modifikovano prema Jensen i Schripsema, 2002).

1.5.1.2. Biološka svojstva iridoida

Iridoidi su gorka jedinjenja. Pored slobodnih, biljke sintetišu i estre glukozida (centapikrin i deacetilcentapikrin) koji imaju nekoliko hiljada puta veću gorčinu i najčešće su smešteni u plodovima. Iridoidi se uglavnom koriste kao stimulatori sekrecije želudačnih i crevnih sokova pa tako povećavaju apetit i poboljšavaju varenje hrane (Martindale, 1982). Iridoidi takođe deluju antikancerogeno (alamandin), antimikrobno (aglikon aukubigenin), antifungalno i sedativno (Bhattacharya i sar, 1976; Liang i sar, 1982; Yamamura i sar, 1991; Zhou, 1991; Kondo i sar, 1994, Kumarasamy i sar, 2003a, 2003b). Mnogi iridoidni glukozidi deluju kao diuretici (Haloui i sar, 2000).

1.5.2. Ksantoni

Pored iridoida, u vrstama roda *Centaurium* kao produkti sekundarnog metabolizma sintetišu se i ksantoni. Ime su dobili od grčke reči *xantea* što znači *žuto*. Ksantoni su grupa prirodnih jedinjenja koja pripadaju klasi biljnih polifenola i karakterišu se dibezo-γ-pironskom strukturom (Mandal, 1992, **Slika 10**).



Slika 10. Osnovna struktura ksantona

Po hemijskoj strukturi ksantoni su slični flavonoidima, ali za razliku od flavonoida koji su široko rasprostranjeni u biljnom svetu, ksantoni su prisutni u relativno malom broju familija. Svi do sada poznati ksantoni sintetišu se u vrstama samo osam familija: *Gentianaceae*, *Guttiferae*, *Polygalaceae*, *Leguminosae*, *Lythraceae*, *Moraceae*,

Loganiaceae i *Rhamnaceae* (Hostettman i Hostettman, 1989). Familije sa najvećim brojem ksantona su *Gentianaceae* (identifikovano je više od 110 ksantona i većina su tetrasupstituisani) i *Guttiferae*.

Na osnovu hemijske strukture ksantoni su podeljeni u pet grupa (Peres i sar., 2000):

1. Prosti ksantoni (mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, heksa-supstituisani)
2. Ksantonski glikozidi (*O*- i *C*- glukozidi)
3. Prenilovani ksantoni
4. Ksantonolignoidi
5. Ksantoni sa neobičnim tipom supstitucije

Vrste roda *Centaurium* sadrže tetra-, penta- i heksasupstituisane ksantone u slobodnom obliku (aglikoni) ili u obliku *O*-glukozida. Svi navedeni supstituisani ksantoni nastaju od 1,3,5- ili 1,3,7-trihidroksiksantona. U **Tabeli 6** prikazani su ksantoni koji su do danas otkriveni kod kičice.

Ksantoni, pored svoje farmakološke vrednosti, imaju važnu ulogu i u hemotaksonomiji gde se koriste kao sistematski markeri (Hostettman i Hostettman, 1989).

Tabela 6. Ksantoni koji se sintetišu kod vrste *C. erythraea* (modifikovano prema Jensen i Schripsema, 2002). Brojevi u tabeli označavaju mesta supstitucije hidroksilne grupe.

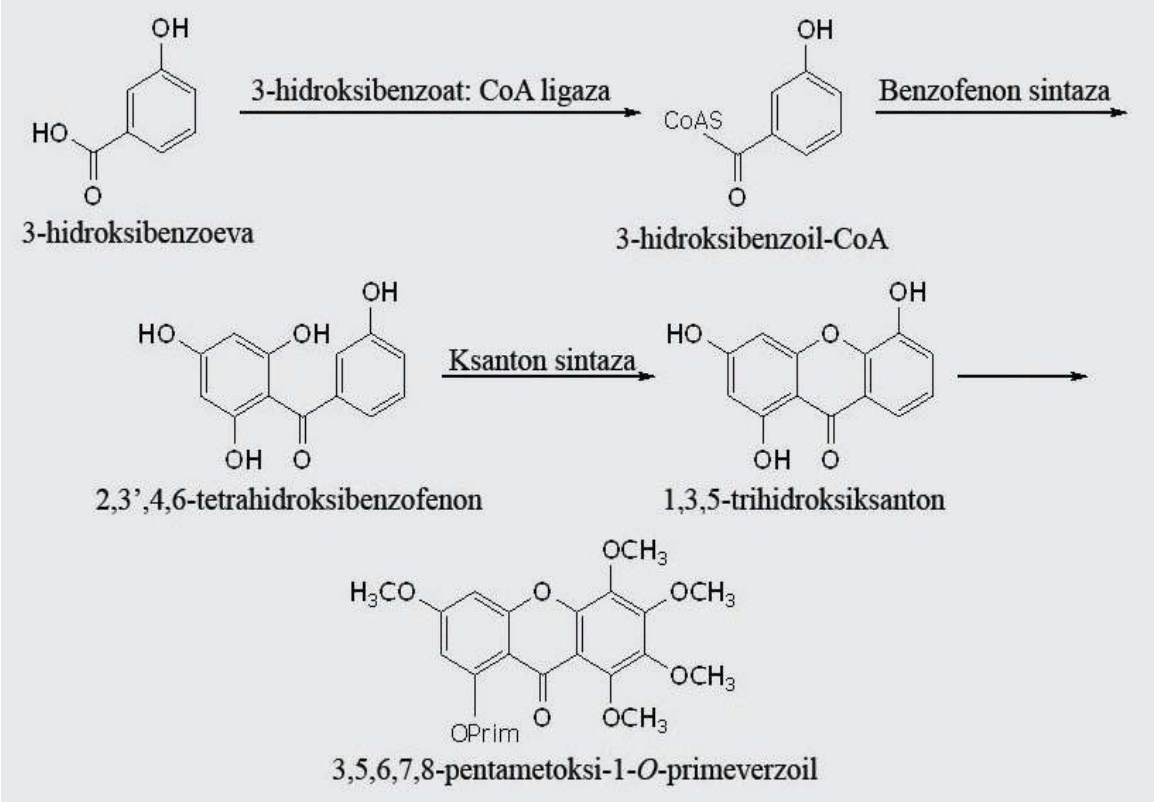
TRI-, TETRA-, PENTA- I HEKSA-SUPSTITUISANI KSANTONI	
1,3,5 – trihidroksiksanton	1,3,5,6 → 1,3,5,6,7 → 1,3,5,6,7,8 1,3,5,8 → 1,3,5,6,8
1,3,7 – trihidroksiksanton →	1,3,7,8
Autor Kaouadji i sar., 1986	

1.5.2.1. Biosinteza ksantona

Biosinteza biljnih fenola odvija se na dva načina: 1. šikimatnim putem tj. acetatnim mehanizmom kada do sinteze fenola dolazi iz nearomatičnih prekursora i 2. transformacijom monomernih fenolnih jedinjenja u visokomolekulska jedinjenja fenolnog tipa. Kod nižih biljaka do sinteze fenola prvenstveno dolazi acetatnim putem, dok je šikimatni put favorizovan isključivo kod viših biljaka kod kojih često dolazi i do objedinjavanja oba sintetska puta, što je slučaj u biosintezi flavonoida i ksantona. U reakciji biosinteze ksantona dolazi do kondenzacije molekula koji potiču iz šikimatnog puta i stvara se benzofenon ili neki intermedijer sličan benzofenonu, koji onda reaguje intramolekulski i formira ksantone (Atkinson i sar, 1968). Mehanizmi intramolekulske reakcije uključuju direktno oksidativno kuplovanje, dodavanje hinona, dehidrataciju između hidrokslinih grupa u prstenovima ili formiranje spirodienona (Carpenter i sar, 1969). Od svih predloženih modela formiranja ksantona, oksidativno kuplovanje fenola najčešće se smatra odgovornim za veliki broj varijacija i zajedničkih pojavljivanja oksidativnih derivata ksantona.

Utvrđeno je da se u kulturi ćelija vrste *Hypericum androsaemum* kao početni molekuli u biosintezi ksantona javljaju benzoeva kiselina i 3-hidroksibenzoeva kiselina. Oba molekula su supstrati za enzim 3-hidroksibenzoat CoA ligazu (Abd el Mawla i sar, 2001). Međutim, kod vrste *C. erythraea*, jedini prekursor u biosintezi ksantona je 3-hidroksibenzoeva kiselina. Pošto benzoeva kiselina i fenilalanin nisu inkorporirani u ksantonski skelet, pretpostavlja se da se 3-hidroksibenzoeva kiselina formira direktno iz šikimatnog puta (Schmidt i Beerhues, 1997). Ovo je kasnije i potvrđeno proučavanjem retrobiosinteze u kulturi korenova vrste *Swertia chirata* (Wang i sar, 2003). Enzim 3-hidroksibenzoat CoA ligaza prevodi 3-hidroksibenzoevu kiselinu u 3-hidroksibenzoil-CoA, koji se potom kondenzuje sa tri molekula malonil-CoA i nastaje 2,3',4,6-tetrahidroksi benzofenon (Peters i sar, 1997). Reakciju katalizuje enzim benzofenon sintaza (**Slika 11**). Tetrahidroksi-benzofenon se zatim kupluje u *orto* položaju u odnosu na 3'-OH grupu. Benzofenon se dalje ciklizuje i nastaje 1,3,5-trihidroksi ksanton. Reakcija ciklizacije

benzofenona je katalizovana membranskim enzimom ksanton sintazom za čiju aktivnost je neophodno prisustvo NADPH i O_2, što ukazuje na povezanost sa citohromom P_{450}. Zato se pretpostavlja da je ksanton sintaza u stvari citohrom P_{450} oksidaza. Nastali ksanton je supstrat za ksanton 6-hidroksilazu koja ga prevodi u 1,3,5,6-tetrahidroksi ksanton koji dalje podleže reakcijama hidroksilacije i/ili metilacije.



Slika 11. Šema biosinteze ksantona kod kičice (modifikovano prema Peters i sar, 1998).

1.5.2.2. Biološka svojstva ksantona

Do danas je iz 110 biljnih vrsta izolovano preko 100 različitih ksantonskih jedinjenja (Jensen i Schripsema, 2002). Ksantoni imaju različita farmakološka dejstva i potvrđeno je da deluju antidepresivno, antimutageno i antitumorno. U današnje vreme

takođe se ispituje uticaj prirodnih i sintetičkih ksantona na centralni nervni sistem i na rast ćelija tumora.

Monoaminooksidaza (MAO) je enzim koji katalizuje oksidativnu dezaminaciju neurotransmitera (serotonina, noradrenalina i dopamina) i time ova jedinjenja proizvode amonijak i samim tim gube svoju biološku aktivnost. MAO je flavoprotein koji kao koenzim sadrži flavin-adenin-dinuleotid (FAD). Ksantonska jedinjenja deluju inhibitorno na MAO enzim čime se sprečava razgradnja i pojačava transmisija serotonina i noradrenalina u centralnom nervnom sistemu čime se postiže antidepresivni efekat. Ispitivano je nekoliko vrsta ksantona iz familije *Gentianaceae* i *Guttiferae* i pokazano je da postoji razlika u izoenzimskoj selektivnosti (Schaufelberger i Hostettmann, 1988). Međutim, još uvek se ne zna kojim mehanizmom ksantoni inhibiraju MAO enzim. Pretpostavlja se da intereaguju sa FAD kofaktorom i na taj način remete normalan prenos elektrona do enzima (Moureau i sar, 1994).

Ksantoni takođe imaju veoma važnu antioksidativnu ulogu jer uklanjaju reaktivne kiseonične vrste koje dovode do destrukcije ćelijskih komponenti što rezultuje raznim zapaljenjima, pojavom tumora itd.

Mono-, di-, tri- supstituisani ksantoni inhibiraju rast humanih tumorskih ćelijskih linija i proliferaciju T limfocita (Pedro i sar, 2002). Ksantoni imaju antifungalnu i antibakterijsku aktivnost. Iz vrste *Garcinia nigrolineata* izolovan je ksanton koji deluje antibakterijski na *Staphylococcus aureus* (Rukachaisirikul i sar, 2003). Kineski istraživači su iz vrste *Swertia franchetiana* izolovali ksanton sverciafrančezid koji je pokazao jaku HIV inhibitornu aktivnost (Wang i sar., 1994). HIV inhibitorni potencijal takođe pokazuju ksantoni izolovani iz biljne vrste *Maclura tinctoria* (Groweiss i sar, 2000).

Ksantoni su dobri antimalarijski agensi, imaju antihipertenzitivnu aktivnost i kardioprotektivno i antimutageno dejstvo. Iz izdanka vrste *C. erythraea* izolovana su dva ksantonska derivata, eustomin i demetileustomin. Ova dva jedinjenja imaju izražene antimutagene osobine na bakteriju *Salmonella typhimurium* (Schimmer i Mauthner, 1996). Iz vrsta *Swertia japonica* i *S. chirata* izolovani su ksantoni koji snižavaju nivo šećera u krvi pacova.

Zbog svih navedenih bioloških karakteristika može se reći da ksantoni danas predstavljaju značajan izvor biljnog materijala u proizvodnji novih lekova. Posebno treba uzeti u obzir da imaju širok spektar biološkog dejstva, skoro su netoksični i imaju vrlo malo sporednih efekata. Zbog toga su istraživanja poslednjih godina usmerena ka određivanju mehanizama njihovog farmakološkog dejstva na biohemijskom nivou.

1.5.3. Sekundarni metaboliti kičice *in vitro*

Sekundarni metaboliti izoluju se iz biljaka koje rastu na prirodnim staništima ili iz plantažno gajenih biljaka. Gajenje biljaka u cilju dobijanja aktivnih supstanci često se nije pokazalo kao uspešno ili ekonomski isplativo. Iz tog razloga bilo je neophodno pronalaženje alternativnih metoda za proizvodnju korisnih jedinjenja biljnog porekla. Jedna od tih metoda je kultura biljnih ćelija i tkiva. Ova metoda obezbeđuje homogeni i kontinuirani izvor biljnog materijala, koji je nezavisan od klimatskih uslova i mnogih uzročnika bolesti. Prema Staba (1980) šezdesetih godina XX veka prvi put je eksperimentalno pokazano da biljke, često u maloj količini, proizvode sekundarne matabolite *in vitro*. U godinama koje slede intenzivno se proučavao sastav hranljivih podloga i selekcija visoko produktivnih linija i dostignut je vrlo visok stepen produkcije. Tako se već osamdestih godina XX veka znalo za najmanje trideset komponenti koje se u biljkama *in vitro* akumuliraju u istoj ili čak većoj količini od biljaka iz prirode (Zafar i sar, 1992).

Kičica je vrsta koja u *in vitro* uslovima zadržava sposobnost biosinteze sekundarnih metabolita. Glavni produkti sekundarnog metabolizma kičice su gorki glukozidi (sverozid, sverciamarin i genciopikrin) i ksantoni (eustomin i demetileustomin). Svi navedeni sekundarni metaboliti izolovani su iz izdanaka i korenova biljaka iz prirode i kulture. Pokazano je da je u izdancima i korenovima biljaka sa prirodnih staništa sverciamarin dominantna komponenta, dok je u uslovima *in vitro* u oba biljna organa genciopikrin dominantan sekoiridoid, a sverciamarin je detektovan samo u tragovima (Van der Sluis, 1985a, 1985b; Janković i sar, 1997; Piatczak i sar, 2005). Zajedničko za biljke iz prirode i

uslova *in vitro* je da sintetišu veću količinu ksantona u korenovima u odnosu na izdanke. Međutim, primećuje se značajan porast količine ovih sekundarnih metabolita u izdancima i korenovima gajenim *in vitro* u odnosu na biljke iz prirode (Janković i sar, 2000).

Akumulacija sekundarnih metabolita *in vitro* zavisi od sastava hranljive podloge, vrste i količine egzogeno primenjenih regulatora rastenja, mineralnih elemenata i ugljenih hidrata (Stafford i sar, 1986). Uticaj regulatora rastenja na proizvodnju sekundarnih metabolita kičice *in vitro* proučavali su Janković i sar. (2000) koji su pokazali da je količina sintetisanog eustomina zavisna od koncentracije citokinina BA u hranljivoj podlozi. Izdanci gajeni na hranljivoj podlozi obogaćenoj čak i sa najmanjom koncentracijom BA (3 μmol/l) sintetišu veću količinu ksantona nego izdanci iz prirode. Saharoza takođe značajno utiče na proizvodnju sekundarnih metabolita. Povećana akumulacija sverozida, sverciamarina, genciopikrina, eustomina i demetileustomina postignuta je gajenjem biljaka na hranljivim podlogama koje su obogaćene različitim koncentracijama saharoze (Janković i sar, 2000).

Literaturnih podataka o sekundarnim metabolitima genetički transformisanih biljaka kičice skoro i da nema. Janković i sar. (2002) su uočili da korenovi kičice transformisani pomoću *A. rhizogenes* (soj A4M70GUS) sintetišu samo ksantone. Transgeni izdanci kičice regenerisani posle transformacije pomoću *A. rhizogenes* (soj LBA9402) sintetišu dva puta veću količinu ukupnih sekoiridoida u odnosu na netransformisane izdanke (Piatczak i sar, 2006).

2. C I LJ R A D A

Osnovni cilj ovog rada bio je da se ispita mogućnost uvođenja *AtCKX1* i *AtCKX2* gena u genom *Centaurium erythraea* Rafn. čime bi se, po prvi put, omogućilo dobijanje biljaka sa sniženim nivoom endogenih citokinina. Transgene biljke bi se koristile kao dobar model sistem za dalja istraživanja procesa koje kontrolišu citokinini, kao i o ulozi sniženih nivoa endogenih citokinina i poremećene citokininske homeostaze u morfogenezi i sekundarnom metabolizmu kičice.

Realizacija ovog cilja izvršena je kroz nekoliko zadataka:

1. Uspostavljanje kulture korenova kičice *in vitro* i razvijanje efikasnog sistema za regeneraciju i umnožavanje izdanaka ove biljne vrste.

2. Genetička transformacija korenova kičice pomoću dva soja *A. tumefaciens* (GV3101) koji nose *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gen u cilju dobijanja transgenih biljaka sa sniženim nivoom endogenih citokinina kao i dokazivanje uspešnosti transformacije.

3. Ispitivanje ekspresije *AtCKX1* i *AtCKX2* gena kao i aktivnosti enzima citokinin oksidaze/dehidrogenaze kako u izdancima, tako i u korenovima netransformisanih i transformisanih biljaka kičice *in vitro*.

4. Hemijska identifikacija i kvantifikacija sadržaja različitih grupa citokinina u izdancima i korenovima netransformisanih i transformisanih biljaka kičice *in vitro*.

5. Analiza uticaja ekspresije transgena na regeneraciju, rastenje i razviće transformisanih biljaka kičice *in vitro* u cilju morfološke karakterizacije dobijenih biljaka.

6. Kvalitativno i kvantitativno određivanje biohemijskog sadržaja sekundarnih metabolita (sekoiridoida i ksantona) u transgenim i kontrolnim biljkama kičice *in vitro* u cilju ispitivanja uticaja izmenjenog nivoa endogenih citokinina na proizvodnju sekundarnih metabolita kičice.

3. M A T E R I J A L I M E T O D E

3.1. Biljni materijal

Za uspostavljanje *in vitro* kultura kao polazni materijal korišćena su komercijalna semena *Centaurium erythraea* Rafn. (Jelitto Staudensamen GmbH, Schwarmstedt, Germany). Svi eksperimenti *in vitro* rađeni su na biljnom materijalu poreklom od navedenih komercijalnih semena. Analiza sekundarnih metabolita iz kontrolnih izdanaka i korenova iz prirode urađena je kod biljaka *C. erythraea* koje su sakupljene u fazi cvetanja, u toku leta 2009. godine na lokalitetu Ralja.

3.2. Sastav hranljive podloge

Za gajenje biljaka *in vitro* u ovom radu korišćena je hranljiva podloga, u tekstu označena kao MS podloga, koja je sadržala makro i mikro mineralne soli po Murashige i Skoog-u (1962) upola razblaženog sastava (**Tabela 7**). Osim makro- i mikro-elemenata (**Tabela 7-8**) hranljiva podloga sadržala je saharozu kao izvor ugljenika u koncentraciji 30 gL^{-1}, mio-inositol (Sigma) 100 mgL^{-1}, agar (Torlak, Beograd) 7 gL^{-1}. pH vrednost hranljive podloge je pre autoklaviranja podešavana pomoću 1N NaOH i/ili HCl na 5,8.

Tabela 7. Sastav makro- i mikro-mineralnih soli i gvožđa u hranljivoj MS podlozi upola razblaženog sastava (Murashige i Skoog, 1962).

Makro mineralne soli MS	**mgL^{-1}**
NH_4NO_3	825
KNO_3	950
$CaCl_2$ x 2 H_2O	220
$MgSO_4$ x 7 H_2O	185
KH_2PO_4	85
Mikro mineralne soli MS	**mgL^{-1}**
$MnSO_4$ x $4H_2O$	11,15
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	4,3
H_3BO_3	3,1
KJ	0,415
$NaMoO_4$ x $2H_2O$	0,125
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,125
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,0125
Kompleks gvožđa	**mgL^{-1}**
NaEDTA x $2H_2O$	18,6
$FeSO_4$ x $7H_2O$	13,9

Tabela 8. Sastav vitamina u hranljivoj MS podlozi bio je stalan (Murashige i Skoog, 1962).

Vitaminski kompleks	**mgL^{-1}**
vitamin B_1	0,1
vitamin B_6	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	2,0

3.3. Spontana regeneracija biljaka *C. erythraea* Rafn.

Kao početni materijal za uspostavljanje *in vitro* kultura korišćena su semena *C. erythraea* Rafn. koja su površinski sterilisana prema protokolu opisanom u Poglavlju 3.4.1. Dobijeni klijanci, dužine 15-20 mm, prenošeni su na MS čvrstu hranljivu podlogu bez regulatora rastenja, na kojoj su dalje gajeni. Za uspostavljanje kultura korenova, sa

klijanaca su izolovani segmenti adventivnih korenova, dužine ~10 mm, koji su prenošeni na MS hranljivu podlogu. Posle 2 meseca u kulturi korenova dolazi do spontane regeneracije izdanaka kičice koji su dalje pojedinačno prenošeni i takođe gajeni na MS hranljivoj podlozi na kojoj se spontano ožiljavaju posle 3-4 nedelje. Kulture korenova, radi eksperimenta genetičke transformacije kičice, takođe su uspostavljene na čvrstoj MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja.

3.4. Metode sterilizacije

Hranljive podloge, instrumenti za rad i laboratorijsko posuđe koji su korišćeni u svim eksperimentima sterilisani su prema standardnim procedurama kulture biljnih ćelija, tkiva i organa *in vitro*, a rad sa biljnim materijalom obavljan je u aseptičnim uslovima, u laminarnoj komori.

3.4.1. Površinska sterilizacija biljnog materijala

Semena *C. erythraea* Rafn. su ispirana 20 minuta u tekućoj vodi u koju je dodato nekoliko kapi deterdženta, a zatim su, uz blago mućkanje, površinski sterilisana u laminaru**,** tokom 20 minuta, rastvorom komercijalnog preparata natrijum hipohlorita, sa 4% aktivnog hlora (NaOCl). Posle potapanja u rastvor natrijum hipohlorita, semena su ispirana 3 puta po 5 minuta sterilnom dejonizovanom vodom, a zatim su postavljana na hranljivu podlogu za isklijavanje (MS podloga).

3.5. Uslovi gajenja kultura

In vitro kulture gajene su u klimatizovanoj prostoriji za gajenje, pri temperaturi vazduha 25 ± 2 ºC, svetlosnom režimu dugog dana (16 h svetlosti i 8 h mraka) i pri odgovarajućoj relativnoj vlažnosti vazduha. Kao izvor svetlosti korišćene su flurescentne

lampe bele svetlosti *Tesla* Pančevo, jačine 65W. Gustina svetlosnog fluksa iznosila je 47 $\mu mols^{-1}m^{-2}$.

3.6. Molekularno biološke metode

3.6.1. Konstrukti korišćeni za genetičku transformaciju

Za inokulaciju biljaka u cilju njihove transformacije korišćena su dva bakterijska soja *A. tumefaciens* GV3101 koji nose pBinHTX plazmid sa dva različita gena koja su Werner i sar, 2001. godine izolovali iz *Arabidopsis thaliana*, *AtCKX1* (GenBank™, pristupni broj AC002510), odnosno *AtCKX2* (GenBank™, pristupni broj AC005917). Bakterijski sojevi korišćeni za genetičku transformaciju kičice dobijeni su zahvaljujući ljubaznosti dr T. Schmülling i dr T. Werner (Freie Universität Berlin, Germany).

Oba binarna plazmida sadrže dve ekspresione kasete, *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gen koji su pod kontrolom 35S promotora i higromicin fosfotransferazu II (*HPT II*) koja je pod kontrolom promotora nopalin sintetaze (*nos*). 35S je promotor mozaičnog virusa karfiola (CaMV 35S promotor – *Caulliflower mosaic virus*) i dobio je ime po tome što koeficijent sedimentacije transkripta koji ovaj promotor reguliše iznosi 35 Svedbergovih jedinica (Gatz i sar, 1992). Ovaj promotor je konstitutivni i veoma je jak kod dikotiledonih biljaka. Zahvaljujući aktivnosti enzima higromicin fosfotransferaze II, koji kodira *hptII* gen, samo transformisane ćelije mogu da prežive selekciju pomoću letalnih doza antibiotika. T-DNK oba plazmida ima dva graničnika, LB i RB, između kojih su ubačeni željeni *AtCKX* geni i biljni selektabilni marker (higromicin) i bakterijski selektabilni marker (kanamicin). MSC (*Multi-cloning sites*) je polilinker koji omogućavaα -komplementaciju. Digestija se vrši sa *SalI* i *KpnI*.

3.6.2. Hranljive podloge za rast bakterija i antibiotici

Sojevi *A. tumefaciens* korišćeni u eksperimentima gajeni su na standardnoj LB (*Luria Bertani Broth*) hranljivoj podlozi za gajenje bakterija u čiji sastav ulaze komponente prikazane u **Tabeli 9**.

Tabela 9. Sastav LB hranljive podloge (Bertani, 1951).

Komponenta	**gL^{-1}**
Ekstrakt kvasca (Bacto – yeast extract)	5
Tripton	10
NaCl	10
Agar	15
pH 7,0	

Rastvori antibiotika (**Tabela 10**) dodavani su u prethodno sterilisane i prohlađene hranljive podloge (~40 °C), filter-sterilizacijom celulozno nitratnim membranskim filterima sa porama veličine 0,45 μm i 0,22 μm (Millipore, USA), pre razlivanja u sterilne sudove.

Tabela 10. Antibiotici koji su dodavani u LB hranljivu podlogu.

Antibiotik	**mgL^{-1}**
Kanamicin (*Kanamycin monosulfate*, ICN Biomedicals Inc.)	50
Rifampicin (*Rifampicin*, Sigma)	50
Gentamicin (*Gentamicin*, Sigma)	25

Bakterijske kulture gajene su 48 h na 25 ml čvrste hranljive podloge u Petri kutijama u termostatu na temperaturi od 28 ºC do pojave kolonija, a potom su do momenta korišćenja čuvane na +4 ºC i jednom mesečno prenošene na svežu podlogu.

Bakterijske kulture čuvane su i u glicerolu na -70 °C. Glicerolska kultura bakterija se pravi mešanjem 0,4 ml sterilnog glicerola i 0,6 ml sveže prekonoćne bakterijske suspenzije.

Za inokulaciju biljnog materijala sa *A. tumefaciens* korišćene su bakterijske suspenzije koje su dobijene zasejavanjem jedne bakterijske kolonije sa čvrste hranljive podloge u 5 ml tečnog LB-a. Posle inkubacije na 28 °C u termostatu u trajanju od 24h dobija se bakterijska suspenzija standardne gustine $5x10^8$ bakterija / ml.

Za uklanjanje kultura bakterija *A. tumefaciens* nakon inokulacije biljnog materijala korišćen je antibiotik cefotaksim (Tolycar®, Jugoremedija, Zrenjanin) u koncentraciji od 500 mgL^{-1}.

3.6.2.1. Određivanje selektivne koncentracije higromicina

Za određivanje koncentracije antibiotika koja će se koristiti pri selekciji transformisanog materijala, urađen je test osetljivosti biljaka prema higromicinu. U MS hranljivu podlogu na kojoj su gajeni segmenti netransformisanih korenova, dodat je higromicin u koncentracijama 2,5, 5, 10, 15, 25 i 50 mgL^{-1}. Kao kontrola je korišćena podloga u koju je dodata samo sterilna dejonizovana voda. Eksperiment je ponovljen tri puta sa po 30 eksplantata uniformne veličine (~10 mm) koji su gajeni četiri nedelje u prostoriji za rast biljaka. Na osnovu dobijenih rezultata napravljena je kriva osetljivosti prema higromicinu i određena je potrebna količina antibiotika koja će se koristiti prilikom transformacije biljnog materijala.

3.6.3. Transformacija biljnog materijala

Kao materijal za inokulaciju korišćeni su segmenti korenova *C. erythraea* Rafn. veličine ~10 mm gajeni 15 dana na MS hranljivoj podlozi. Eksplantati su pripremani tako što su sterilnim skalpelom zasecani krajevi korenova. Ovako pripremljeni eksplantati zatim su potapani u 5 ml *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* bakterijske suspenzije optičke gustine ~ 0,6 (A_{600}) kojima je vršena inokulacija. Segmenti korenova koji su korišćeni kao kontrola potapani su u tečnu LB hranljivu podlogu bez bakterija. Posle 10 minuta inkubacije eksplantati su prosušeni na filter papiru i vraćeni su na MS hranljivu podlogu. Posle kokultivacionog perioda od 3 dana, eksplantati inokulisani sa *A. tumefaciens* su isprani u

vodenom rastvoru cefotaksima ($1gL^{-1}$), osušeni na filter papiru i prenošeni na MS hranljivu podlogu kojoj su dodati antibiotici: 10 mgL^{-1} higromicina i 500 mgL^{-1} cefotaksima. Količina selektivnog antibiotika utvrđena je posle određivanja osetljivosti segmenata netransformisanih korenova kičice na higromicin.

Eksplantati su svake 3-4 nedelje prenošeni na svežu podlogu koja je sadržala istu koncentraciju selektivnog i dekontaminacionog antibiotika, do regeneracije izdanaka. Izdanci koji su se razvili na inokulisanim korenovima, izolovani su i pojedinačno prenošeni na MS hranljivu podlogu koja je sadržala oba antibiotika. Ovako izolovani izdanci tretirani su kao zasebne linije i dalje su ožiljavani na hranljivoj podlozi istog sastava. Potencijano transformisane linije umnožavane su kulturom korenova. Posle četiri subkulture antibiotici su izostavljeni.

Kontrolni eksplantati su prenošeni na hranljivu podlogu istog sastava kao i na hranljivu podlogu bez antibiotika.

Svi eksperimenti vršeni su pod istim, standardnim, uslovima temperature i svetlosnog fluksa.

3.6.4. Dokazivanje uspešnosti transformacije biljnog materijala

Uspešna transformacija biljnog materijala potvrđena je u dva koraka. Prvi je potvrda samog ugrađivanja stranog gena u genom biljke što je, kao što je to i uobičajeno, dokazano PCR reakcijom. Drugi korak je potvrda ekspresije stranog gena, što je dokazano kvantitativnom RT-PCR reakcijom.

3.6.4.1. Izolacija genomske DNK

Izolacija genomske DNK iz transformisanog i netransformisanog biljnog materijala *in vitro* rađena je po metodi Zhou i saradnika (1994). Izolacija je vršena tako što je 0,25 g biljnog materijala samleveno u avanu u tečnom azotu. Prah je prebačen u sterilne ependorf tubice zapremine 1,5 ml koje su ohlađene na ledu. Dodato je u svaki uzorak po 600 µl

ekstrakcionog pufera (2% CTAB, 20 mM NaEDTA, 100 mM TRIS-HCl pH 8, 1.4 M NaCl) sa 0,5% β-merkaptoetanola. Uzorci su snažno mućkani par sekundi. Ependorf tubice su inkubirane u vodenom kupatilu na 56 ºC 20 min. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi 10 min u svaku ependorf tubicu dodato je po 600 µl smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1) i tubice su okretane 40 puta. Nakon centrifugiranja na 20 000 rpm na sobnoj temperaturi 10 min supernatant koji se odvajao u vidu gornje, bezbojne faze, prebacivan je u nove ependorf tubice. Postupak je ponovljan još jednom. Supernatant je ponovo prebačen u nove ependorf tubice, pa je dodato po 250 µl 4M NaCl, ependorf tubice okretane 30 puta, dodato po 750 µl hladnog izopropanola i ependorf tubice ostavljane u frižider (na +4 ºC) 30 min.

Nakon 30 min sadržaj je centrifugiran na 8000 rpm na sobnoj temperaturi 5 min. Supernatant je odstranjen, a talog opran dodavanjem 1ml hladnog 70% etanola i blagim okretanjem ependorf tubice. Sadržaj je ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Supernatant je odliven, a talog sušen u laminaru dok nije postao sasvim proziran. Resuspendovan je dodavanjem 200 µl TE pufera (koji je sadržao 20 µl 0,5 M EDTA, 100 µl 1 M TRIS i 9,88 ml H_20 na 10 ml TE pufera). Ependorf tubice su ostavljene u frižideru (+4 ºC) tokom noći radi rastvaranja taloga. Sutradan je u svaku tubicu dodato po 2 µl (10 mg/ml) RNK-aze, mućkano obrtanjem, pa inkubirano u vodenom kupatilu na 37 ºC 45 min. Dodato je po 140 µl smeše hloroform:izoamil alkohola (24:1) u svaku ependorf tubicu, pa centrifugirano na 13 000 rpm na sobnoj temperaturi 10 min. Uzimano je po 100 µl gornje faze i prenošeno u nove ependorf tubice.

Kvalitet izolovane DNK analiziran je elektoforezom u agaroznom gelu, a kvantitet je određen na spektrofotometru (Agilent 8453) i izračunavan je prema formuli:

$$[\text{ukupna DNK}] = 50\ \mu g/ml \times A_{260} \times \text{razblaženje}$$

3.6.4.2. PCR analiza

Reakcija lančanog umnožavanja DNK (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) omogućava identično umnožavanje željene sekvence u velikom broju kopija. Reakcija se uobičajeno sastoji od 30-40 ciklusa, od kojih svaki ima tri osnovna koraka: denaturacija DNK, sparivanje (annealing) prajmera sa komplementarnim nizovima matrične DNK i polimerizacija na 72 ºC (Innis i Gelfand, 1990). PCR reakcija je iskorišćena za potvrđivanje prisustva transgena u biljnom tkivu.

Genomska DNK korišćena u PCR analizi izolovana je iz 4 nedelje starih netransformisanih i transformisanih klonova kičice *in vitro*. Svaka PCR reakcija se odvijala u reakcionoj smeši zapremine 25 µl (**Tabela 11**).

Tabela 11. Sastav reakcione smeše PCR reakcije.

Komponenta	**µl**
10 x PCR pufer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0.01% želatin)	2,50
dNTP (10mM)	1,50
Prajmer F (5µM)	1,25
Prajmer R (5µM)	1,25
Taq DNK polimeraza (5 U/µl)	0,50
H_2O	15,50
DNK (100 ng/µl)	2,50
	25,00

Za amplifikaciju fragmenata *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gena u PCR reakcijama korišćeni su prajmeri (Forward i Reverse) prikazani u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama.

Gen	GenBank™ pristupni br.	Prajmeri	Amplikon
AtCKX1	AC002510	F: 5'-CTC AGA ACA GGT TAC GAC TTC TCC-3'	300 bp
		R: 5'-CCC CAA ATC AAC AAC GTC TAC C-3'	
AtCKX2	AC005917	F: 5'-CTC TAC CGA TCC TTC CAT CAT CTC-3'	374 bp
		R: 5'-ACG TTC CTC CGA CGG TTA TATG-3'	

Uslovi PCR reakcije:

1. Početna denaturacija nukleinskih kiselina odvijala se na 95 ºC, 5 min
2. 38 ciklusa:
   a) Denaturacija na 95 ºC, 1 min
   b) Vezivanje prajmera na 55 ºC, 1 min (*AtCKX1* gen) odnosno na 60 ºC, 1min (*AtCKX2* gen)
   c) Ekstenzija na 72 ºC, 2 min
3. Finalna ekstenzija na 72 ºC, 10 min

Sve PCR reakcije sa specifičnim prajmerima urađene su pomoću GeneAmp® Gold PCR Reagent Kit (Applied Biosystems) i odvijale su se u PCR mašini (Techne *Genius* thermocycler, Cambridge, UK). Sve PCR analize ponovljene su po tri puta.

Netransformisane biljke kičice korišćene su kao negativna kontrola dok su pBinHTX-*AtCKX1* i pBinHTX-*AtCKX2*, isečeni restrikcionom endonukleazom *Bam*HI (Fermentas, Lithuania), korišćeni kao pozitivna kontrola.

Elektroforeza i vizuelizacija DNK:

Elektroforeza DNK je vršena u 1,5% agaroznim gelovima (60 ml), uz dodatak 3 µl etidijum-bromida (10 mg/ml), u 1 x TBE puferu sa 0,5 µg/ml etidijum-bromida, pri konstantnom naponu od 45 V (za genomsku DNK) i 74 V (za PCR produkte).

Elektroforeza DNK se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Posle završene elektroforeze gelovi su prosvetljivani na talasnoj dužini od 266 nm i fotografisani u transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Exlorer, Exton, PA).

3.6.4.3. Izolacija RNK

Ukupna RNK iz 4 nedelje starog transformisanog i netransformisanog biljnog materijala *in vitro* izolovana je po metodi Gašić i saradnika (2004). Ekstrakcija je vršena tako što je oko 0,2 g biljnog materijala samleveno u avanu u tečnom azotu. Prah je prebacivan u sterilne ependorf tubice zapremine 2 ml koje su postavljane na led. Za svaki uzorak avan je ispiran sa po 1,3 ml ekstrakcionog pufera (2% CTAB, 2% PVP, 25 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl (pH8,0), 2M NaCl, 0,5 gl^{-1} spermidina, sa 2% β-merkaptoetanola dodatog neposredno pre upotrebe) prethodno zagrejanog na 60 °C, koji je zatim prebačen u ependorf tubice koje su naredna 2 min mućkane na vorteksu. Ependorf tubice su zatim inkubirane u vodenom kupatilu na 60 ºC 15 min, uz povremeno mućkanje na vorteksu. U svaku epruvetu dodato je po 650 µl smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1) i mućkano na vorteksu 2 min. Nakon centrifugiranja na 10 000 x g na +4 °C 10 min, supernatant koji se odvajao u vidu gornje, bezbojne faze i prebacivan je u nove ependorf tubice. Postupak sa dodavanjem hloroform:izoamilalkohola i centrifugiranjem od 10 min ponovljen je još jednom.

Supernatant u zapremini od 500 µl odvajan je u nove ependorf tubice zapremine 2 ml, pa je dodato po 1/3 zapremine hladnog 7,5 M LiCl. Ependorf tubice su okretanjem mućkane nekoliko puta i ostavljane su u frižider (na +4 ºC) preko noći.

Nakon precipitacije sadržaj ependorf tubica je centrifugiran na 12 000 x g na +4 ºC 45 min. Supernatant je odstranjen, a talog pran dodavanjem 300 µl hladnog 70% etanola, pa zatim sušen na vazduhu u laminaru 5 min.

Talog RNK je rastvaran dodavanjem 80 µl DEPC vode, potom je dodato 8 µl 3M Na-acetata (pH 5,5) i 220 µl 70% etanola i ostavljen je 90 min na -80 ºC. Sadržaj je ponovo

centrifugiran na 12 000 x g, 45 min na +4 ºC. Supernatant je odlivan, a talog sušen u laminarnoj komori 10 min. Talog je resuspendovan dodavanjem 200 µl DEPC vode i ostavljan u zamrzivač na -80 ºC.

Kvalitet izolovane RNK verifikovan je elektoforezom u agaroznom gelu, a određen je i spektrofotometrijski prema odnosu količnika A_{260}/A_{280} (za čistu RNK A_{260}/A_{280} iznosi 1,9-2,1). Kvantitet izolovane RNK određen je na spektrofotometru (Agilent 8453) i izračunavan je prema formuli:

[ukupna RNK] = 40 µg/ml x A_{260} x razblaženje

3.6.4.4. Reakcija reverzne transkripcije i optimizacija PCR protokola sa prajmerima za qPCR

U reakciji reverzne transkripcije (RT) 1 µg totalne RNK prvo je tretiran DNK-azom. Ovaj tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine 10 µl (**Tabela 13**).

Tabela 13. Sastav reakcione smeše za tretman DNK-azom.

Komponenta	**µl**
10 x pufer za DNK-azu (Fermentas)	1,00
DNK-aza	1,00
RNK-aze inhibitor (Fermentas, 40U/ µl)	0,25
H_2O	7,75
	10,00

Tretman DNK-azom odvijao se 30 min na 37 ºC, a potom je DNK-aza stopirana dodavanjem 1 µl EDTA (Fermentas, Lithuania) u svaku ependorf tubicu. Inaktivacija DNK-aze je trajala 10 min na 65 ºC.

RT reakcija se odvijala u zapremini od 20 µl i sadržala je komponente prikazane u **Tabeli 14**. Sve RT reakcije urađene su pomoću GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kita

(Applied Biosystems) i odvijale su se u PCR mašini (Techne *Genius* Thermocycler, Cambridge, UK).

Tabela 14. Sastav reakcione smeše RT reakcije.

Komponenta	**µl**
5 x PCR pufer	4,0
25 mM $MgCl_2$	2,0
10 mM dNTP	2,0
100 mM DTT	2,0
50 µM oligo-dT	0,5
20 U/µl RNAse inhibitor	0,5
MultiScribe® reverzna transkriptaza	0,3
H_2O	4,7
mRNK (0.1 µg/µl)	4,0
	20,0

Uslovi RT reakcije:

RT reakcija se odvijala u dva koraka za oba gena:

1. 25 ºC, 15 min
2. 42 ºC, 18 min.

Dobijena jednolančana DNK (cDNK) zatim je umnožena PCR reakcijom. PCR protokol je optimizovan sa uzorcima cDNK biljaka transformisanih *AtCKX1* genom, koji su prethodnim PCR reakcijama davali pozitivne signale različitih jačina.

Optimizacija PCR protokola sa prajmerima za qPCR uključivala je raspon temperatura vezivanja prajmera od 49,1-58,3 ºC uz istovremenu primenu različitih aditiva odnosno pojačivača PCR reakcije i to: formamida (2% finalna koncentracija), DMSO (dimetil sulfoksid, 5%), glicerola (5%), etilen glikola (1 M), trehaloze (0.2 M), goveđeg serum albumina (BSA, 0,2 µg/µl) i Tween-20 (0,5%). Dobijeni rezultati poređeni su sa odgovarajućom kontrolnom PCR reakcijom bez aditiva odnosno pojačivača.

Svaka pojedinačna PCR reakcije odvijala se u smeši zapremine 25 µl (**Tabela 15**).

Tabela 15. Sastav reakcione smeše PCR reakcije.

Komponenta	**µl**
10 x PCR pufer $(NH4)_2SO_4$	2,50
25 mM $MgCl_2$	2,00
10 mM dNTP	0,50
15 µM Prajmer F	0,50
15 µM Prajmer R	0,50
5 U/µl Taq DNK polimeraza	0,40
H_2O	13,60
Aditiv odnosno pojačivač PCR reakcije	2,50
40 ng/µl cDNK	2,50
	25,00

Uslovi PCR reakcije:

1. Početna denaturacija nukleinskih kiselina odvijala se na 95 ºC, 10 min
2. 40 ciklusa:
   a) Denaturacija na 95 ºC, 15 s
   b) Vezivanje prajmera na različitim temperaturama u rasponu od 49,1-58,3 ºC, 30 s
   c) Ekstenzija na 72 ºC, 30 s
3. Finalna ekstenzija na 72 ºC, 10 min

Sve PCR reakcije urađene pomoću Fermentas *Taq* DNA Polymerase (recombinant, EP0401) Kita (Fermentas, Lithuania) i odvijale su se u PCR mašini (Techne *Genius* Thermocycler, Cambridge, UK). Sve PCR analize ponovljene su po tri puta.

Kao pozitivna kontrola korišćen je plazmid pBinHTX-*AtCKX1* isečen restrikcionom endonukleazom *Bam*HI (Fermentas, Lithuania).

Uslovi elektroforeze i vizuelizacije identični su kao i za genomsku DNK.

3.6.4.5. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)

Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR) se odvijao u dva koraka. RT reakcija je izvršena kao što je prethodno opisano. Tako dobijena cDNK korišćena je u qPCR reakciji koja se odvijala u smeši zapremine 25 µl (**Tabela 16**).

Tabela 16. Sastav pojedinačne qPCR reakcije.

Komponenta	**µl**
SYBR Green I Master Mix	12,50
15 µM Prajmer F	0,50
15 µM Prajmer R	0,50
H_2O	7,75
DMSO	1,25
40 ng/µl cDNK	2,50
	25,00

SYBR Green I Master Mix je, od strane proizvođača, već pripremljena smeša Taq DNK polimeraze, dNTP-a, fluorescentno zelene SYBR Green i ROX boje u odgovarajućem PCR puferu. Taq DNK polimeraza rastvorena u puferu omogućava veoma osetljive i specifične PCR reakcije. SYBR Green boja u Master Mixu osigurava detekciju, a samim tim i analizu DNK. Ova boja se uobičajeno koristi u qPCR reakcijama i može se koristiti za bilo koju sekvencu. Međutim, SYBR Green boja ima i svoje nedostatke. Jedan je taj što takođe detektuje produkte koji su posledica kontaminacije ili samosparivanja prajmera, a drugi je taj što intenzitet fluorescencije na zavisi samo od broja kopija nego i od dužine lanca DNK tako da se za duže molekule vezuje više boje. ROX boja je pasivna referentna fluorescentna boja koja služi za normalizaciju varijacija između reakcija kao i grešaka u pipetiranju. Ova boja se ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju tokom reakcije. SYBR Green I Master Mix je polugotov proizvod u koji se pre same upotrebe dodaje samo uzorak i odgovarajući prajmeri što ga čini veoma jednostavnim za manipulaciju.

Prajmeri koji su prethodno korišćeni u standardnim PCR reakcijama nisu bili pogodni za qPCR iz dva razloga. Prvi je umnožavanje produkata koji su preveliki (300 bp *AtCKX1* gena odnosno 374 bp *AtCKX2* gena) za osetljivu qPCR reakciju. Drugi razlog je prisustvo introna u umnoženim produktima *AtCKX1* gena. Iz navedenih razloga setovi prajmeri koji su korišćeni u PCR reakcijama mogli su poslužiti samo za amplifikaciju genomske, ali ne i cDNK. Da bi qPCR reakcije bile uspešne bilo je neophodno koristiti potpuno nove prajmere koji su dizajnirani pomoću računarskog programa Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Konstruisani prajmeri su pre upotrebe provereni računarskim programom NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/). Za amplifikaciju fragmenata *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gena u qPCR reakcijama korišćeni su prajmeri prikazani u **Tabeli 17**.

Tabela 17. Prajmeri korišćeni u qPCR reakcijama.

Gen	GenBank™ pristupni br.	Prajmeri	Amplikon
AtCKX1	NM_129714	F: 5'-CAG CAG CAA ACC TCA ACG TG-3'	127 bp
		R: 5'-ATC GCT AGA GGG TCG TAG GC-3	
AtCKX2	NM_127508	F: 5'-GGG AAC TTC CTC ATC CTT GGC-3'	115 bp
		R: 5'-GCG AGT CCC GAA GCT GAT TT-3'	

Radi provere ujednačenosti količine ukupne cDNK u svim uzorcima paralelno sa amplifikacijom oba *AtCKX* gena, amplifikovan je i referentni gen za aktin. Usled nedostatka sekvence za aktin kičice, za konstrukciju prajmera korišćen je gen za aktin krompira i prajmeri su dizajnirani u regionu gena koji pokazuje visok stepen homologije sa aktinskim genima drugih biljaka (**Tabela 18**).

Tabela 18. Set prajmera korišćenih za umnožavanje referentnog gena za aktin

Gen	GenBank™ pristupni br.	Prajmeri	Amplikon
PoAc58	X55749	F: 5'-TGT TGG ACT CTG GTG ATG GTG-3'	141 bp
		R: 5'-AGT AAC CAC GCT CAG TGA GGA-3'	

Specifičnost svih korišćenih prajmera potvrđena je na dva načina, gel elektroforezom RT-PCR produkata (čime se određuje veličina produkata) i analizom krive topljenja posle qPCR reakcije.

Uslovi qPCR reakcije:

1. Početna denaturacija odvijala se na 95 ºC, 10 min
2. 40 ciklusa:
   a) Denaturacija na 95 ºC, 15 s
   b) Vezivanje prajmera na 56 ºC, 15 s (*AtCKX1* gen) odnosno na 57 ºC, 15 s (*AtCKX2* gen)
   c) Ekstenzija na 72 ºC, 30 s
3. Finalna ekstenzija na 72 ºC, 10 min
4. Analiza krive topljenja

Za apsolutnu kvantifikaciju kao standardi korišćeni su plazmidi pBinHTX-*AtCKX1* i pBinHTX-*AtCKX2* isečeni restrikcionom endonukleazom *Bam*HI (Fermentas, Lithuania) u seriji razblaženja (5 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg i 10 pg).

Sve qPCR reakcije urađene su u tri biološka replikata u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Co, Foster City, USA), pomoću SYBR Green I (Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Fermentas, Lithuania) prema uputstvima proizvođača.

3.7. Merenje CKX aktivnosti

Citokinin oksidaza/dehidrogenaza je ekstrahovana i delimično prečišćena iz izdanaka i korenova 4 nedelje starih netransformisanih i transformisanih biljaka kičice *in vitro* po metodi Motyka i saradnici (2003). Aktivnost CKX i specifičnost za supstrat su određivani *in vitro* enzimskim testom zasnovanim na konverziji [2-^{3}H]iP u [2-^{3}H]adenin. U **Tabeli 19** prikazane su komponente reakcione smeše finalne zapremine 50 µl.

Tabela 19. Komponente reakcione smeše u kojoj je određivana CKX aktivnost

100 mM *N*-tris(hidroksimetil)metil-3-amino-propan-sulfonska kiselina & (TAPS)-NaOH pufer u kojem je rastvoren 75 µM 2,6-dihloroindofenol	pH 8,5
2 µM [2-^{3}H]iP (7,4 TBq mol^{-1})	
Enzimski ekstrakt (ekvivalent 2,5-35 mg sveže mase biljnog materijala)	

Razdvajanje supstrata od proizvoda enzimske reakcije vršeno je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (HPLC/MS, Finnigan, San José, CA, USA) po metodi Gaudinová i saradnici (2005). Koncentracija proteina u enzimskim ekstraktima određivana je po metodi Bradford-a (1976) uz upotrebu BSA (goveđi serum albumin) kao standarda. Određivanje aktivnosti CKX u svakom od tri biološka uzorka ponovljeno je po četiri puta.

3.8. Analiza endogenih biljnih hormona

Endogeni biljni hormoni (citokinini i IAA) ekstrahovani su iz izdanaka i korenova 4 nedelje starih netransformisanih i transformisanih biljaka kičice *in vitro* po metodi Dobrev i Kamínek (2002). Ekstrakcija je vršena tako što je oko 1 g sveže mase biljnog materijala samleven u avanu u tečnom azotu. Prah je prebačen u smešu metanola, mravlje kiseline i vode (15:1:4, v:v:v), a prečišćavanje je vršeno iz čvrste faze.

Koncentracije molekulskih vrsta citokininskih nukleotida određivane su preračunavanjem iz koncentracija odgovarajućih ribozida posle njihove defosforilacije

alkalnom fosfatazom. Detekcija i kvantifikacija vršene su korišćenjem HPLC/MS (tečna hromatografija pod visokim pritiskom/masena spektroskopija). Kao interni standardi za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su odgovarajući [^{2}H] obeleženi citokinini. Granica detekcije različitih molekulskih vrsta citokinina kretala se između 0,5-1,0 pmol po uzorku.

Koncentracija auksina (IAA) određivana je primenom dvodimenzionalne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (2D-HPLC) po metodi Dobrev i saradnici (2005). Za kvantifikaciju korišćen je fluorescentni detektor LC 240 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

Određivanje količine endogenih biljnih hormona u svakom biološkom uzorku ponovljeno je po četiri puta.

3.9. Morfološka karakterizacija netransformisanih i transformisanih klonova kičice

Segmenti netransformisanih i transformisanih korenova gajeni su na MS hranljivoj podlozi upola razblaženog sastava. Posle 4 nedelje gajenja u kulturi, praćen je broj novonastalih adventivnih pupoljaka. Formirani adventivni izdanci prenošeni su na MS hranljivu podlogu bez regulatora rastenja na kojoj se spontano ožiljavaju posle 3-4 nedelje. Takođe je merena sveža masa izdanaka i izračunat je prirast sveže mase posle 4 nedelje gajenja u kulturi. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta sa po 90 eksplantata.

3.9.1. Određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata kičice

Izolacija hlorofila i karotenoida iz zelenih listova netransformisanih i transformisanih izdanaka kičice posle 4 nedelje gajenja u kulturi, vršena je po metodi Lichtenthaler (1987). Ekstrakcija je vršena tako što je oko 0,02 g odsečaka listova potopljeno u 2 ml 96% etanola. Epruvete sa etanolom i biljnim materijalom zagrevane su 10 min u vodenom kupatilu na 70 ºC. Sadržaj hlorofila i karotenoida određivan je

spektrofotometrijski (UV – visible Spektrofotometar Agilent 8453). Zabeležena je vrednost apsorpcije na tri talasne duzine: 470, 648 i 664 nm.

Količina hlorofila i karotenoida (µg/g sveže mase biljnog materijala) izračunavane su prema formulama:

1. Ukupna količina hlorofila: $C_{(a+b)} = 5{,}24 \times A_{664} + 22{,}24 \times A_{648}$
2. Količina hlorofila a: $C_a = 13{,}36 \times A_{664} - 5{,}19 \times A_{648}$
3. Količina hlorofila b: $C_b = 27{,}43 \times A_{648} - 8{,}12 \times A_{664}$
4. Ukupna količina karotenoida: $C_{(x+c)} = (1000 \times A_{470} - 2{,}13 \times C_a - 97{,}64 \times C_b) / 209$

Odnos hlorofila a i b izračunavan je iz količnika vrednosti hlorofila a i hlorofila b (C_a/C_b), dok je odnos hlorofila i karotenoida izračunavan iz količnika njihovih ukupnih vrednosti ($C_{(a+b)}/C_{(x+c)}$).

Sve ekstrakcije ponovljene su po tri puta. U svakom ekstraktu apsorbancija je merena takođe po tri puta. Dobijeni rezultati predstavljeni su u g/g suve mase biljnog materijala.

3.10. Analiza sekundarnih metabolita kičice

Posle sušenja na vazduhu, nadzemni delovi biljaka kičice sakupljenih u prirodi odvojeni su od korena i zatim su samleveni i ekstrahovani tokom 48 h u metanolu na sobnoj temperaturi u mraku. Na isti način pripremljeni su i metanolni ekstrakti uzoraka *C. erythraea in vitro*. Odnos između biljnog materijala i rastvarača iznosio je 1:20, w:v. HPLC metodom urađena je analiza sekundarnih metabolita, sekoiridoida i ksantona, u ovim ekstraktima. Korišćen je aparat Agilent 1100 sa DAD detektorom i kolonom Zorbax SB-C18 5 µm, 150 x 4,6 mm. Mobilna faza sastojala se od vode sa 1% v/v, H_3PO_4 (A) i acetonitrila (B). Protok 1 ml/min. Injekciona zapremina uzorka je 5 µl, a eluiranje je gradijentno po sledećoj šemi: 98-90% A, 0-5 min, 90-85% A, 5-10 min, 85% A, 10-13min,

85-70% A, 13-15 min, 70-10% A, 15-20 min, 10% A, 20-22 min, 10-0% A, 22-25 min. UV apsorbanca merena je na 260 i 320 nm.

3.10.1. Standardi i kvantifikacija

Za kvantifikaciju sekoiridoida, sverciamarina i genciopikrina, korišćeni su komercijalni standardi proizvođača Cfm Oscar Tropitzsch (Nemačka). Ksantoni, eustomin i demetileustomin, izolovani su iz nadzemnog dela i korena kičice na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Njihova struktura je potvrđena spektroskopskim tehnikama: UV (*ultraviolet*), 1D i 2D NMR (nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija) i MS.

Kvantifikacija svih jedinjenja u uzorcima urađena je metodom eksternog standarda, pomoću kalibracione krive. Sve analize ponovljene su najmanje dva puta. Dobijeni rezultati predstavljeni su u mg/g suve mase biljnog materijala.

3.11. Statistička obrada podataka

Numerički podaci su obrađeni primenom računarskog programa Statgraphics verzija 4,2 (STSC Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1985-1989, USA). Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA), kao i LSD (*least significant difference*) test za utvrđivanje najmanjih statistički značajnih razlika na nivou $p \leq 0,05$. Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel.

4. R E Z U L T A T I

4.1. Uspostavljanje kulture *in vitro* i spontana regeneracija biljaka

Isklijavanjem semena *C. erythraea* na MS hranljivoj podlozi bez dodataka regulatora rastenja uspostavljene su kulture *in vitro*. Uobičajena površinska sterilizacija semena rastvorom natrijum hipohlorita bila je dovoljna jer se kulture nisu kontaminirale. Semena kičice isklijavana su na svetlosti i posle desetak dana dobijeni su razvijeni klijanci koji su dalje gajeni na hranljivoj podlozi istog sastava. Posle dva meseca klijanci su se razvili u biljke rozetaste forme.

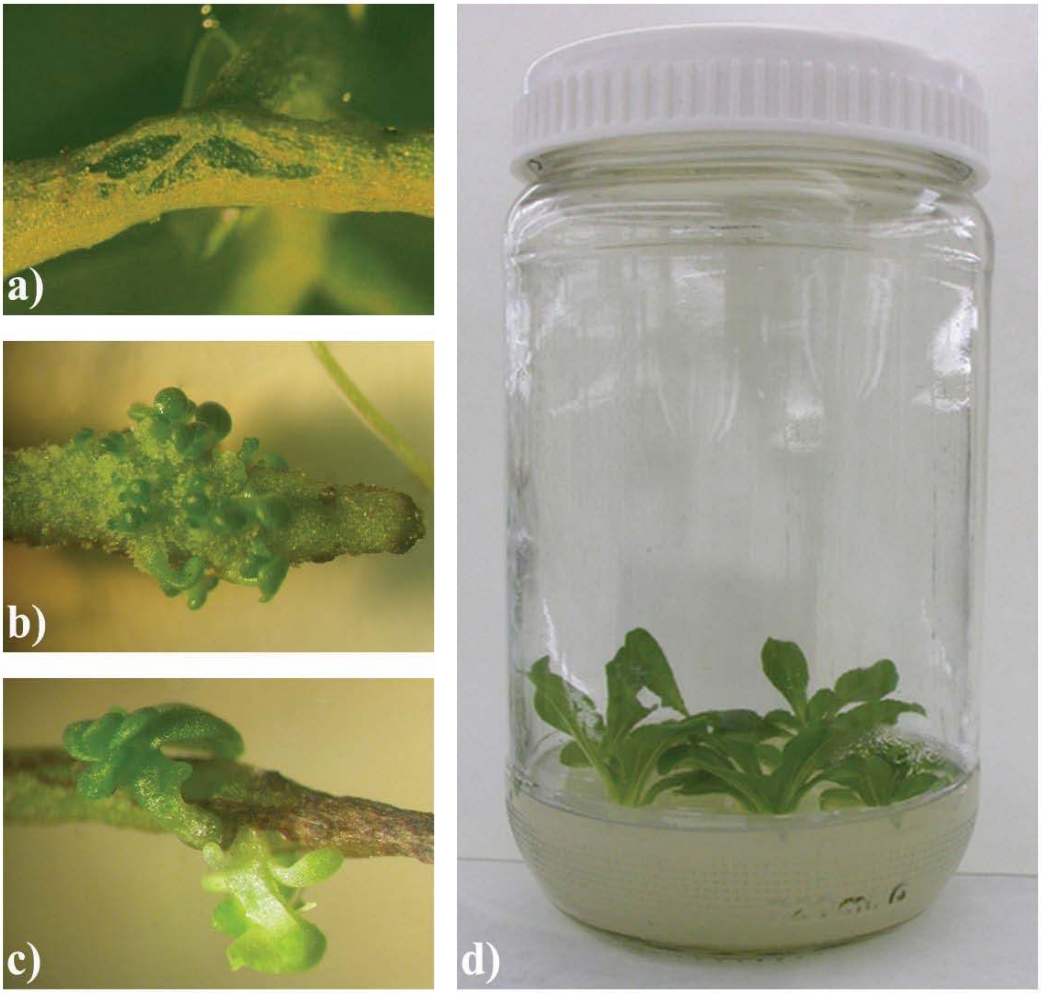
Za uspostavljanje kultura korenova, kao početni eksplantati korišćeni su vrhovi adventivnih korenova prosečne dužine ~10 mm koji su dalje gajeni na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja (**Slika 12**).



Slika 12. Kultura korenova *C. erythraea* Rafn. sa regenerisanim izdancima posle dva meseca gajenja na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja.

Proces organogeneze u kulturi korenova kičice je spontan. Već posle 7 dana rastenja na svetlosnom režimu dugog dana (16 h svetlost i 8 h mrak) na bazalnom delu početnog

eksplantata uočavaju se prve promene. Koren zadebljava i tkivo počinje da puca celom dužinom bazalnog dela (**Slika 13a**). Adventivni pupoljci se u velikom broju formiraju duž razraslog dela eksplantata tokom četvoronedeljnog pasaža. Karakteristika adventivnih pupoljaka je da imaju jedan dobro razvijen prvi list dok se razviće drugog lista odvija kasnije (**Slika 13b**). Na kraju pasaža uočavaju se kompletno razvijene biljke tipične rozetaste forme (**Slika 13c**). Formirani pupoljci su lako odvojeni sa eksplantata i pojedinačno su prenošeni na MS hranljivu podlogu na kojoj su dalje gajeni (**Slika 13d**).



Slika 13. Indukcija organogeneze *C. erythraea* u kulturi korenova. a) detalj korena kičice sa uzdužnim pukotinama u epidermisu (x 10), b) detalj korena kičice sa adventivnim pupoljcima (x 10), c) detalj korena kičice sa dobro razvijenim adventivnim pupoljcima (x 10), d) izdanci kičice *in vitro* posle 4 nedelje gajenja na MS hranljivoj podlozi.

4.2. Genetička transformacija *C. erythraea* pomoću *A. tumefaciens*

4.2.1. Određivanje selektivne koncentracije higromicina

Da bi se odredila optimalna selektivna koncentracija antibiotika na kojoj pouzdano može da se razlikuje transformisano tkivo od netransformisanog, urađen je test osetljivosti biljaka *C. erythraea* Rafn. prema higromicinu. Segmenti netransformisanih korenova gajeni su tokom četiri nedelje na MS hranljivoj podlozi koja je sadržala različite koncentracije higromicina i to 2,5, 5, 10, 15, 25 i 50 mgL^{-1}. Dobijeni rezultati upoređivani su sa kontrolnim segmentima korenova gajenim na hranljivoj podlozi koja nije sadržala antibiotik (**Tabela 20**). Dodavanje higromicina u koncentraciji od 2,5 mgL^{-1} u hranljivu podlogu nije bilo toksično za eksplantate pošto nema značajno vidljive razlike u broju regenerisanih izdanaka po eksplantatu u odnosu na kontrolu. Higromicin u koncentraciji od 5 mgL^{-1} značajno utiče na smanjenje broja regenerisanih izdanaka po eksplantatu u odnosu na kontrolu. Značajno smanjenje stope preživljavanja eksplantata izazvano je posle četiri nedelje gajenja na hranljivoj podlozi u koju je dodato 10 mgL^{-1} higromicina. Veće koncentracije higromicina (15, 25 i 50 mgL^{-1}) izazivaju veoma brzu i agresivnu nekrozu eksplantata. Iz svega navedenog može se zaključiti da higromicin u koncentraciji od 10 mgL^{-1} inhibira rast i regeneraciju netransformisanog biljnog tkiva. Zbog toga je za selekciju transformisanog tkiva u daljim eksperimentima genetičke transformacije korišćen higromicin ove koncentracije.

Tabela 20. Uticaj higromicina na regeneraciju izdanaka *C. erythraea* na segmentima korenova gajenih na MS hranljivoj podlozi

*prosečna vrednost ± standardna greška; oznake istog slova u okviru jedne kolone označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Antibiotik	Koncentracija (mgL^{-1})	Broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu	Procenat regeneracije
Higromicin	0	1,558 ± 0,10 b*	85
	2,5	1,587 ± 0,14 b	77
	5	0,827 ± 0,11 a	60
	10	0,0 ± 0,0	0
	15	0,0 ± 0,0	0
	25	0,0 ± 0,0	0
	50	0,0 ± 0,0	0

4.2.2. Inokulacija biljnog materijala

Inokulacija *C. erythraea* vršeno je sa dva soja *A. tumefaciens* GV3101 koji nose pBinHTX plazmid sa dva različita gena, *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gen. Kao materijal za inokulaciju korišćeni su segmenti korenova kičice veličine ~10 mm, izolovani sa korenova prethodno regenerisanih izdanaka. Segmenti korenova zatim su gajeni 15 dana na MS hranljivoj podlozi. Krajevi korenova zasecani su sterilnim skalpelom i eksplantati su potom potapani u smeše bakterijskih suspenzija i vraćeni su na MS hranljivu podlogu. Po 100 eksplantata je inokulisano u *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* bakterijskoj suspenziji. Posle tri dana kultivacije eksplantati su preneti na selektivnu podlogu u koju je dodato 10 mgL^{-1} higromicina. Pored pomenutog, selektivnog antibiotika, u hranljivu podlogu je dodato i 500 mgL^{-1} dekontaminacionog antibiotika cefotaksima koji je poslužio za uklanjanje kultura bakterija *A. tumefaciens* nakon inokulacije segmenata korenova. Kontrolni eksplantati prenošeni su na hranljivu podlogu istog sastava kao i na hranljivu podlogu bez antibiotika. Efikasnost inokulcije prikazana je u **Tabeli 21**.

Tabela 21. Efikasnost inokulacije *C. erythraea* pomoću dva soja *A. tumefaciens*.

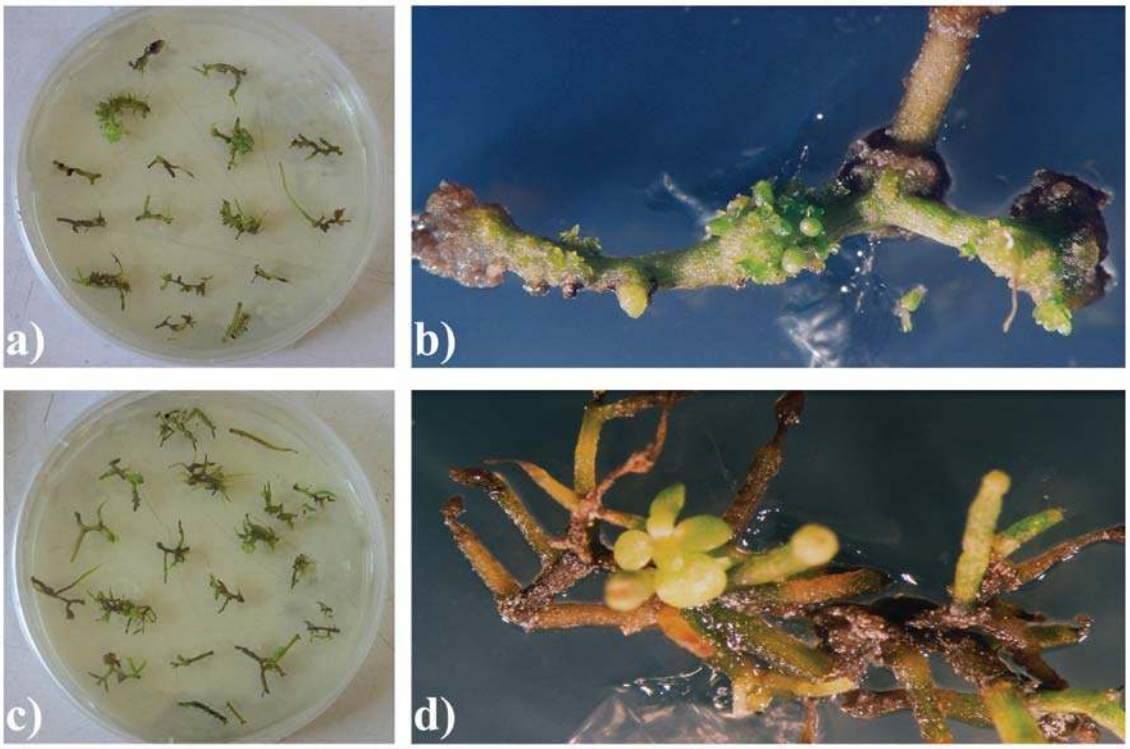
[*]Procenat eksplantata koji su otporni na higromicin (%) = Broj eksplantata koji su otporni na higromicin / Ukupan broj inokulisanih eksplantata

[**] Procenat regenerisanih izdanaka koji su otporni na higromicin (%) = Broj regenerisanih izdanaka / Broj eksplantata koji su otporni na higromicin

Plazmid sa genom	Broj inokulisanih eksplantata	Procenat eksplantata koji su otporni na higromicin (%)[*]	Procenat regenerisanih izdanaka na eksplantatima koji su otporni na higromicin (%)[**]
AtCKX1	100	72	97,2
AtCKX2	100	65	92,3

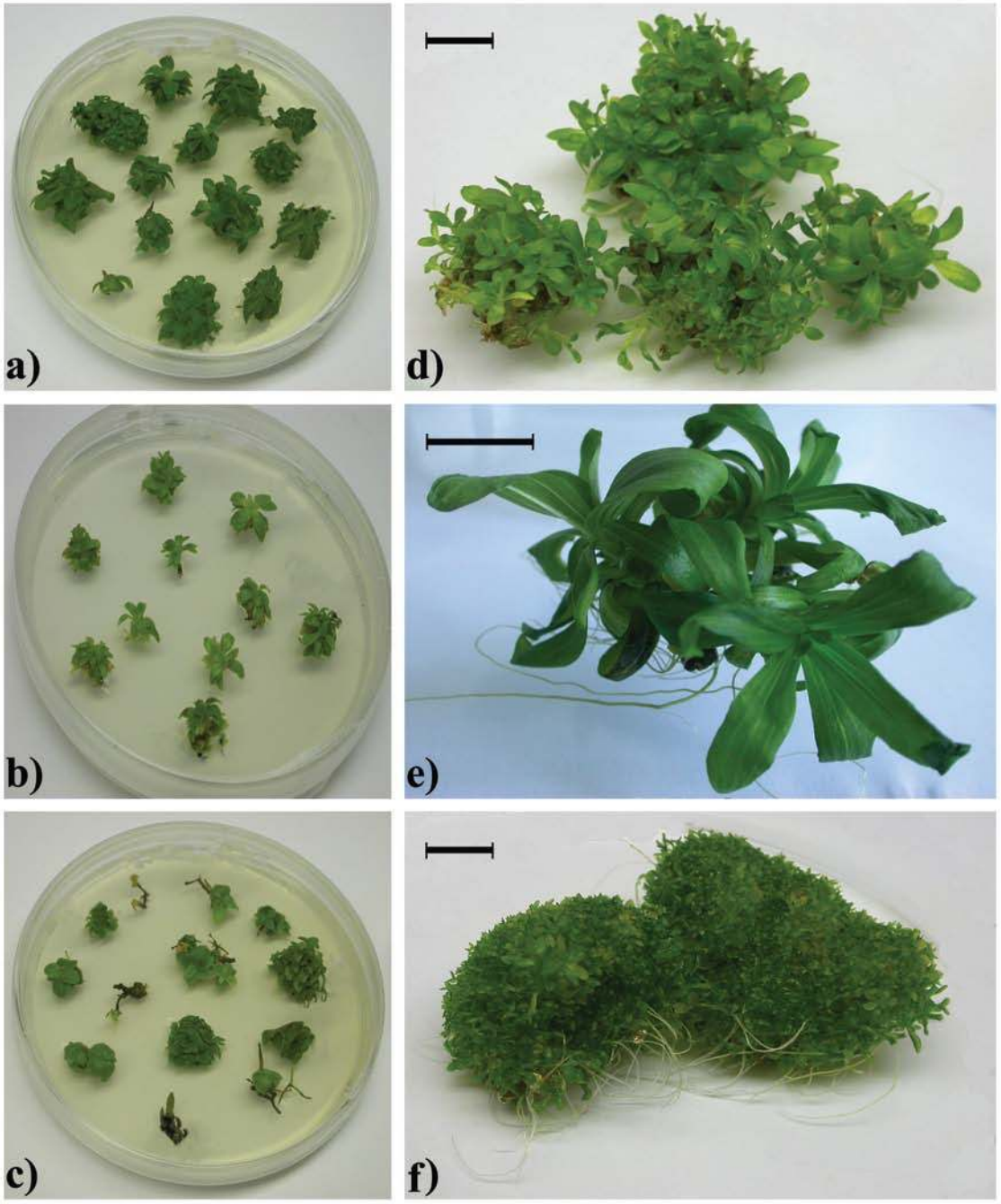
4.2.3. Uspostavljanje kultura transformisanih korenova i spontana regeneracija transformanata

Eksplantati su svake 3-4 nedelje prenošeni na svežu podlogu koja je sadržala istu koncentraciju selektivnog i dekontaminacionog antibiotika, do regeneracije izdanaka (**Slika 14 a** i **c**). Prvi *AtCKX1* i *AtCKX2* izdanci koji su otporni na higromicin, regenerisani su posle 8 nedelja na inokulisanim korenovima (**Slika 14 b** i **d**).



Slika 14. Kulture inokulisanih korenova posle 4 nedelje gajenja na MS hranljivoj podlozi u koju je dodato 10 mgL^{-1} higromicina i 500 mgL^{-1} cefotaksima. Izgled eksplantata inokulisanih pomoću *A. tumefaciens* koji nosi *AtCKX1* gen (a) i *AtCKX2* gen (c). Prvi *AtCKX1*(b) i *AtCKX2* (d) izdanci koji su otporni na higromicin regenerisani posle 8 nedelja na inokulisanim korenovima (x 6,5).

Potencijalno transformisani *AtCKX1* i *AtCKX2* izdanci koji su otporni na higromicin dalje su gajeni na hranljivoj podlozi istog sastava (**Slika 15 a** i **c**). Regenerisani izdanci su se, iako dosta sitniji od kontrolnih, razvijali normalno i spontano ožiljavali isto kao i kontrolni izdanci u kulturama netransformisanih korenova (**Slika 15 b, d, f**).

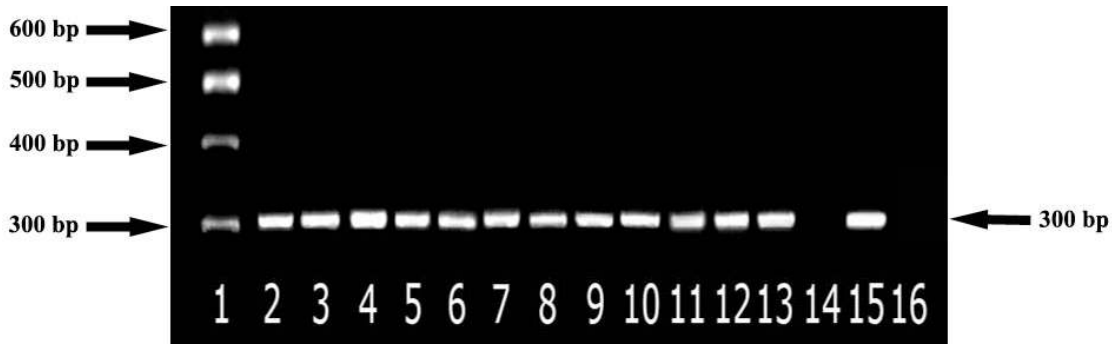


Slika 15. Regeneracija potencijalno transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* izdanaka koji su otporni na higromicin *in vitro*. Kultura korenova sa regenerisanim *AtCKX1* (a), *AtCKX2* (c) i kontrolnim netransformisanim izdancima (b). Izgled potencijalnih *AtCKX1* (d, bâr 10 mm) i *AtCKX2* (f, bar 10 mm) transformanata u poređenju sa kontrolnim biljkama (e, bâr 10 mm).

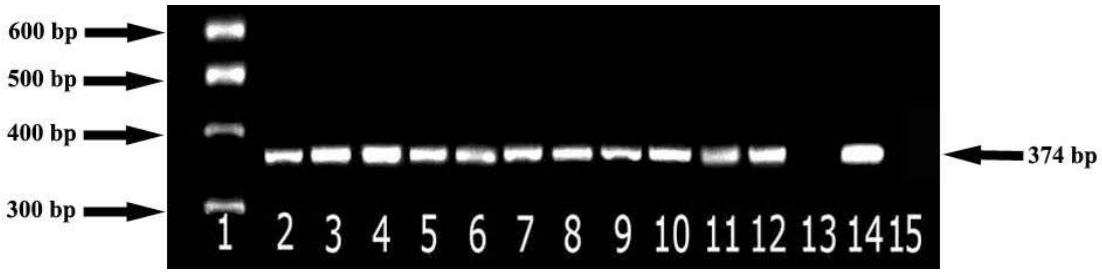
Pojedinačni potencijalno transformisani izdanci su izolovani sa eksplantata i prenošeni su na MS hranljivu podlogu koja je sadržala istu koncentraciju oba antibiotika. Svaki izolovani izdanak označavan je kao pojedinačna linija. Posle četiri subkulture antibiotici su izostavljeni iz hranljive podloge. Umnožavanje linija vršeno je primenom kulture korenova.

4.2.4. PCR analiza genomske DNK

Potvrđivanje prisustva transgena u biljnom tkivu urađeno je devet meseci posle regeneracije transformanata i njihovog umnožavanja. PCR analiza urađena je kod 40 *AtCKX1* odnosno 39 *AtCKX2* linija. Deo transgena tj. fragment veličine 300 bp detektovan je kod 12 *AtCKX1* linija (Linije 1, 3, 5, 6, 29, 30, 31, 32, 33, 38, 39, 40), dok je fragment veličine 374 bp detektovan kod 11 *AtCKX2* linija (Linije 3, 5, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 26, 29, 31). Efikasnost integracije *AtCKX1* gena i *AtCKX2* gena kod *C. erythrae*a iznosila je 30% odnosno 28,2%. Rezultati PCR analize prikazani su na **Slikama 16** i **17**.



Slika 16. PCR analiza genomske DNK izolovane iz linija *C. erythrae*a transformisanih *AtCKX1* genom uz korišćenje seta specifičnih prajmera pomoću kojih se umnožio fragment veličine 300 bp. 1. DNK marker, 2-13 *AtCKX1* linije, 14. DNK netransformisanih biljaka kičice (negativna kontrola) 15. pBinHTX-*AtCKX1* (pozitivna kontrola), 16. blank.



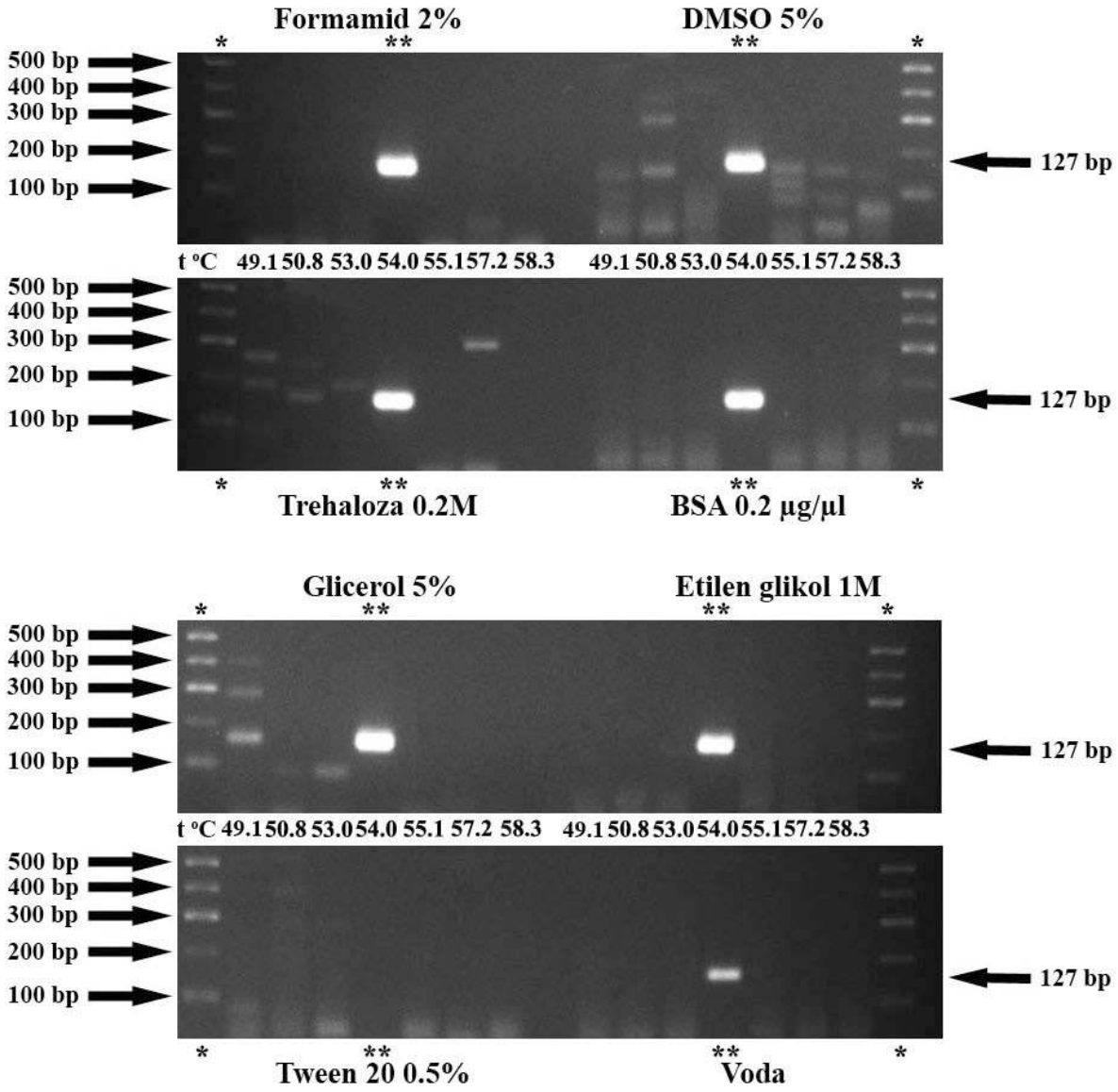
Slika 17. PCR analiza genomske DNK izolovane iz klonova *C. erythrae*a transformisanih *AtCKX2* genom uz korišćenje seta specifičnih prajmera pomoću kojih se umnožio fragment veličine 374 bp. 1. DNK marker, 2-12 *AtCKX2* klonovi, 13. DNK netransformisanih biljaka kičice (negativna kontrola) 14. pBinHTX-*AtCKX2* (pozitivna kontrola), 15. blank.

4.2.5. Optimizacija PCR protokola sa prajmerima za qPCR

Kao konačni dokaz uspešnosti transformacije biljnog tkiva potrebno je potvrditi ekspresiju transgena u izdancima i u korenovima svih transformisanih linija kičice. U cilju što boljeg određivanja nivoa ekspresije *AtCKX* gena kičice prvo je bilo neophodno uraditi optimizaciju PCR protokola sa prajmerima za qPCR. Optimizacija PCR protokola sastojala se u pronalaženju optimalne temperature vezivanja prajmera u cilju što bolje amplifikacije transkripata transgena, prvenstveno *AtCKX1* gena. U svim PCR reakcijama istovremeno su primenjivani i različiti aditivi odnosno pojačivači PCR reakcije i to: formamid (2% finalna koncentracija), DMSO (5%), glicerol (5%), etilen-glikol (1M), trehaloza (0,2M), goveđi serum albumin (BSA, 0,2 μg/μl) i Tween-20 (0,5%).

Poređenjem standardnih uslova PCR reakcije može se zaključiti da svi aditivi, osim Tween-20, značajno utiču na poboljšanje PCR amplifikacije pBinHTX-*AtCKX1* (**Slika 18**). Tween-20 potpuno inhibira PCR amplifikaciju kontrolnog plazmida. DMSO poboljšava specifičnu amplifikaciju *AtCKX1* transgena transformanata na različitim temperaturama, a najbolji rezultat postignut je na temperaturi od 55,1 ºC. Glicerol i trehaloza imaju pozitivan efekat na nižim temperaturama (49,1 ºC odnosno 50,8 ºC), dok etilen-glikol, formamid i BSA ne utiču na poboljšanje PCR amplifimacije transgena.

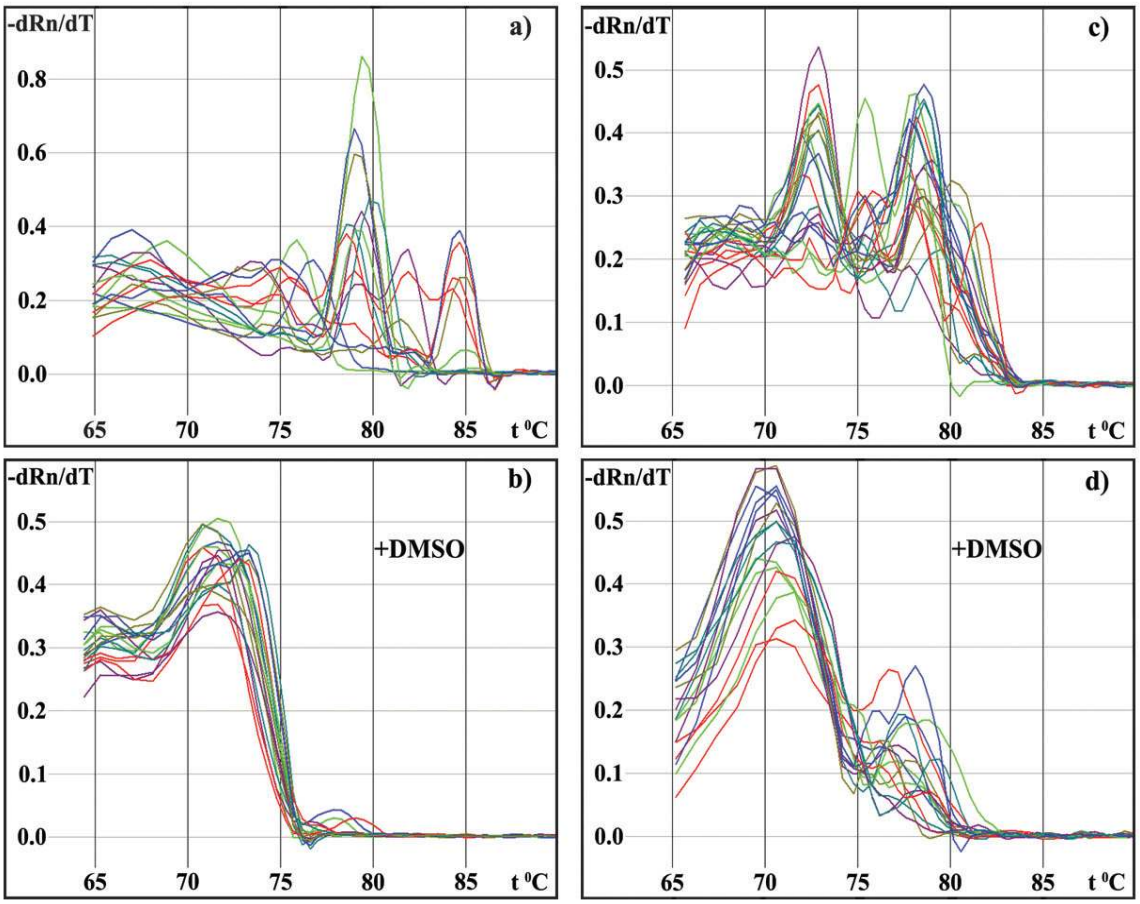
PCR protokol je optimizovan sa uzorcima cDNK linija koje su u prethodnim PCR reakcijama genomske DNK davale pozitivne signale različitih jačina. Prikazan je rezultat samo za jedan uzorak cDNK.



Slika 18. PCR analiza cDNK linija *C. erythrae*a transformisanih *AtCKX1* genom uz dodavanje različitih aditiva na različitim temperaturama (49,1 – 58,3 ºC). * DNK marker, ** pBinHTX-*AtCKX1* (pozitivna kontrola).

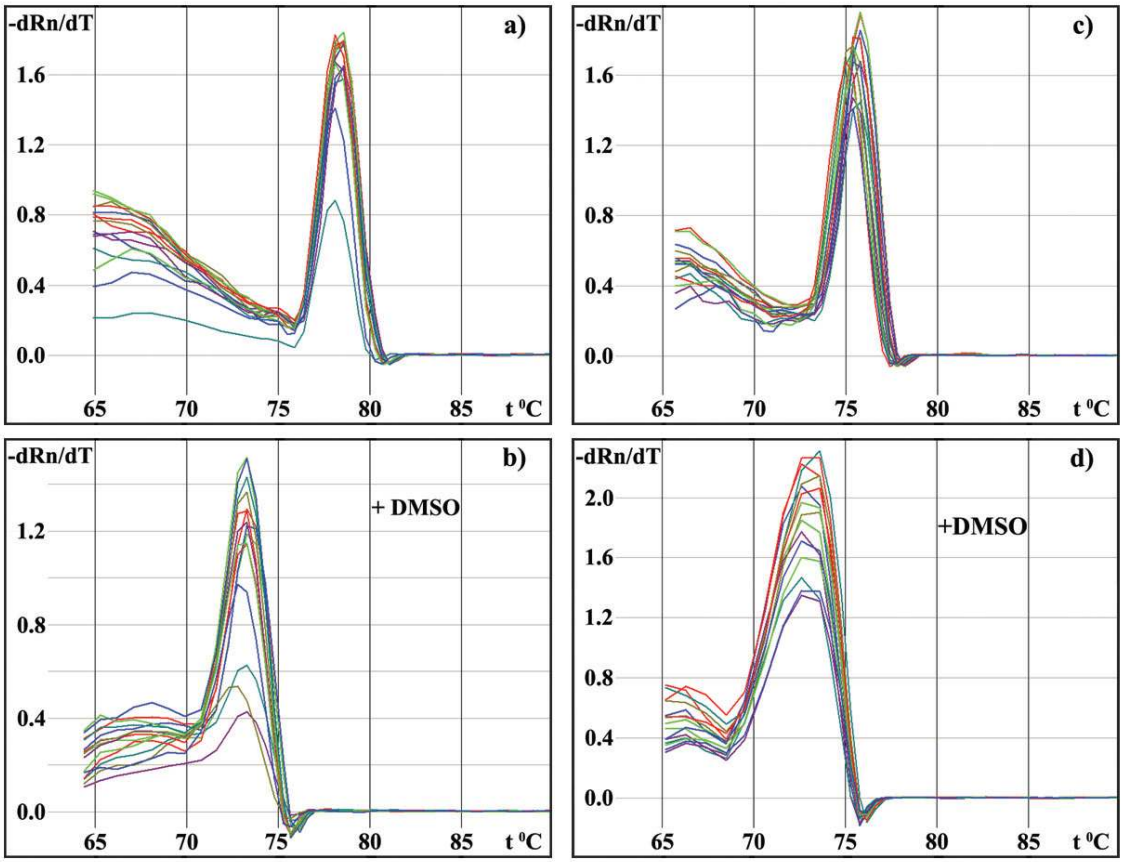
4.2.6. qRT-PCR

Kvantitativni RT-PCR je korišćen kako bi se odredio nivo ekspresije *AtCKX1* i *AtCKX2* gena. Specifičnost qRT-PCR reakcija *AtCKX1* i *AtCKX2* gena poboljšana je primenom 5% DMSO-a kao aditiva što je potvrđeno analizom krive topljenja (**Slika 19**). cDNK izdanaka i korenova *AtCKX1* i *AtCKX2* linija amplifikovana je na 56 odnosno 57 ºC primenom standardnih uslova qPCR reakcije kao i reakcije u koju je dodat 5% DMSO. Dodavanje ovog aditiva značajno utiče na specifičnu amplifikaciju, a takođe i menja oblik krive topljenja svih analiziranih uzoraka. Krive topljenja dobijene u standardnim qPCR reakcijama nisu bile zadovoljavajuće jer su imale izgled tipičnih PCR reakcija u kojima se amplifikuju nespecifični fragmenti (**Slika 19 a i c**). Dodavanje 5% DMSO-a u qPCR reakcije poboljšava specifičnost amplifikacije što potvrđuju dobre krive topljenja sa po jednim pikom (**Slika 19 b i d**).



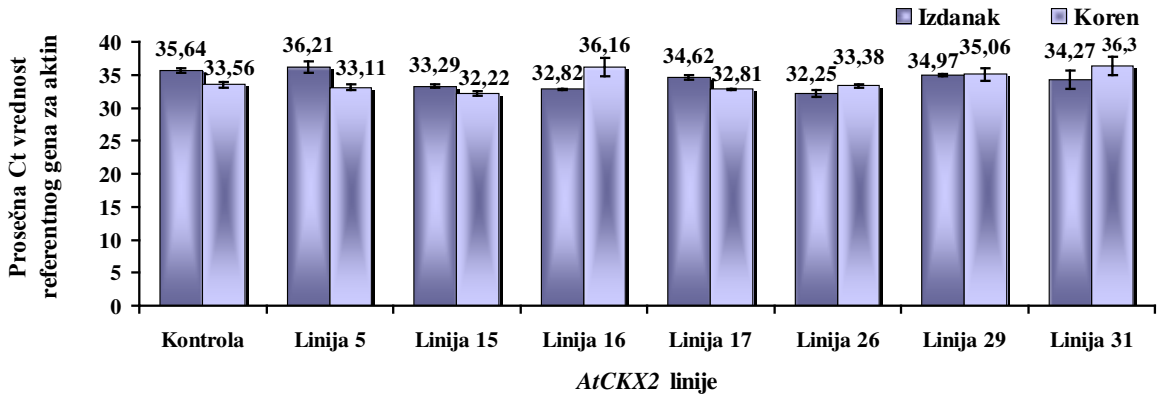
Slika 19. Uticaj DMSO-a na specifičnost amplifikacije *AtCKX1* i *AtCKX2* transgena. a) Kriva topljenja *AtCKX1* amplikona iz cDNK korenova transformanata dobijena u standardnoj qPCR reakciji i b) u qPCR reakciji u koju je dodat 5% DMSO. c) Kriva topljenja *AtCKX2* amplikona iz cDNK izdanaka transformanata dobijena u standardnoj qPCR reakciji i d) u qPCR reakciji u koju je dodat 5% DMSO.

Krive topljenja u qPCR reakcijama u kojima su korišćeni standardi u seriji razblaženja pokazuju da je temperatura topljenja *AtCKX1* amplikona 78,6 ºC, a *AtCKX2* amplikona 75,4 ºC. Primenom 5% DMSO-a temperatura topljenja *AtCKX1* amplikona snižena je na 73,3 ºC, a *AtCKX2* amplikona snižena je na 74,2 ºC (**Slika 20**).



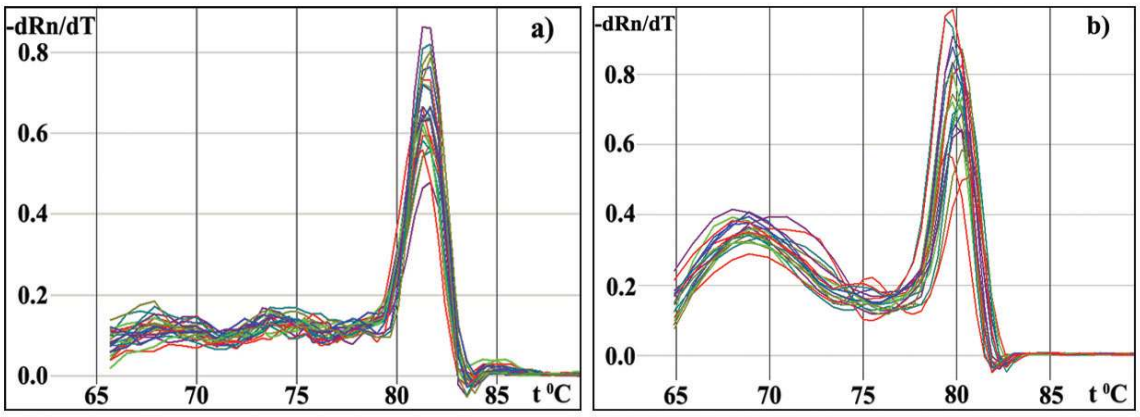
Slika 20. Uticaj 5% DMSO-a na sniženje temperature topljenja *AtCKX1* i *AtCKX2* standarda. a) Kriva topljenja *AtCKX1* standarda dobijena u standardnoj qPCR reakciji. b) Kriva topljenja *AtCKX1* standarda dobijena u qPCR reakciji u koju je dodat 5% DMSO. c) Kriva topljenja *AtCKX2* standarda dobijena u standardnoj qPCR reakciji. d) Kriva topljenja *AtCKX2* standarda dobijena u qPCR reakciji u koju je dodat 5% DMSO.

Ujednačena količina ukupne cDNK svih uzoraka potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena za aktin (rezultati nisu prikazani). Referentni geni se uobičajeno koriste kao unutrašnja kontrola uz pretpostavku konstitutivne ekspresije. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostiže prag detekcije referentnog gena za aktin (Ct vrednost) prilično je ujednačen što potvrđuje odsustvo statistički značajne razlike između svih analiziranih izdanaka i korenova (prikazani su rezultati samo za *AtCKX2* transformisane klonove, **Grafik 1**).



Grafik 1. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostiže prag detekcije referentnog gena za aktin (Ct vrednost) kod transformisanih *AtCKX2* izdanaka i korenova.

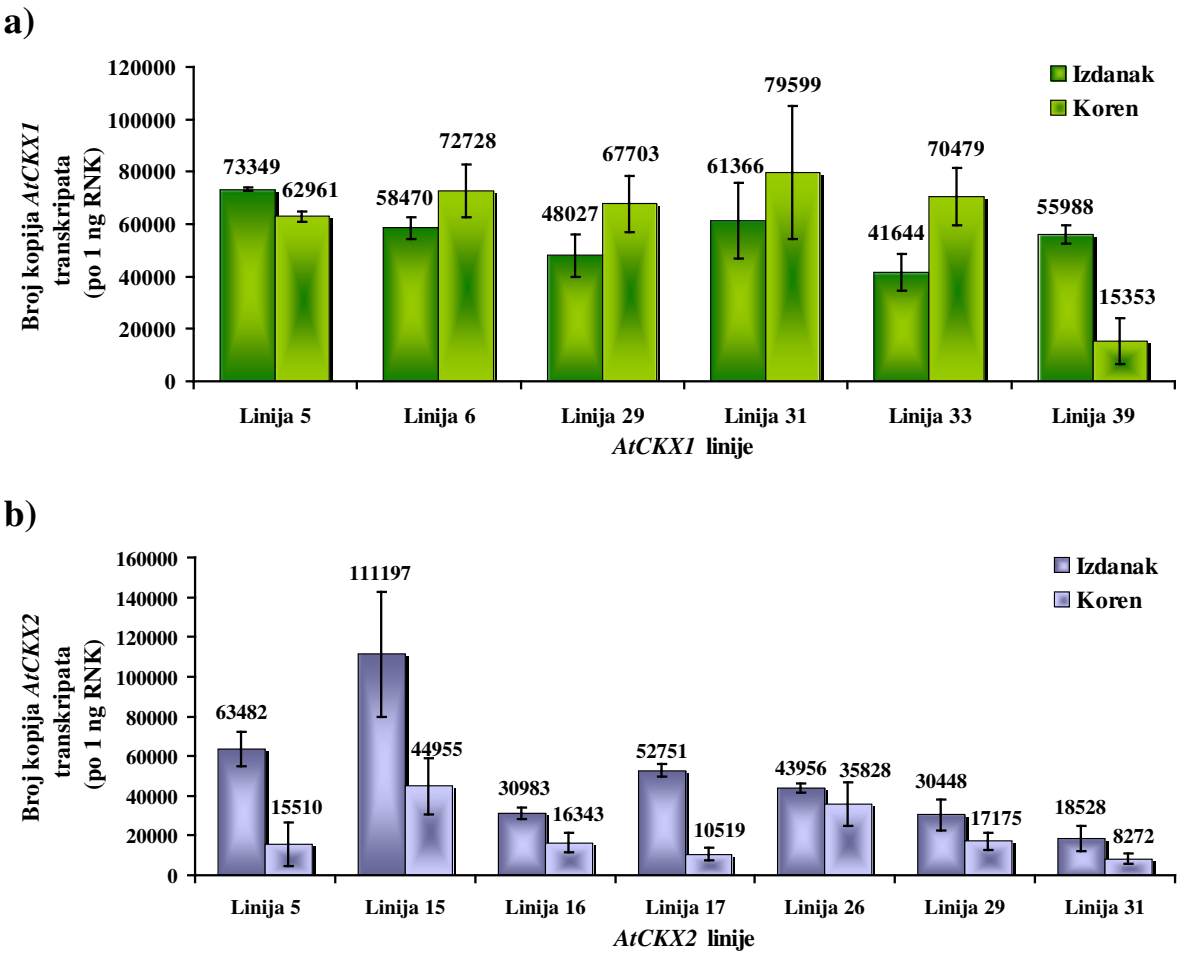
U nedostatku sekvence za aktin kičice korišćeni su prajmeri za aktinski gen krompira (*PoAc58*), dizajnirani u konzervativnom regionu tj. u regionu sa visokom homologijom sa drugim biljnim genima za aktin. Krive topljenja svih analiziranih uzoraka, kako izdanaka tako i korenova, ukazuju na to da su prajmeri za aktin bili efikasni i specifični (**Slika 21**).



Slika 21. Dobro oblikovane krive topljenja referentnog gena za aktin svih analiziranih transformisanih *AtCKX* izdanaka (a) i korenova (b).

qRT-PCR analiza urađena je kako u izdancima tako i u korenovima svih 12 *AtCKX1* odnosno 11 *AtCKX2* transformisanih linija kod kojih je prethodnom PCR analizom

potvrđena integracija transgena. Ekspresija *AtCKX1* gena potvrđena je kod 50% linija (šest linija: 5, 6, 29, 31, 33, 39) dok je ekspresija *AtCKX2* gena potvrđena kod 64% linija (sedam linija: 5, 15, 16, 17, 26, 29, 31). Na **Grafiku 2** prikazan je broj kopija *AtCKX* transkripata svih analiziranih transformisanih linija kod kojih je potrđena ekspresija.



Grafik 2. Broj kopija *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) transkripata u izdancima i korenovima transformisanih linija kičice posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti.

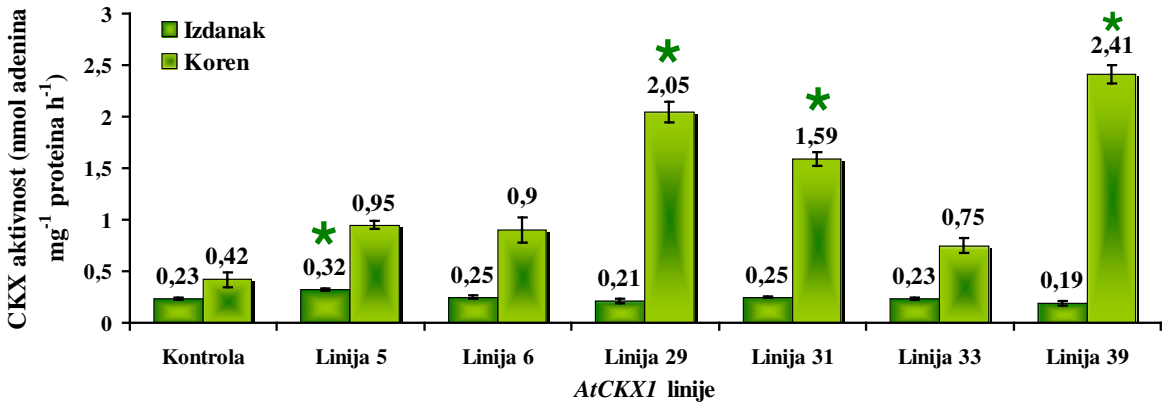
Broj kopija *AtCKX1* transkripata u izdancima varira od 41644 do 73349 po ng ukupne RNK, a *AtCKX2* transkripata varira od 18528 do 111197 po ng RNK. Broj kopija *AtCKX1* transkripata u korenovima varira od 15353 do 79599 po ng RNK, a *AtCKX2*

transkripata varira od 8272 do 44955 po ng RNK. Kvantitativni RT-PCR je pokazao da je broj kopija *AtCKX1* transkripata veći u korenovima nego u izdancima analiziranih linija, osim kod linija 5 i 39. Suprotno tome, broj kopija *AtCKX2* transkripata veći je u izdancima nego u korenovima svih analiziranih linija. U kontrolnim netransformisanim izdancima i korenovima uočena je samo nespecifična amplifikacija verovatno zbog prisustva endogenih sekvenci sličnih *AtCKX* sekvencama (nije prikazano).

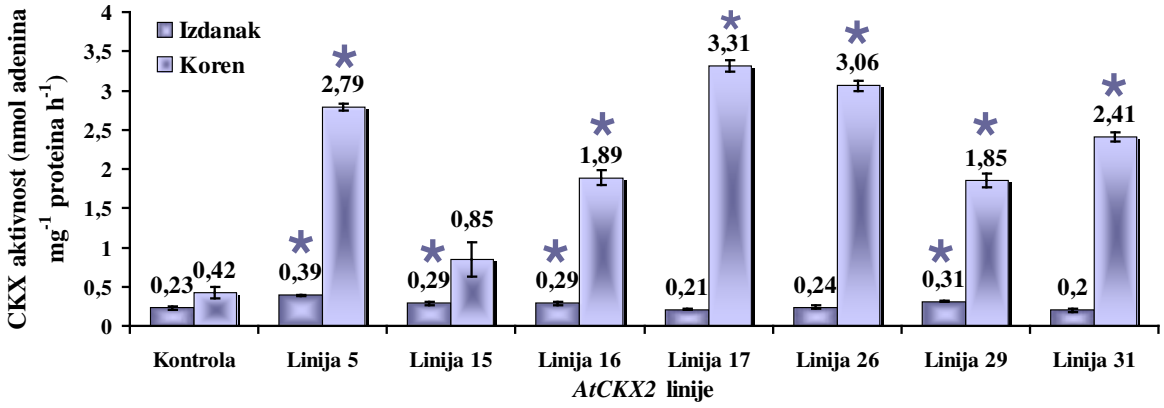
4.3. CKX aktivnost

Specifična CKX aktivnost merena je kod kontrolnih kao i kod izdanaka i korenova svih šest *AtCKX1* odnosno sedam *AtCKX2* transgenih linija kičice kod kojih je qRT-PCR analizom potvrđena ekspresija *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gena (**Grafik 3**).

a)



b)



Grafik 3. CKX aktivnost u izdancima i korenovima *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) transgenih linija kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. **oznake statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Većina analiziranih izdanaka *AtCKX1* (pet) i *AtCKX2* (tri) linija ne pokazuje statistički značajno odstupanje CKX aktivnosti od kontrole (**Grafik 3a i 3b**). Izdanci samo jedne linije *AtCKX1*-5 i četiri linije *AtCKX2*-5, -15, -16, -29 pokazuju statistički značajno povećanje CKX aktivnosti u odnosu na kontrolu. Najveća CKX aktivnost u izdancima, u poređenju sa kontrolom (0,23 ± 0,01), zapažena je kod linije *AtCKX1*-5 (0,32 ± 0,01) i *AtCKX2*-5 (0,39 ± 0,02) (**Grafik 3a i 3b**).

Za razliku od izdanaka, kod većine analiziranih transgenih korenova kičice detektovana je povećana CKX aktivnost (**Grafik 3a i 3b**). Iz prikazanih rezultata primećuje se veća CKX aktivnost u *AtCKX2* nego u *AtCKX1* transgenim korenovima. Korenovi tri linije *AtCKX1*-29, -31, -39 i šest linija *AtCKX2*-5, -16, -17, -26, -29, -31 pokazuju statistički značajno povećanje CKX aktivnosti u poređenju sa kontrolom. Najveća CKX aktivnost u korenovima, u odnosu na kontrolu (0,42 ± 0,07), zapažena je kod linija *AtCKX1*-39 (2,41 ± 0,16) i *AtCKX2*-17 (3,31 ± 0,07) (**Grafik 3a i 3b**).

Zapaženo je da je kod svih analiziranih, kako *AtCKX* linija tako i kontrole, CKX aktivnost bila viša u korenovima nego u izdancima.

4.4. Analiza endogenih biljnih hormona

Endogeni biljni hormoni (citokinini i IAA) kvantifikovani su kod 4 nedelje starih netransformisanih kao i kod izdanaka i korenova svih šest *AtCKX1* odnosno sedam *AtCKX2* transgenih linija kičice *in vitro*.

4.4.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka kičice *in vitro*

Analiza endogenih citokinina omogućila je određivanje citokininskog profila kako u izdancima (**Grafik 4**) tako i u korenovima (**Grafik 5**) kičice *in vitro*. Endogeni citokinini su prema svojoj biološkoj funkciji podeljeni u 4 grupe.

U prvu grupu citokinina spadaju **bioaktivne forme** koje čine slobodne baze i ribozidi (**Grafik 4a i 5a**). U izdancima netransformisanih biljaka kičice *in vitro* određeno je prisustvo *c*Z i *t*Z kao i njihovih ribozida *c*Z9R i *t*Z9R. U izdancima kičice primećeno je odsustvo iP-a, ali i prisustvo njegovog ribozida iP9R. Utvrđeno je prisustvo DHZ-a takođe, ali ne i njegovog ribozida (**Grafik 4a**). Za razliku od izdanaka, u korenovima kičice *in vitro* nije detektovan *c*Z, dok je njegov ribozid uspešno detektovan. Zajedničko za izdanke i korenove je to da je u oba biljna organa određeno prisustvo *t*Z kao i njegovog ribozida *t*Z9R, a takođe i prisustvo DHZ-a, ali ne i njegovog ribozida. Ukupna količina slobodnih baza i ribozida u korenovima veća je u poređenju sa izdancima, ali je njihov odnos isti tj. količina ukupnih ribozida je oko 3,5 puta veća od količine detektovanih slobodnih baza u oba biljna organa (**Grafik 5a**). Iz svih rezultata može se zaključiti da od slobodnih baza dominira DHZ, a od ribozida dominira *t*Z9R i u izdancima i u korenovima kičice *in vitro*.

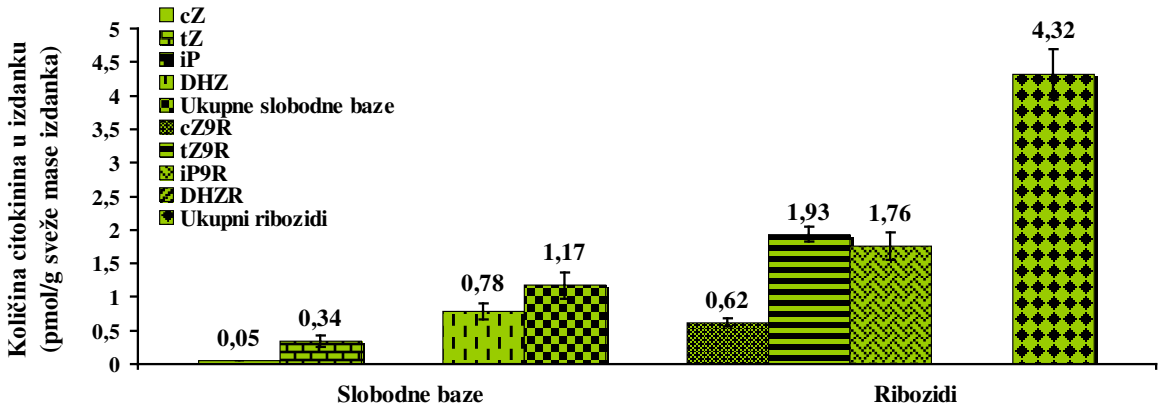
U drugu grupu citokinina spadaju **forme za skladištenje citokinina** koje čine *O*-glukozidi (**Grafik 4b i 5b**). Interesantno je primetiti da ni u izdancima ni u korenovima nije detektovan samo iPZOG. Svi ostali citokininski *O*-glukozidi (*c*ZOG, *t*ZOG, DHZOG, *c*Z9ROG, *t*Z9ROG, DHZ9ROG) su prisutni i u izdancima i u korenovima (**Grafik 4b** i **5b**). U izdancima kičice *in vitro* dominira *t*ZOG, a u korenovima *c*Z9ROG. Količina ukupnih *O*-glukozida u izdancima 1,8 puta je veća u izdanku nego u korenovima.

U treću grupu citokinina spadaju **neaktivne forme citokinina** koje čine 7- i 9-glukozidi. Za razliku od izdanaka kičice *in vitro*, u kojem su detektovani svi citokininski 7- i 9- glukozidi, u korenovima je primećeno odsustvo *c*Z7G, iP7G i iP9G (**Grafici 4c** i **5c**). Zajedničko za izdanak i za koren je to da je u oba biljna organa dominantan 7-glukozid (*t*Z7G) i 9- glukozid (tZ9G). Ukupna količina 7- i 9- glukozida u izdancima veća je u poređenju sa korenovima, ali je njihov odnos isti tj. količina 9-glukozida je oko 8,5 puta veća od količine detektovanih 7-glukozida.

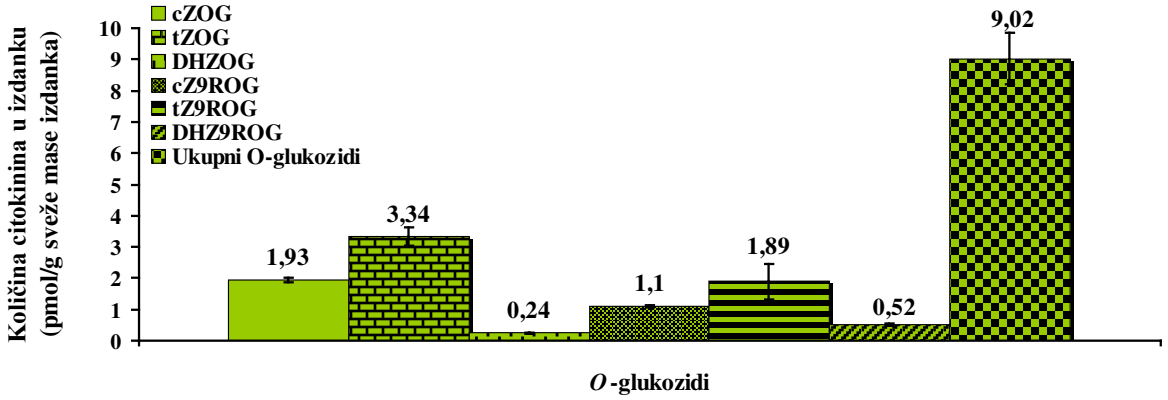
U četvrtu grupu citokinina spadaju **citokininski nukleotidi tj. monofosfati** (Grafici 4d i 5d). U izdancima *in vitro*, utvrđeno je prisustvo sva četiri monofosfata (*c*ZRMP, *t*ZRMP, iPRMP, DHZRMP), dok je u korenovima primećeno odsustvo DHZRMP-a (**Grafici 4d** i **5d**). U izdancima je primećena dominacija iPRMP-a, a u korenovima cZRMP-a. Ukupna količina monofosfata u korenovima veća je 1,5 puta nego u izdancima.

Na **Graficima 4e** i **5e** predstavljeni su sumirani rezultati svih pojedinačnih grupa kao i ukupnih citokinina u izdancima i korenovima kičice *in vitro*. Dominantna grupa citokinina i u izdancima i u korenovima su neaktivne forme, s tim što je u izdanku izmerena duplo veća količina nego u korenu. Bioaktivne forme citokinina izmerene su u najmanjoj količini u izdancima i 1,6 puta ih ima manje nego formi za skladištenje citokinina. Suprotno izdancima, u korenovima je izmerena 2,6 puta veća količina bioaktivnih formi citokinina nego formi za skladištenje citokinina. Ukupna količina citokinina 1,4 puta veća je u izdancima nego u korenovima.

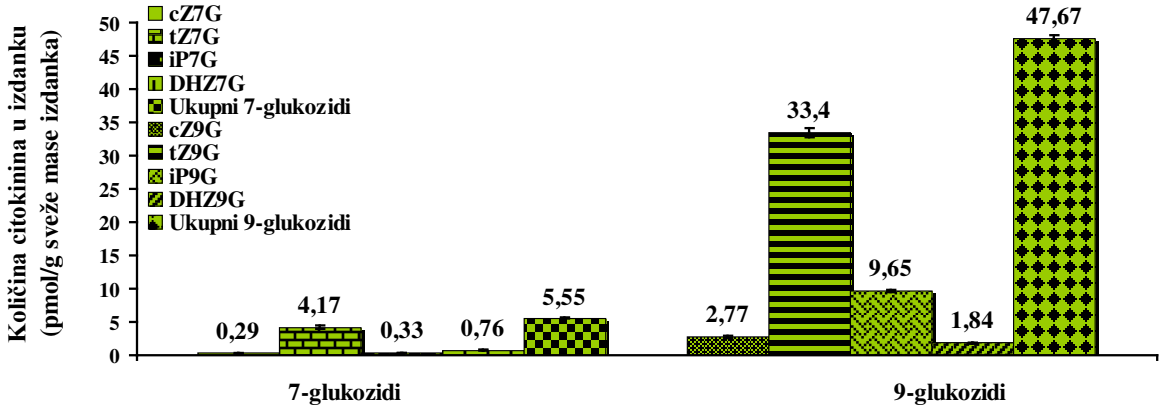
a)


cZ
tZ
iP
DHZ
Ukupne slobodne baze
cZ9R
tZ9R
iP9R
DHZR
Ukupni ribozidi
Količina citokinina u izdanku (pmol/g sveže mase izdanka)
0,05
0,34
0,78
1,17
0,62
1,93
1,76
4,32
Slobodne baze
Ribozidi

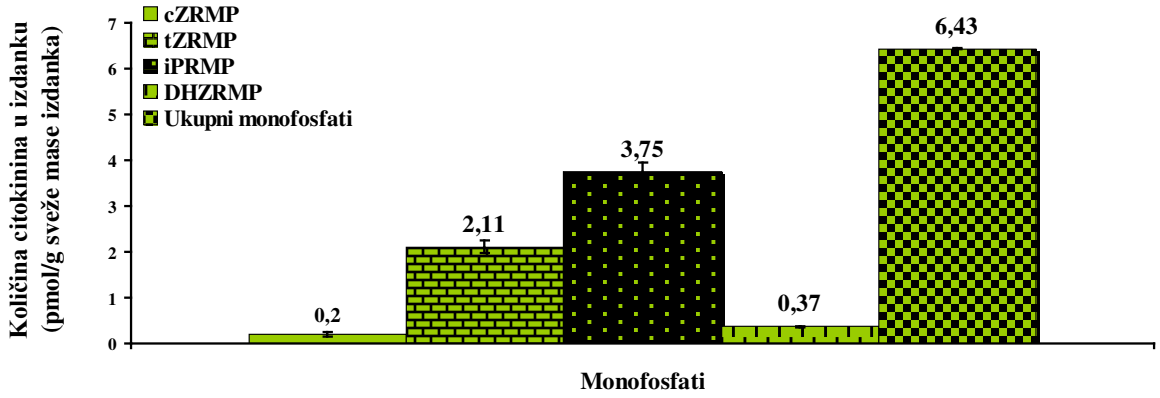
b)


cZOG
tZOG
DHZOG
cZ9ROG
tZ9ROG
DHZ9ROG
Ukupni O-glukozidi
Količina citokinina u izdanku (pmol/g sveže mase izdanka)
1,93
3,34
0,24
1,1
1,89
0,52
9,02
O-glukozidi

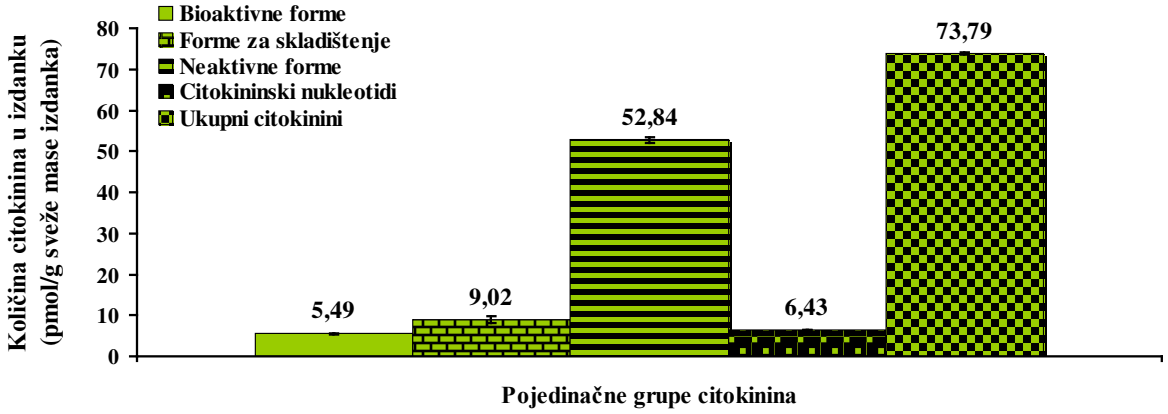
c)


cZ7G
tZ7G
iP7G
DHZ7G
Ukupni 7-glukozidi
cZ9G
tZ9G
iP9G
DHZ9G
Ukupni 9-glukozidi
Količina citokinina u izdanku (pmol/g sveže mase izdanka)
0,29
4,17
0,33
0,76
5,55
2,77
33,4
9,65
1,84
47,67
7-glukozidi
9-glukozidi

d)

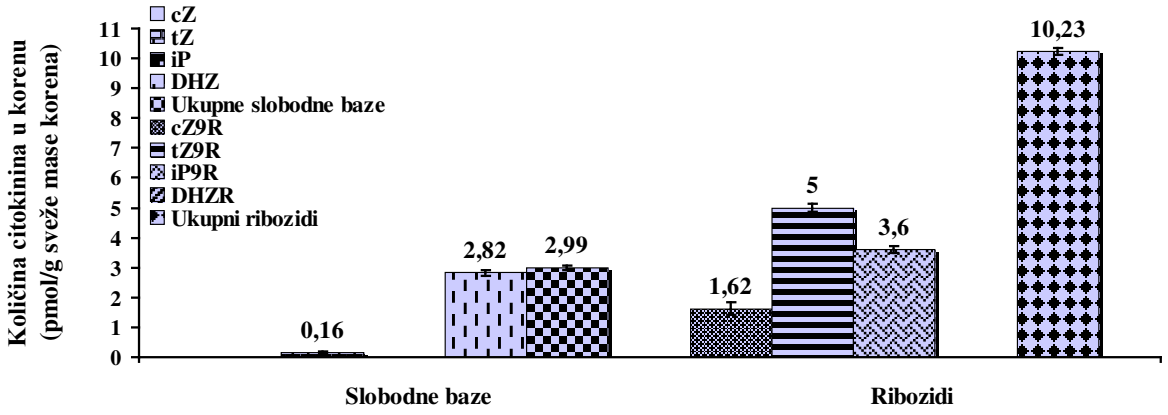


e)

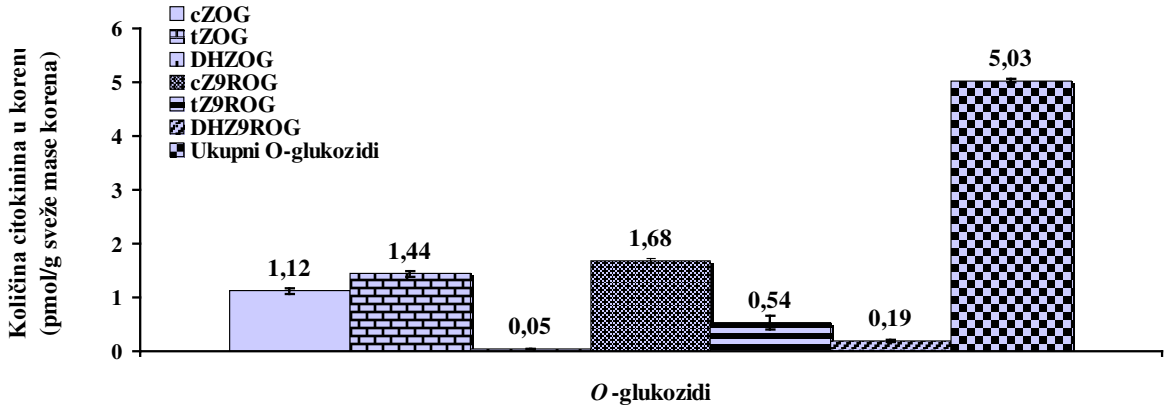


Grafik 4. Citokininski profil izdanaka kičice iz kulture *in vitro*. a) količina bioaktivnih formi citokinina (slobodne baze i ribozidi), b) količina formi za skladištenje (*O*-glukozidi), c) količina neaktivnih formi citokinina (7- i 9-glukozidi), d) količina citokininskih nukleotida (monofosfati), e) zbirni grafik pojedinačnih grupa i ukupnih citokinina u izdancima. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti.

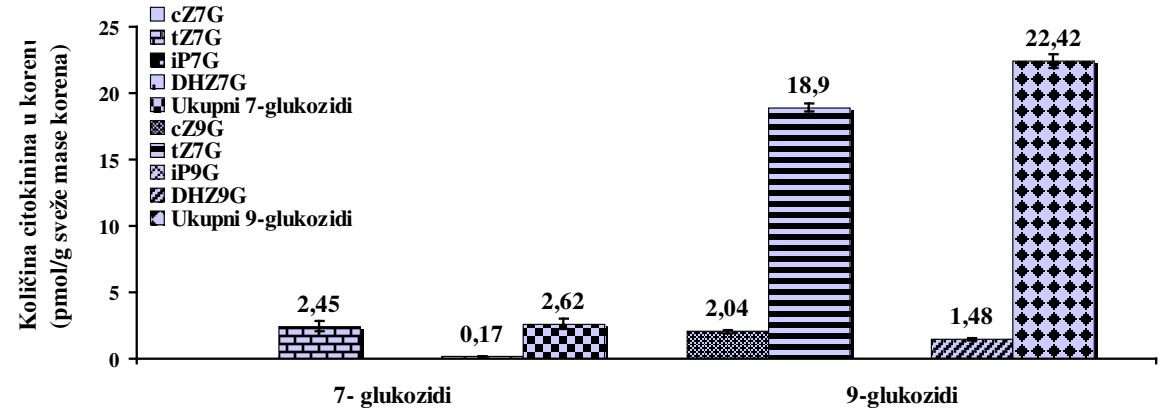
a)


cZ
tZ
iP
DHZ
Ukupne slobodne baze
cZ9R
tZ9R
iP9R
DHZR
Ukupni ribozidi
Količina citokinina u korenu (pmol/g sveže mase korena)
0,16
2,82
2,99
1,62
5
3,6
10,23
Slobodne baze
Ribozidi

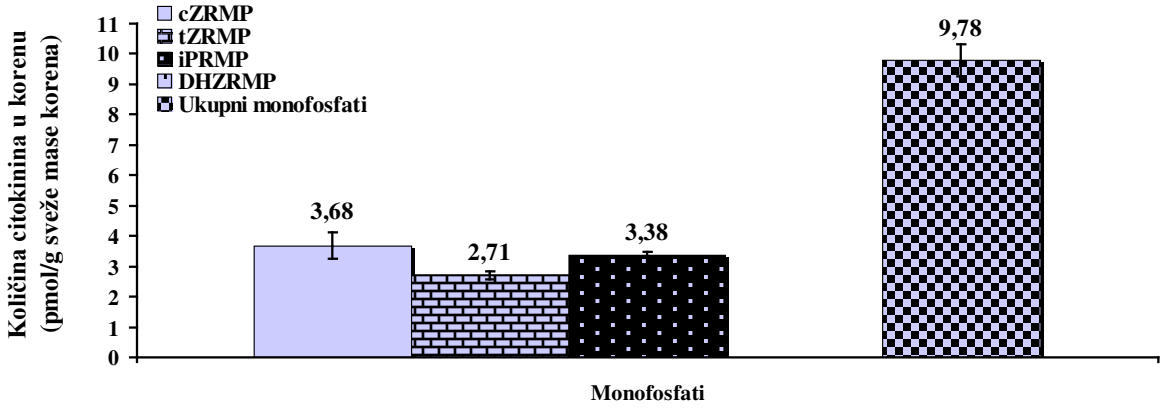
b)


cZOG
tZOG
DHZOG
cZ9ROG
tZ9ROG
DHZ9ROG
Ukupni O-glukozidi
Količina citokinina u korenu (pmol/g sveže mase korena)
1,12
1,44
0,05
1,68
0,54
0,19
5,03
O-glukozidi

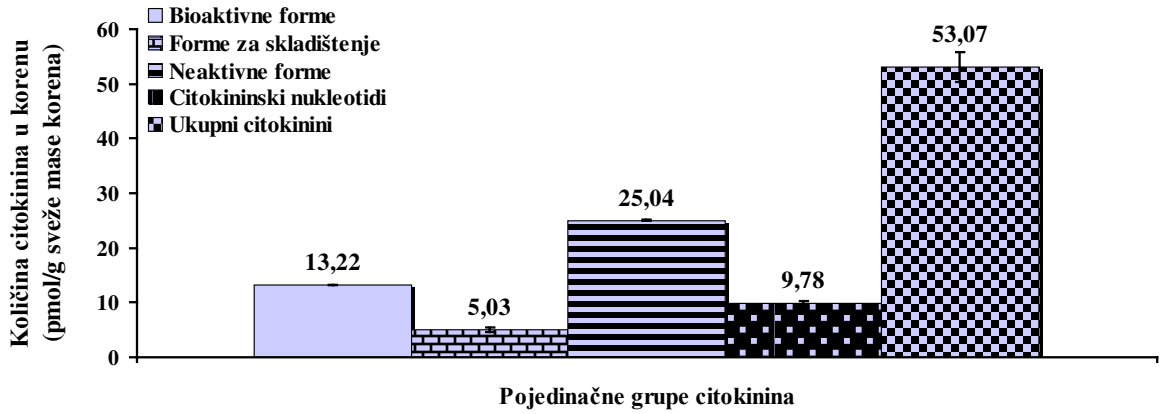
c)


cZ7G
tZ7G
iP7G
DHZ7G
Ukupni 7-glukozidi
cZ9G
tZ7G
iP9G
DHZ9G
Ukupni 9-glukozidi
Količina citokinina u korenu (pmol/g sveže mase korena)
2,45
0,17
2,62
2,04
18,9
1,48
22,42
7- glukozidi
9-glukozidi

d)



e)



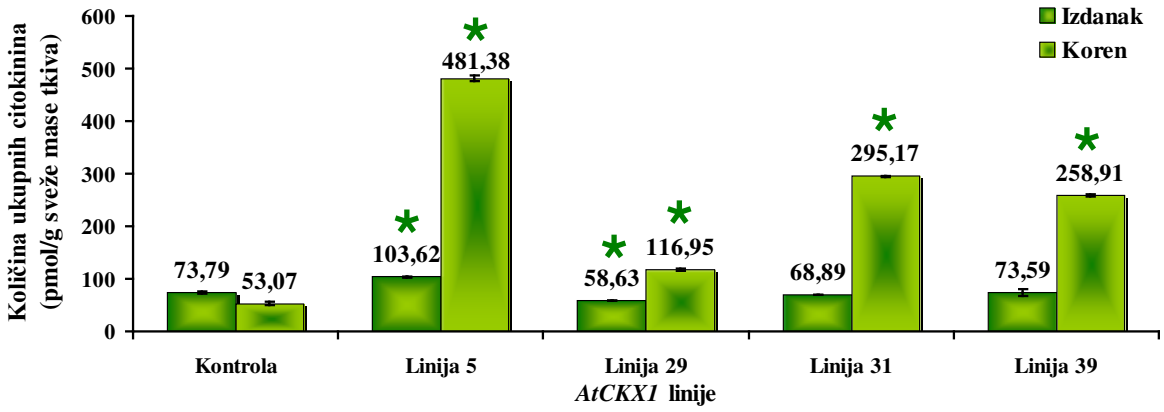
Grafik 5. Citokininski profil korenova kičice iz kulture *in vitro*. a) količina bioaktivnih formi citokinina (slobodne baze i ribozidi), b) količina formi za skladištenje (*O*-glukozidi), c) količina neaktivnih formi citokinina (7- i 9-glukozidi), d) količina citokininskih nukleotida (monofosfati), e) zbirni grafik pojedinačnih grupa i ukupnih citokinina u korenovima. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti.

4.4.2. Detekcija i kvantifikacija endogenih citokinina kod kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

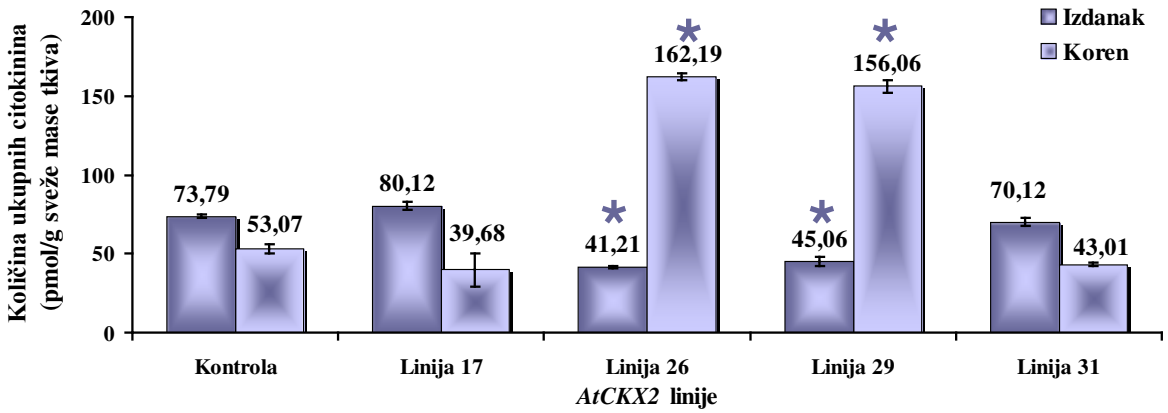
Endogeni citokinini hemijski su identifikovani i kvantifikovani kod kontrole, četiri linije *AtCKX1*-5, -29, -31, -39 i četiri linije *AtCKX2*-17, -26, -29, -31 koje su odabrane za dalja istraživanja. Selekcija linija urađena je na osnovu tri kriterijuma. Prvi kriterijum je da odabrane linije imaju ekspresiju *AtCKX1* i *AtCKX2* gena u oba biljna organa što je potvrđeno u prethodno urađenim qRT-PCR reakcijama. Drugi kriterijum je da sve odabrane *AtCKX* linije, kako u izdanku tako i u korenu, imaju povećanu CKX aktivnost ili barem u nivou kontrole. Treći kriterijum je snižen nivo endogenih bioaktivnih citokinina i u izdanku i u korenu odabranih transgenih linija.

Kvantifikacija ukupnih endogenih citokinina svih analiziranih transgenih linija u poređenju sa kontrolom prikazana je na **Grafiku 6**.

a)



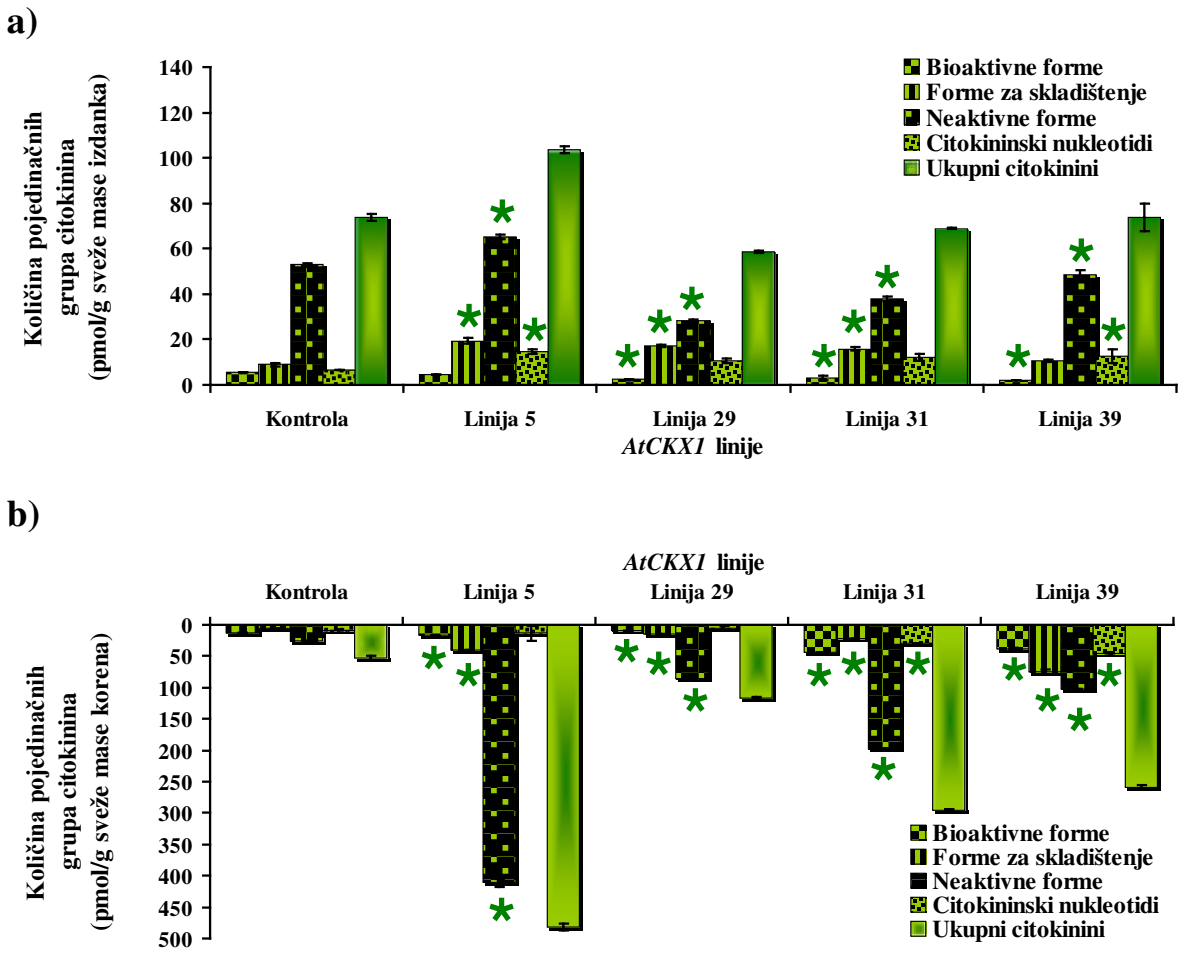
b)



Grafik 6. Količina ukupnih endogenih citokinina u izdancima i korenovima *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) transgenim linijama kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. **oznake statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Jedna linija *AtCKX1*-29 i dve linije *AtCKX2*-26 i -29 pokazuju statistički značajno smanjenje ukupnih citokinina u izdanku u poređenju sa kontrolom (**Grafik 6a i b**). Za razliku od izdanaka u svim analiziranim *AtCKX1* korenovima kvantifikovana je povećana količina ukupnih citokinina (**Grafiku 6a**). Dve linije *AtCKX2*-17 i -31 u korenovima imaju približno istu količinu ukupnih citokinina kao kontrola, dok druge dve analizirane linije pokazuju povećanje citokinina u korenovima (**Grafiku 6b**).

Pored ukupnih, kvantifikovane su i pojedinačne grupe citokinina kod svih *AtCKX* transgenih linija kičice (**Grafik 7**).

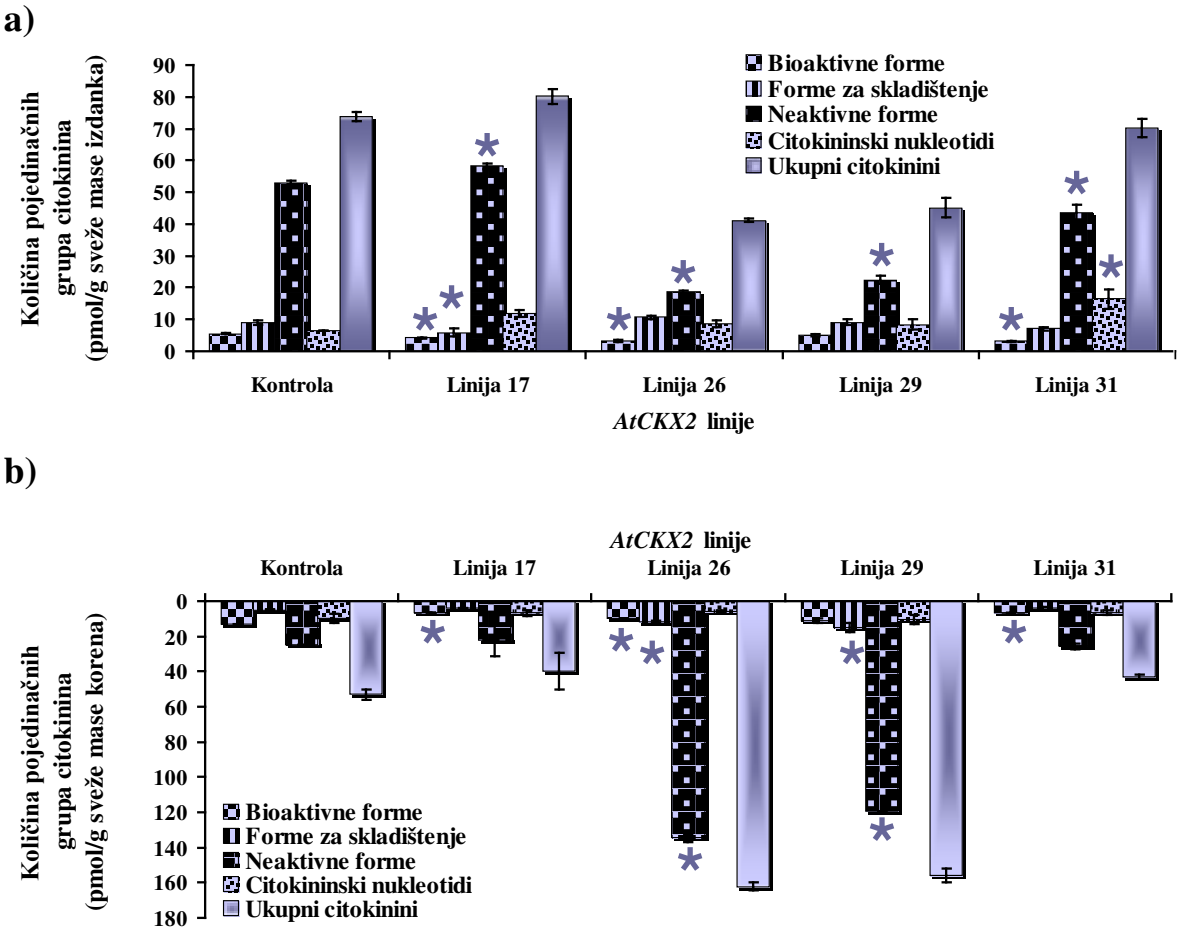


Grafik 7. Količina pojedinačnih grupa citokinina u transgenim *AtCKX1* izdancima (a) i korenovima (b) kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. *oznaka statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Količina bioaktivnih formi citokinina statistički je značajno snižena u izdancima tri linije *AtCKX1*-29, -31, -39) (**Grafik 7a**). Kod linije *AtCKX1*-5 izmerena količina bioaktivnih formi citokinina bila je na nivou kontrole. Kod sve četiri navedene linije utvrđen je porast nivoa formi za skladištenje kao i citokininskih nukleotida. Neaktivne forme citokinina snižene su u poređenju sa kontrolom kod tri linije *AtCKX1*-29, -31, -39. Jedini porast neaktivnih formi citokinina detektovan je samo kod linije *AtCKX1*-5.

U korenu jedne linije *AtCKX1*-29 zapaženo je statistički značajno sniženje bioaktivnih formi citokinina (**Grafik 7b**). U korenovima svih ostalih analiziranih *AtCKX1* linija nivo bioaktivnih formi citokinina je ili u nivou kontrole ili je povišen. Forme za skladištenje i neaktivne forme citokinina izmerene su u većoj količini kod svih *AtCKX1* korenova u poređenju sa kontrolom. Porast količine citokininskih nukleotida takođe je zapažen u korenovima svih *AtCKX1* linija, osim linije 29.

Kod prethodno pomenute tri linije *AtCKX1*-29, -31, -39 uočeno je sniženje bioaktivnih formi citokinina u izdanku, a u korenu samo kod linije 29. Međutim, kod tri linije *AtCKX2*-17, -26, -31 zapaženo je statistički značajno sniženje količine bioaktivnih citokinina kako u izdancima tako i u korenovima. Količina bioaktivnih formi citokinina i u izdanku i u korenu linije *AtCKX2*-29 bila je na nivou kontrole (**Grafik 8**).

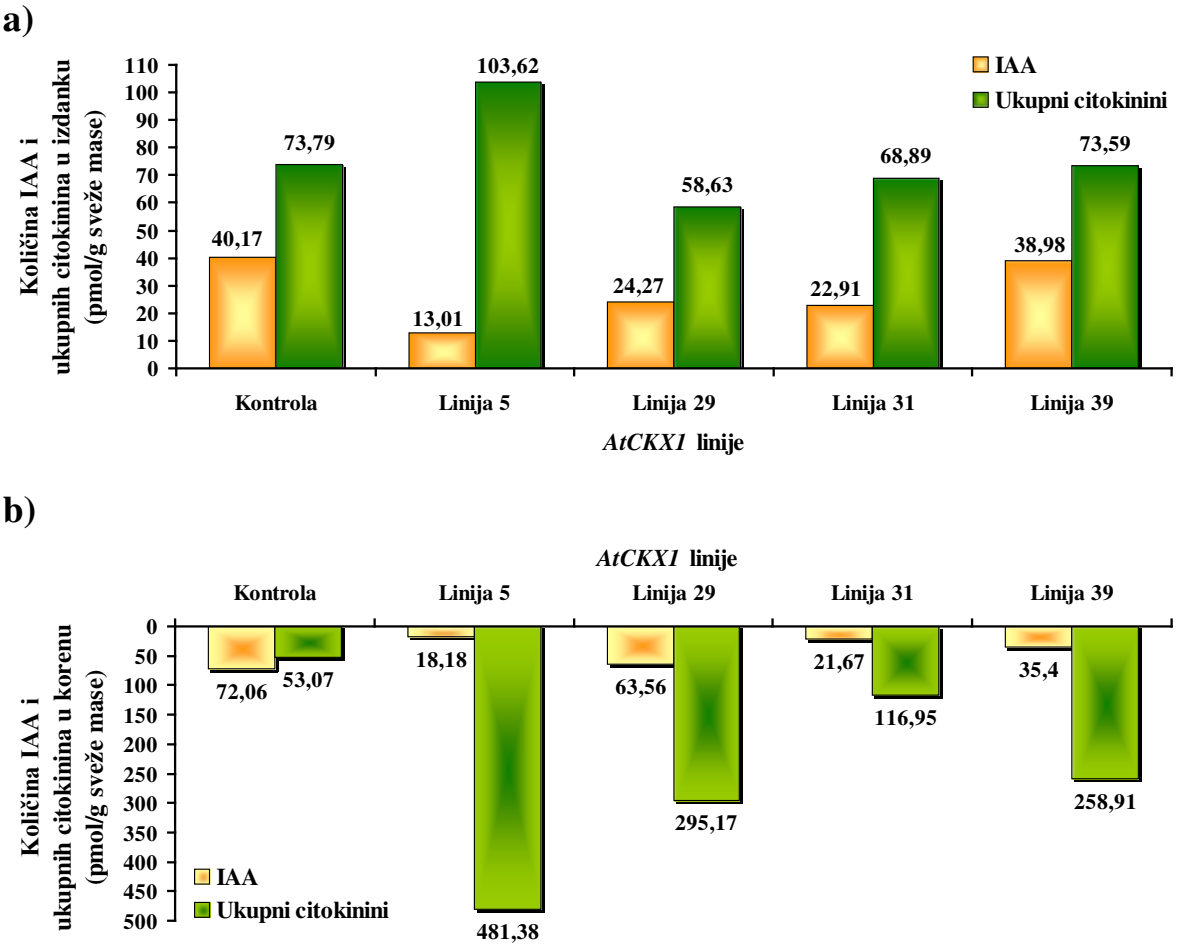


Grafik 8. Količina pojedinačnih grupa citokinina u transgenim *AtCKX2* izdancima (a) i korenovima (b) kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. *oznaka statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

U izdancima i korenovima svih analiziranih *AtCKX2* linija primećuje se da su nivoi formi za skladištenje citokinina, neaktivnih formi citokinina i citokininskih nukleotida na nivou ili malo niži od kontrole. Jedini izuzetak su korenovi linija 26 i 29 gde je zapaženo statistički značajno povećanje količine neaktivnih formi citokinina (**Grafik 8**).

4.4.3. Detekcija i kvantifikacija endogene IAA kod kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

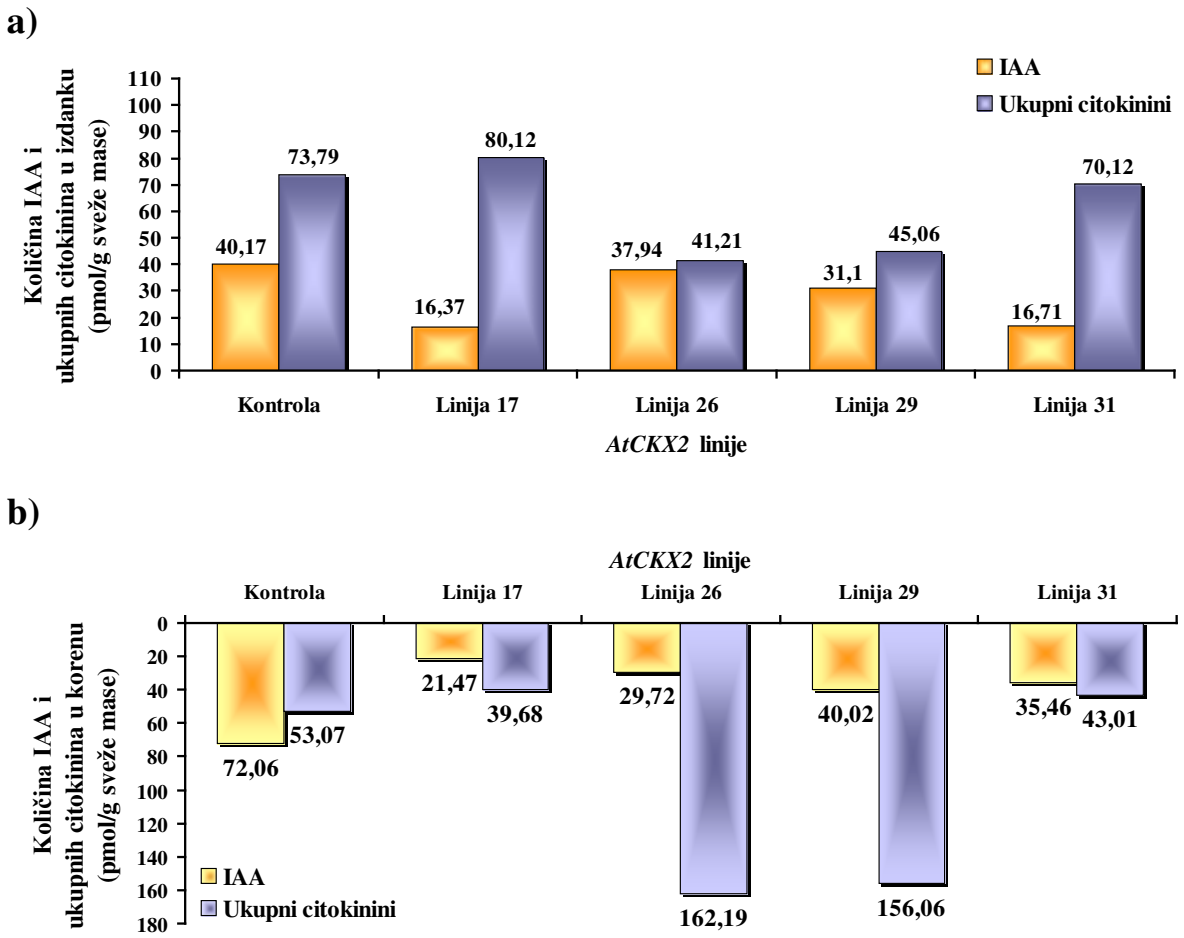
Količina endogene IAA kvantifikovana je kod kontrole, četiri linije *AtCKX1*-5, -29, -31, -39 i četiri linije *AtCKX2*-17, -26, -29, -31 koje su odabrane za dalja istraživanja (**Grafik 9**).



Grafik 9. Količina IAA i ukupnih citokinina u transgenim *AtCKX1* izdancima (a) i korenovima (b) kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti.

Količina endogene IAA manja je u izdancima i korenovima svih analiziranih *AtCKX1* linija u poređenju sa kontrolom (**Grafik 9**). Zanimljivo je pratiti odnos količine IAA i ukupnih citokinina. Kod izdanaka i korenova linije *AtCKX1*-5 može se primetiti značajno povećanje ukupnih endogenih citokinina i istovremeno značajno smanjenje endogene IAA u odnosu na kontrolu. Kod izdanaka linija *AtCKX1*-29 i -31 ukupni endogeni citokinini su sniženi, a količina IAA je duplo manja u odnosu na kontrolu (**Grafik 9a**). Kod korenova istih linija *AtCKX* transgenih biljaka kičice količina endogenih citokinina povećana je u odnosu na kontrolu, ali je količina IAA smanjena (**Grafik 9b**). Izdanak linije *AtCKX1*-39 pokazuje isti odnos endogenih citokinina i IAA kao kontrola, dok je u korenu pomenute linije određena povećana količina citokinina odnosno smanjena količina IAA u poređenju sa kontrolom.

Odnos količine ukupnih endogenih citokinina i IAA varira u izdancima svih analiziranih *AtCKX2* linija. Može se primetiti da postoje linije kod kojih je u izdancima kvantifikovana približno ista količina endogenih citokinina kao i u kontroli, a količina IAA se smanjuje (linije *AtCKX2*-17 i -31) ili je u nivou kontrole (linija *AtCKX2*-26). Kod izdanaka linije *AtCKX2*-29 količina ukupnih endogenih citokinina kao i količina IAA manja je u odnosu na kontrolu (**Grafik 10a**). Kod korenova svih analiziranih *AtCKX2* linija primećeno je smanjenje količina endogene IAA i to kako kod linija koji pokazuju povećanje nivoa ukupnih endogenih citokinina (linije 26 i 29) tako i kod linija sa sniženim nivoom citokinina (linije 17 i 31) (**Grafik 10b**).



Grafik 10. Količina IAA i ukupnih citokinina u transgenim *AtCKX2* izdancima (a) i korenovima (b) kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti.

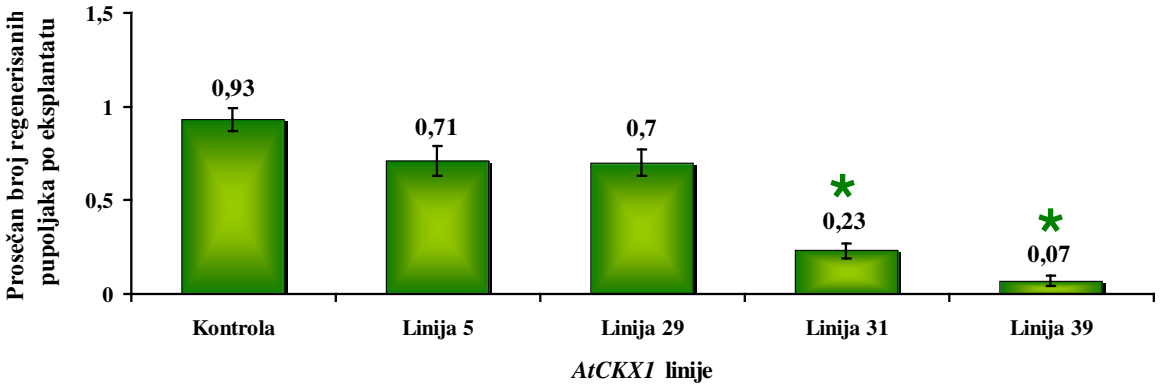
4.5. Morfološka karakterizacija kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

U cilju ispitivanja morfogenetskog potencijala korenova *AtCKX* transgenih linija kičice, odsečci korenova dužine ~10 mm gajeni su tokom jedne subkulture (4 nedelje) na MS hranljivoj podlozi *in vitro*.

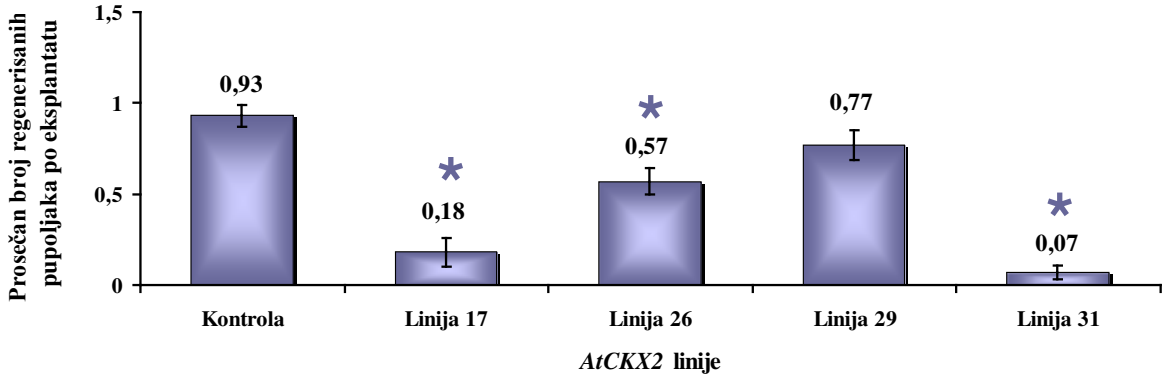
4.5.1. Regeneracija i umnožavanje kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Regeneracija i umnožavanje kontrolnih i odabranih linija *AtCKX* transgenih biljaka kičice vršena je u kulturi korenova. Na kraju eksperimenta (posle jedne subkulture) određivan je ukupan broj adventivnih pupoljaka koji su se razvili na sredini eksplantata i imaju razvijena 2-3 para listova. Prosečan broj novonastalih adventivnih pupoljaka na segmentima netransformisanih i transformisanih korenova prikazan je na **Grafiku 11**.

a)



b)

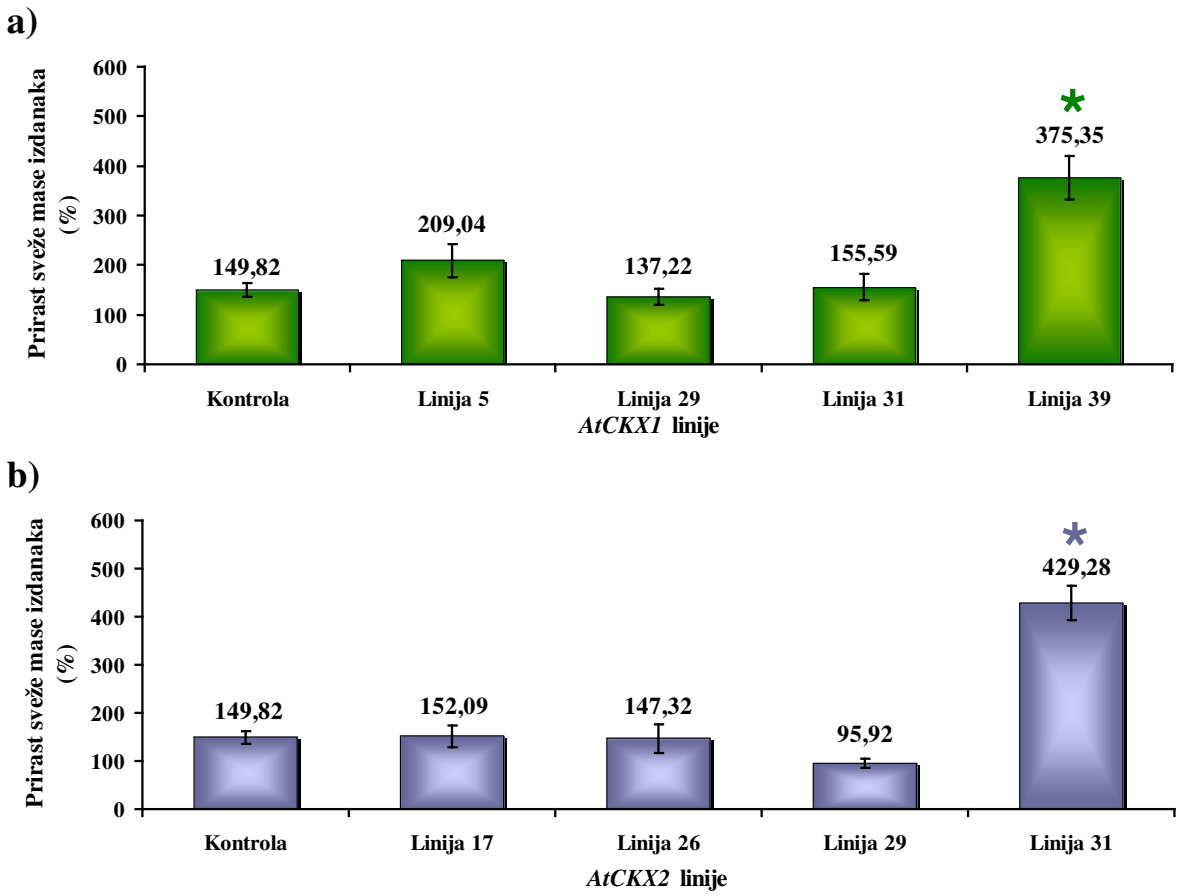


Grafik 11. Regeneracija transgenih *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) izdanaka kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi korenova na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. **oznake statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Kod većine analiziranih *AtCKX1* (dva od četiri) i *AtCKX2* (tri od četiri) linija primećuje se statistički značajno smanjenje prosečnog broja spontano regenerisanih pupoljaka u kulturi korenova posle 4 nedelje, u poređenju sa kontrolom (**Grafik 11**). Kod pojedinih linija spontana regeneracija adventivnih pupoljaka skoro je inhibirana. Broj regenerisanih pupoljaka linije *AtCKX1*-39 (0,07 ± 0,01) kao i linije *AtCKX2*-31 (0,07 ± 0,02) posle 4 nedelja u kulturi manji je od kontrole oko 13 puta.

4.5.2. Prirast mase kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Pored spontane regeneracije i umnožavanja takođe je praćena promena sveže mase kontrolnih i transgenih izdanaka kičice i izračunat je prirast mase posle 4 nedelje gajenja u kulturi (**Grafik 12**).

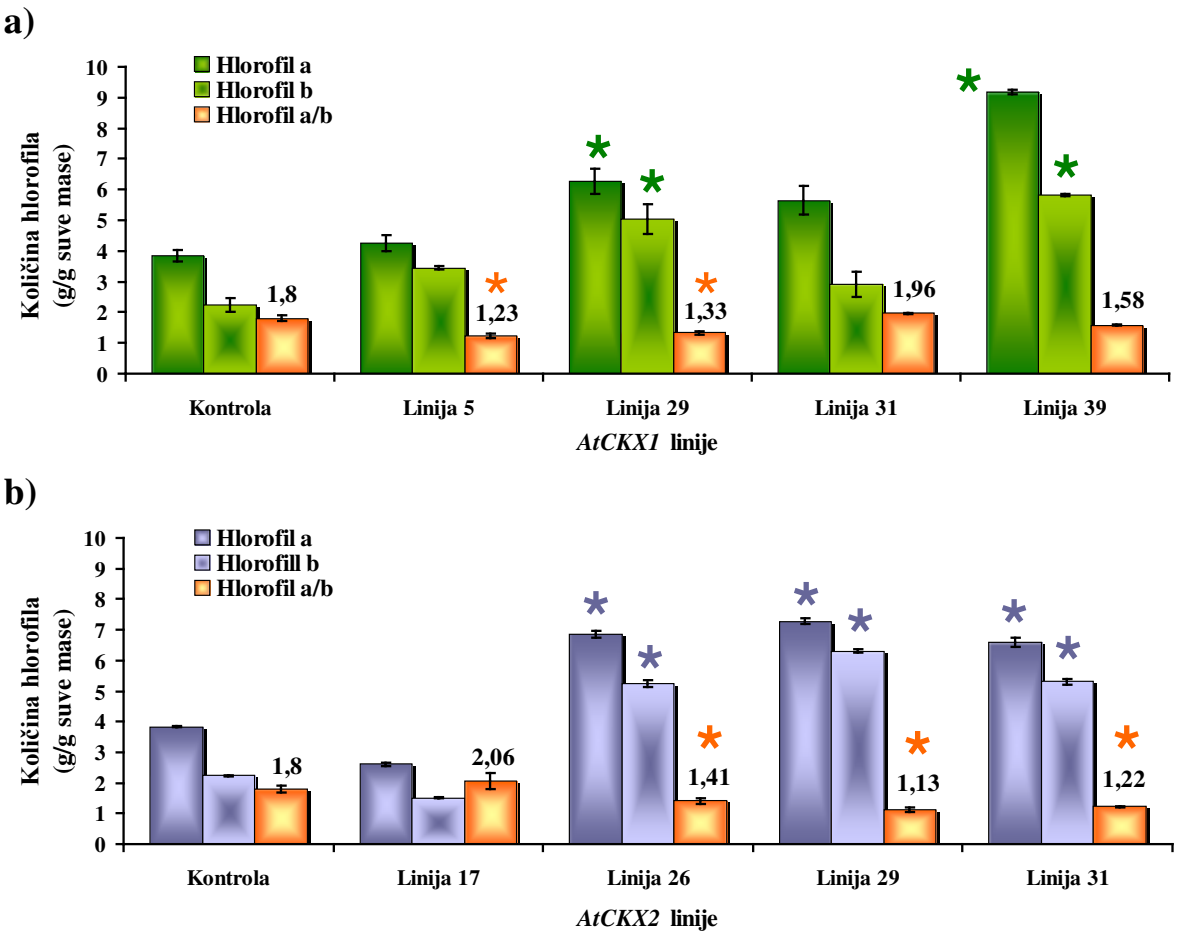


Grafik 12. Prirast sveže mase transgenih *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) izdanaka kičice u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelja gajenja u kulturi na MS hranljivoj podlozi. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. **oznake statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Većina *AtCKX* linija (tri *AtCKX1* i tri *AtCKX2*) nije pokazala značajno odstupanje prirasta mase u odnosu na kontrolu (**Grafik 12**). Međutim, kod linije *AtCKX1*-39 i linije *AtCKX2*-31, zapažen je značajan prirast mase izdanaka u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi. Kod ove dve linije prirast sveže mase izdanaka je oko 2,5 puta veći u odnosu na kontrolu. Interesantno je napomenuti da u kulturi korenova baš ove dve linijea regenerišu najmanji broj adventivnih pupoljaka.

4.6. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Izolacija hlorofila i karotenoida vršena je iz listova kontrolnih i odabranih linija *AtCKX* transgenih izdanaka kičice posle 4 nedelje gajenja u kulturi. Rezultati kvantifikacije hlorofila a i b kao i njihovog međusobnog odnosa predstavljeni su na **Grafiku 13**.

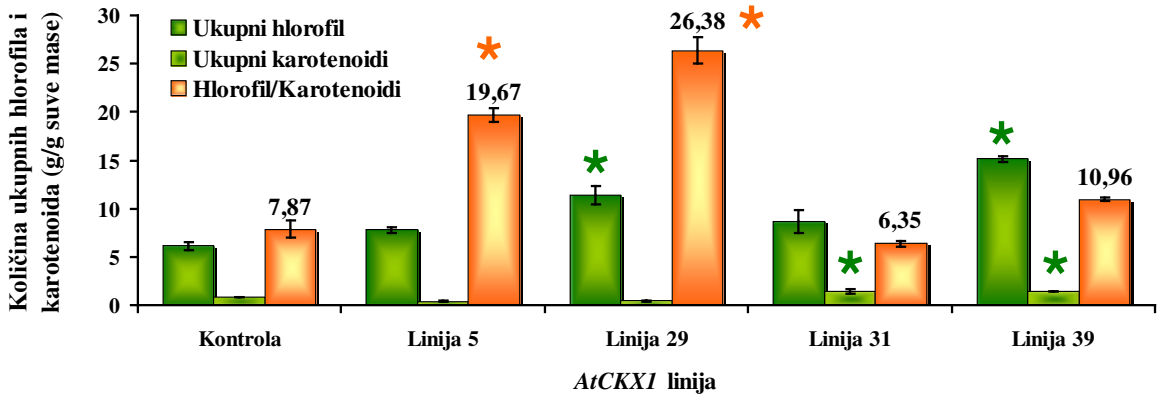


Grafik 13. Količina i odnos hlorofila a i b u transgenim *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) izdancima kičice *in vitro* u poređenju sa kontrolom. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. ***oznake statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

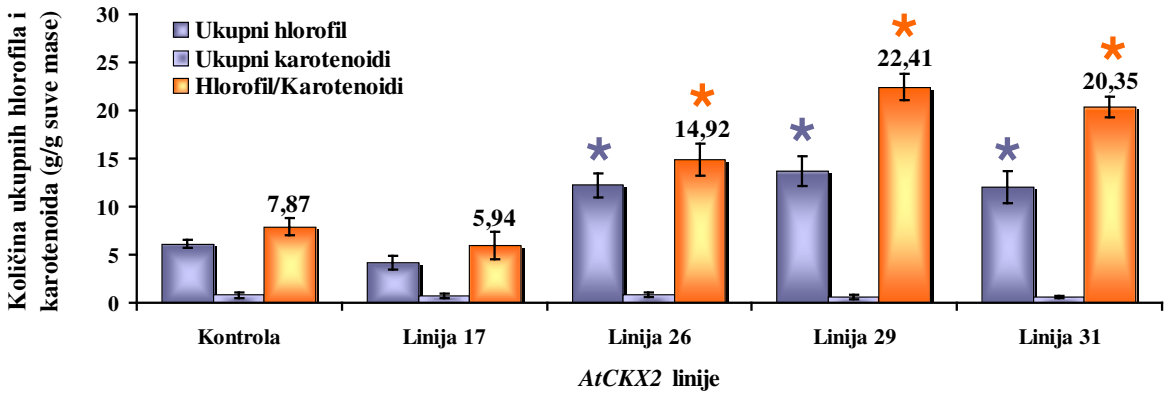
Kod dve linije *AtCKX1*-29 i -39 i tri linije *AtCKX2*-26, -29, -31 izmerena je statistički značajno veća količina hlorofila a i b u poređenju sa kontrolom. Dve linije *AtCKX1*-5 i -29 i tri linije *AtCKX2*-26, -29, -31 pokazuju smanjenje vrednosti odnosa hlorofila a i b u odnosu na kontrolu. Statistički značajno povećanje vrednosti odnosa hlorofila a i b u odnosu na kontrolu nije zapaženo ni kod jedne *AtCKX* linije (**Grafik 13**).

Pored hlorofila urađena je i kvantifikacija karotenoida u listovima kontrolnih i odabranih transgenih linija kičice. Praćen je odnos ukupnih hlorofila i ukupnih karotenoida jer on određuje nivo senescencije biljaka. Dobijeni rezultati prikazani su na **Grafiku 14**.

a)



b)



Grafik 14. Količina i odnos ukupnih hlorofila i karotenoida u transgenim *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) izdancima kičice *in vitro* u poređenju sa kontrolom. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. ***oznake statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

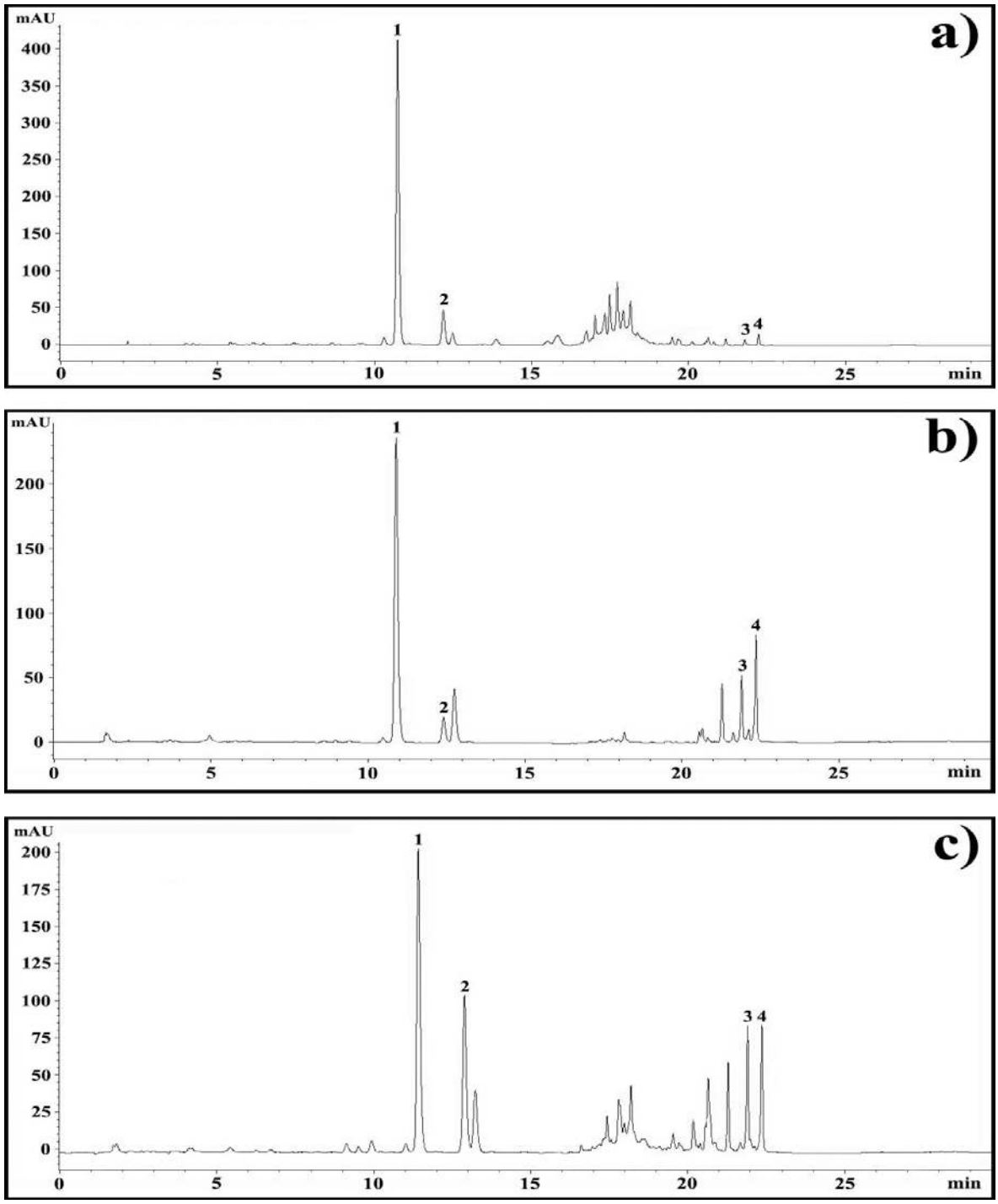
Ukupna količina hlorofila, statistički značajno veća od kontrole, određena je kod dve linije *AtCKX1*-29, -39 i tri linije *AtCKX2*-26, -29, -31. Samo kod dve linije *AtCKX1* -31, -39 zapažena je veća količina ukupnih karotenoida. Kod svih ostalih linija količina ukupnih karotenoida je u nivou kontrole. Odnos ukupnih hlorofila i karotenoida raste u odnosu na kontrolu kod onih linija kod kojih je određen povećan nivo ukupnih hlorofila, a to su *AtCKX1*-29 i *AtCKX2*-26, -29, -31 (**Grafik 14**).

4.7. Analiza sekundarnih metabolita kičice

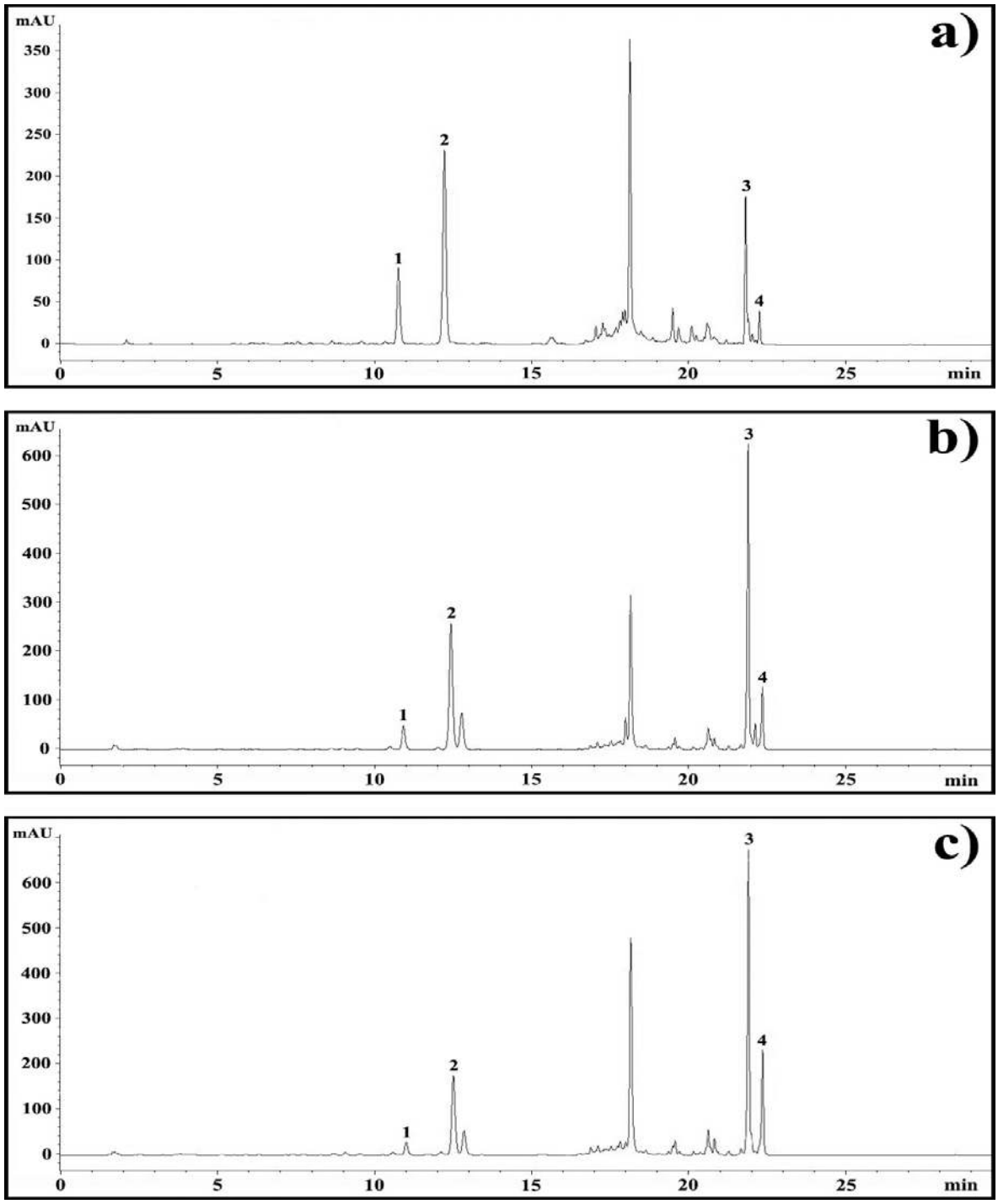
Sekundarni metaboliti ekstrahovani su metanolom iz izdanaka i korenova kontrolnih biljaka iz prirode i kulture kao i prethodno odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*. Posle izolacije urađena je HPLC analiza dobijenih ekstrakata.

Na **Slikama 22** i **23** prikazani su pojedini hromatogrami metanolnih ekstrakata i to izdanaka i korenova kičice iz prirode i kulture *in vitro* i transgene linije *AtCKX1*-29. U prvom delu hromatograma, na retencionim vremenima (Rt) 10–15 minuta uočavaju se pikovi sekoiridoida (1 i 2) koji odgovaraju sverciamarinu i genciopikrinu. Između Rt = 15–20 minuta javljaju se pikovi jedinjenja koja po obliku UV spektara i po položaju apsorpcionih maksimuma odgovaraju flavonoidima. Ksantoni, eustomin i demetileustomin, detektuju se od Rt = 20–25 minuta i označeni su pikovima 3 i 4.

Poređenjem hromatograma metanolnih ekstrakata biljaka poreklom iz prirode i kulture *in vitro* kao i biljaka transgene linije *AtCKX1*-29 *in vitro*, može se primetiti da ne postoje kvalitativne razlike u sadržaju sekundarnih metabolita. Međutim, jasno se uočavaju kvantitativne razlike svih analiziranih sekundarnih metabolita kako u izdancima tako i u korenovima. Primećuje se da je u svim izdancima sekoiridoid sverciamarin dominantna komponenta (**Slika 22**), dok ksanton eustomin dominira u svim korenovima (**Slika 23**).



Slika 22. Hromatogrami metanolnih ekstrakata izdanaka kičice. a) izdanci iz prirode. b) izdanci iz kulture *in vitro*. c) izdanak transgene linije *AtCKX1*-29 iz kulture *in vitro*. 1 – sverciamarin, 2 – genciopikrin, 3 – eustomin, 4 – demetileustomin.

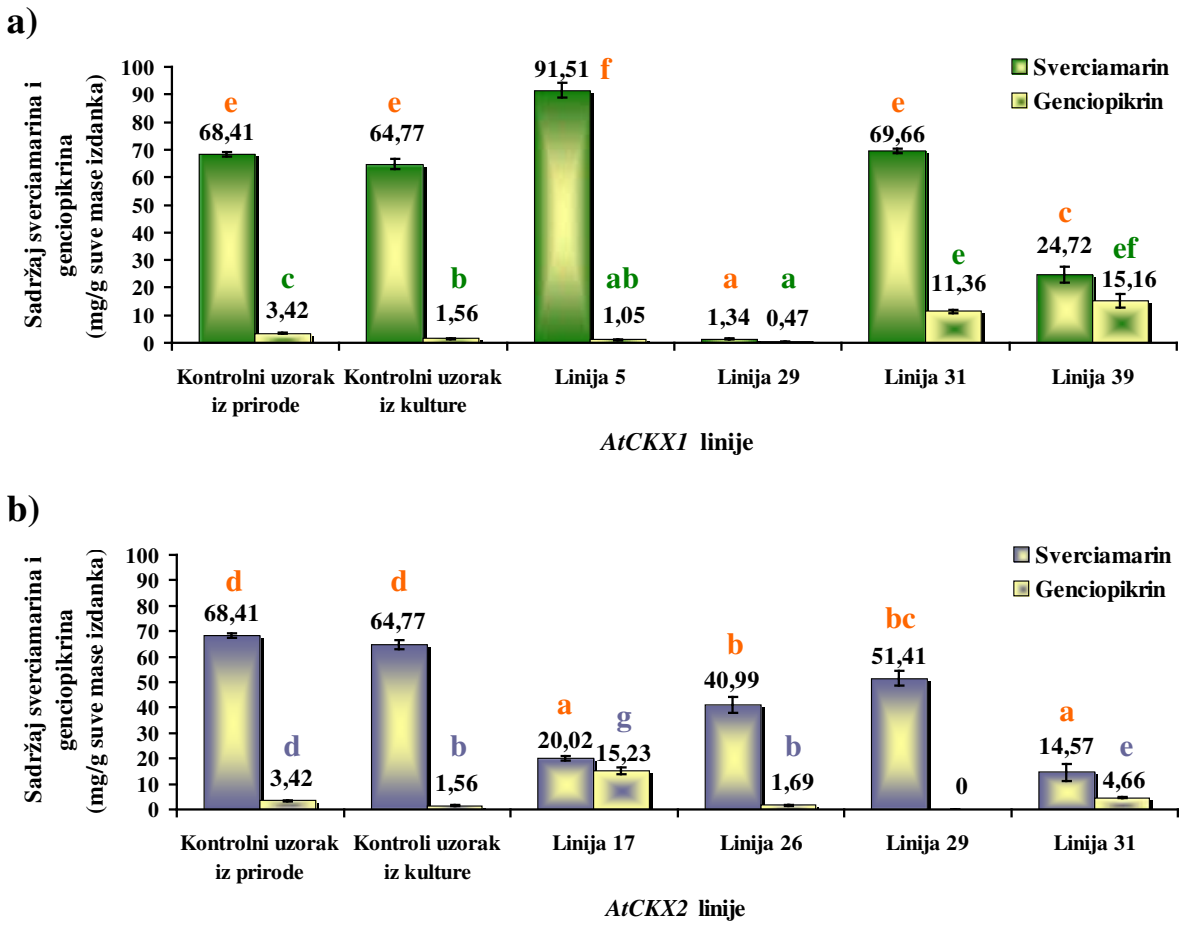


Slika 23. Hromatogrami metanolnog ekstrakta korena kičice. a) korenovi iz prirode. b) korenovi iz kulture *in vitro*. c) korenovi transgene linije *AtCKX1*-29 iz kulture *in vitro*. 1 – sverciamarin, 2 – genciopikrin, 3 – eustomin, 4 – demetileustomin.

Kvantifikacija jedinjenja u svim analiziranim uzorcima (kontrola iz prirode i kulture, četiri linije *AtCKX1*-5, -29, -31, -39 i četiri linije *AtCKX2*-17, -26, -29, -31) urađena je pomoću kalibracione krive. Dobijeni rezultati predstavljeni su na **Graficima 15, 16, 17** i **18**.

U kontrolnim izdancima iz prirode i kulture kao i u svim analiziranim izdancima *AtCKX* linija *in vitro*, sverciamarin je dominantna komponenta (**Grafik 15**). Između izdanaka kičice iz prirode i kulture nema statistički značajne razlike u sadržaju sverciamarina. Sve analizirane *AtCKX* transgene linije, osim jedne (izdanci linije *AtCKX1*-5), imaju manji sadržaj sverciamarina u poređenju sa kontrolnim izdancima iz kulture i prirode (**Grafik 15a**). Samo pomenuta linija odlikuje se značajno većom produkcijom sverciamarina u izdanku (91,51 ± 2,74 mg/g suve mase) u poređenju sa kontrolnim izdancima iz kulture (64,77 ± 3,92 mg/g suve mase) i prirode (68,41 ± 0,91 mg/g suve mase). Kod izdanaka linije *AtCKX1*-29 skoro i da prestaje produkcija sverciamarina, pa je sadržaj ovog gorkog glikozida kod ove linije snižen na samo 1,34 ± 0,11 mg/g suve mase.

Nasuprot sverciamarinu, čiji je sadržaj približno isti u kontrolnim izdancima iz prirode i kulture *in vitro*, genciopikrin se produkuje u duplo većoj količini u kontrolnim izdancima iz prirode u odnosu na kontrolne izdanke *in vitro*. Takođe se može primetiti da je u izdancima dve linije *AtCKX1*-31 i -39 i dve linije *AtCKX2*-17 i -31 produkcija genciopikrina statistički značajno veća u poređenju sa kontrolom iz prirode (**Grafik 15**). Međutim, kod izdanaka linija *AtCKX1*-5 i -29 sadržaj genciopikrina je minimalan dok se u izdanku linije *AtCKX2*-29 detektuje samo u tragovima.



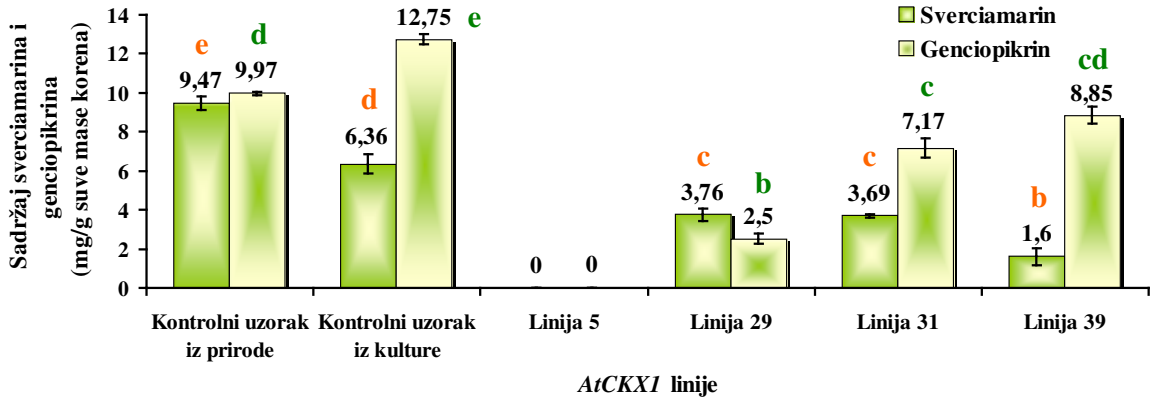
Grafik 15. Sadržaj sekoiridoida (sverciamarina i genciopikrina) u transgenim *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) izdancima kičice *in vitro* u poređenju sa kontrolom iz prirode i kulture. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova i iste boje označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Primećuje se da sverciamarin u korenovima kontrolnih kao i svih analiziranih *AtCKX* transgenih biljaka kičice nije dominantan sekoiridoid kao što je to slučaj u izdancima. Količina akumuliranog sverciamarina i genciopikrina u korenovima kontrolnih korenova iz prirode približno je ista, dok je u kontrolnim korenovima iz kulture sadržaj genciopikrina duplo veći u poređenju sa sverciamarinom (**Grafik 16**).

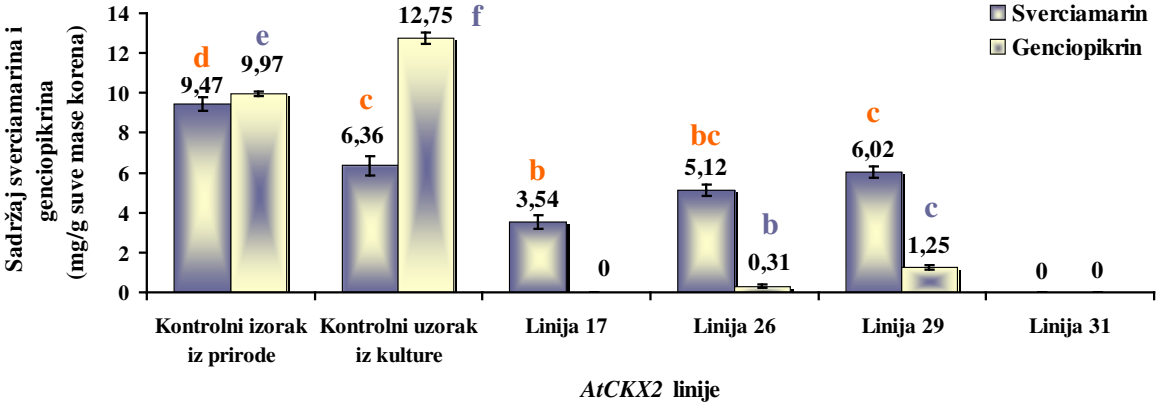
Korenovi iz prirode akumuliraju više sverciamarina (9,47 ± 0,34 mg/g suve mase) nego u korenovima u kulturi (6,36 ± 0,97 mg/g suve mase), a sve analizirane *AtCKX* transgene linije odlikuju se smanjenim sadržajem sverciamarina u odnosu na kontrolne korenove *in vitro*. U pojedinim klonovima sverciamarin se detektuje samo u tragovima i to kod linija *AtCKX1*-5 i *AtCKX2*-31 (**Grafik 16**).

Za razliku od sverciamarina, genciopikrin je dominantan u kontrolnim *in vitro* korenovima (12,75 ± 0,28 mg/g suve mase) u odnosu na korenove iz prirode (6,36 ± 0,47 mg/g suve mase). Analizirani korenovi svih *AtCKX* transgenih linija imaju manji sadržaj genciopikrina u odnosu na korenove iz prirode. U nekim linijama, *AtCKX1*-5 i *AtCKX2*-17 i -31, genciopikrin se detektuje samo u tragovima (**Grafik 16**).

a)



b)



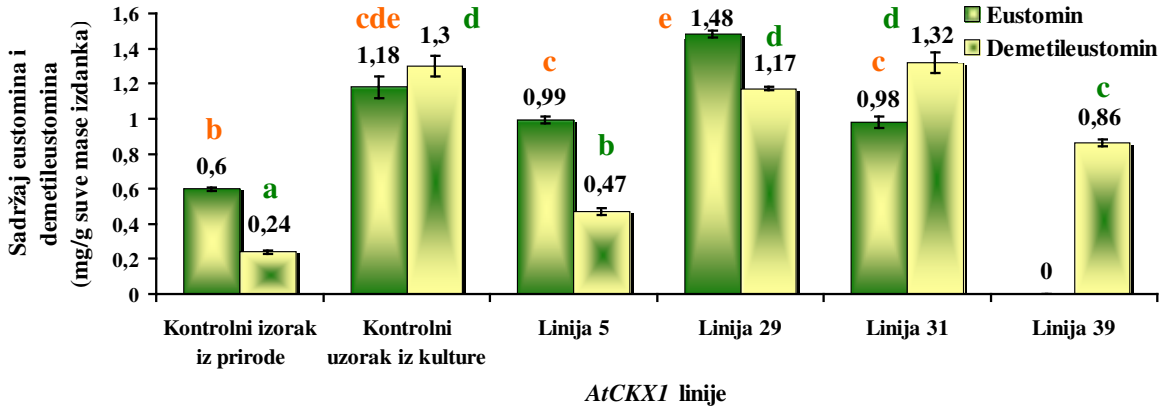
Grafik 16. Sadržaj sekoiridoida (sverciamarina i genciopikrina) u transgenim *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) korenovima kičice *in vitro* u poređenju sa kontrolom iz prirode i kulture.

Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova i iste boje označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

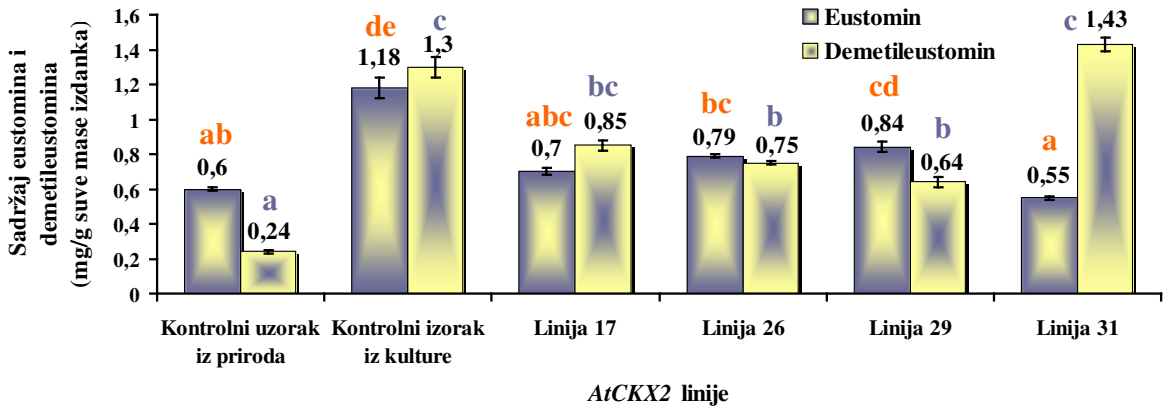
Značajna kvantitativna razlika u produkciji ksantona potvrđena je poređenjem kontrolnih izdanaka iz prirode i kulture (**Grafik 17**). Eustomin se u kontrolnim izdancima *in vitro* javlja u duplo većem sadržaju u odnosu na izdanke iz prirode. Primećuje se da izdanci svih *AtCKX* transgenih linija kičice proizvode više eustomina u odnosu na izdanke iz prirode (0,6 ± 0,01 mg/g suve mase), ali manje u odnosu na kontrolne izdanke *in vitro* (1,18 ± 0,12 mg/g suve mase). Jedini porast sadržaja eustomina u odnosu na izdanke iz prirode, uočen je kod linije *AtCKX1*-29 (1,48 ± 0,02 mg/g suve mase).

U kontrolnim izdancima *in vitro* zapažena je pet puta veća akumulacija demetileustomina u odnosu na kontrolne izdanke iz prirode. Kao i u slučaju eustomina, sve analizirane izdanke *AtCKX* linija karakteriše veći sadržaj demetileustomina u poređenju sa izdancima iz prirode (0,24 ± 0,03 mg/g suve mase), ali manji u poređenju sa izdancima *in vitro* (1,3 ± 0,15 mg/g suve mase). Samo izdanci linije *AtCKX2*-31 imaju značajno povećanu količinu demetileustomina (1,43 ± 0,04 mg/g suve mase) u poređenju sa izdancima iz prirode (**Grafik 17**).

a)

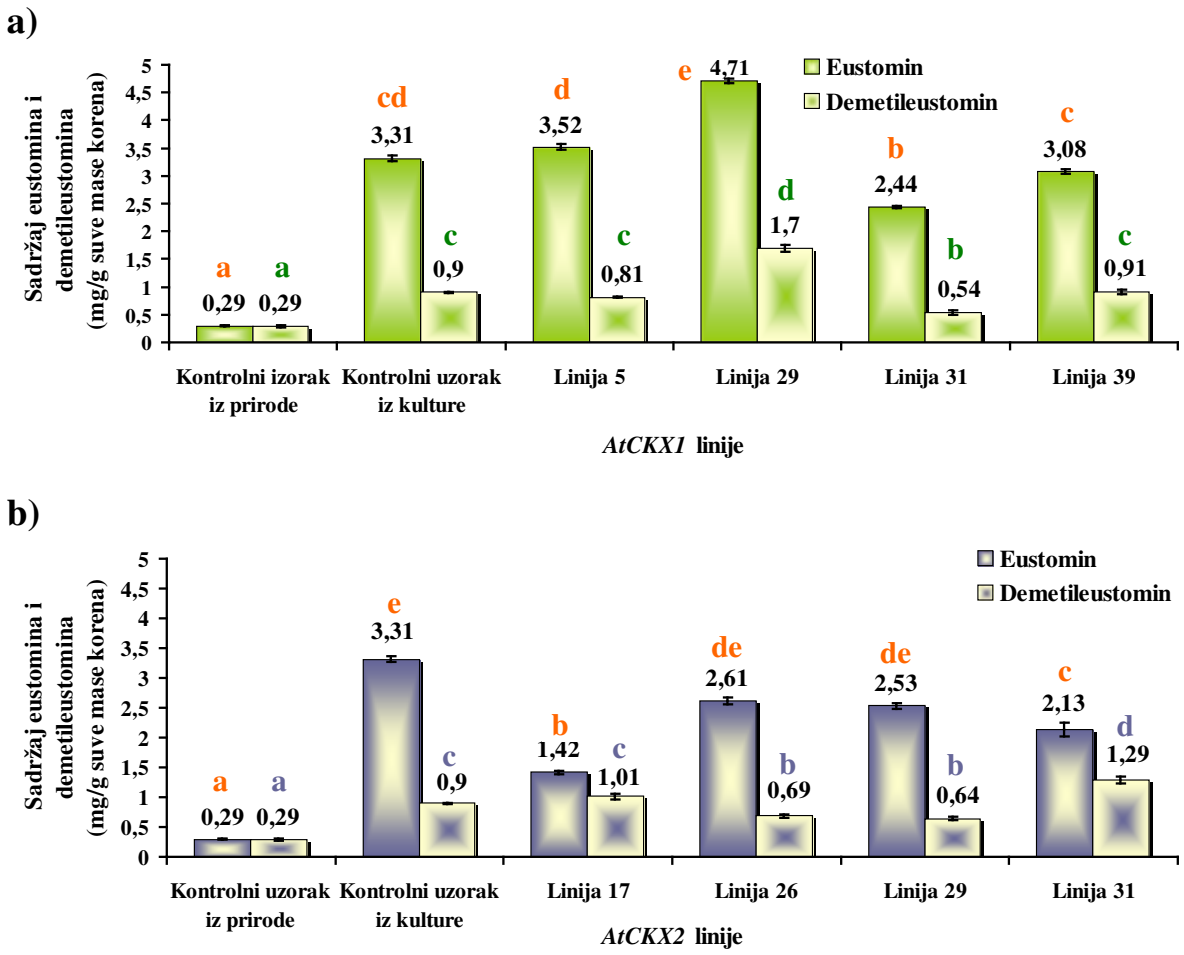


b)



Grafik 17. Sadržaj ksantona (eustomina i demetileustomina) u transgenim *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) izdancima kičice *in vitro* u poređenju sa kontrolom iz prirode i kulture. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova i iste boje označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Utvrđeno je da korenovi iz prirode produkuju isti sadržaj eustomina (0,29 ± 0,01 mg/g suve mase) i demetileustomina (0,29 ± 0,02 mg/g suve mase) u korenovima iz prirode (**Grafik 18**). Uslovi *in vitro* stimulišu produkciju ksantona u korenovima, tako da se sadržaj eustomina povećava deset (3,31 ± 0,55 mg/g suve mase), a demetileustomina tri puta (0,9 ± 0,01 mg/g suve mase). Korenovi većine analiziranih *AtCKX* transgenih linija kičice akumuliraju veću količinu eustomina i demetileustomina u odnosu na korenove iz prirode, ali manju u odnosu na kontrolne korenove *in vitro*. U korenovima linije *AtCKX2*-31 detektovan je veći sadržaj demetileustomina (1,29 ± 0,06 mg/g suve mase) u odnosu na kontrolne izdanke iz prirode. Sadržaj oba ksantona, veći čak i od vrednosti dobijenih kod kontrolnih korenova u kulturi, utvrđen je kod linije *AtCKX1*-29 (količina eustomina iznosi 4,71 ± 0,04 mg/g suve mase, a demetileustomina 1,7 ± 0,06 mg/g suve mase).



Grafik 18. Sadržaj ksantona (eustomina i demetileustomina) u transgenim *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b) korenovima kičice *in vitro* u poređenju sa kontrolom iz prirode i kulture. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova i iste boje označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti primenom LSD testa.

Sve transgene *AtCKX* linije u oba biljna organa pokazuju manja ili veća odstupanja u sadržaju kako sekoiridoida tako i ksantona u poređenju sa netransformisanim biljkama iz prirode i kulture. Sadržaj sekundarnih metabolita pojedinih linija odstupa od vrednosti dobijenih kod većine drugih linija. U **Tabeli 22** sumirani su svi dobijeni rezultati.

Tabela 22. Sinteza svih rezultata analize sekundarnih metabolita kontrolnih i transgenih biljaka kičice.

SEKOIRIDOIDI
SVERCIAMARIN U IZDANCIMA
kontrolni uzorak iz prirode ≈ kontrolni uzorak iz kulture > *AtCKX* linije (osim linije *AtCKX1*-5)
GENCIOPIKRIN U IZDANCIMA
AtCKX linije (osim linija *AtCKX1*-5 i -29 i linija *AtCKX2*-29) > kontrolni uzorak iz prirode > kontrolni uzorak iz kulture
SVERCIAMARIN U KORENOVIMA
kontrolni uzorak iz prirode > kontrolni uzorak iz kulture > *AtCKX* linije
GENCIOPIKRIN U KORENOVIMA
kontrolni uzorak iz kulture > kontrolni uzorak iz prirode > *AtCKX* linije
KSANTONI
EUSTOMIN U IZDANCIMA
kontrolni uzorak iz kulture > *AtCKX* linije (osim linije*AtCKX1*-29) > kontrolni uzorak iz prirode
DEMETILEUSTOMIN U IZDANCIMA
kontrolni uzorak iz kulture > *AtCKX* linije > kontrolni uzorak iz prirode
EUSTOMIN U KORENOVIMA
kontrolni uzorak iz kulture > *AtCKX* linije (osim linije *AtCKX1*-29) > kontrolni uzorak iz prirode
DEMETILEUSTOMIN U KORENOVIMA
kontrolni uzorak iz kulture > *AtCKX* linije (osim linije *AtCKX1*-29 i *AtCKX2*-31) > kontrolni uzorak iz prirode

Najveća količina sverciamarina (veća nego u kontrolnim uzorcima) sintetiše samo u izdanku linije *AtCKX1*-5. Genciopikrin, u količini većoj od obe kontrole, sintetiše se u izdancima linija *AtCKX1*-31 i -39, a takođe i u izdancima linija *AtCKX2*-17 i -31. Generalno, može se reći da se količina sintetisanog sverciamarina i genciopikrina smanjuje u svim korenovima *AtCKX* linija u poređenju sa obe kontrole.

Najveći porast produkcije eustomina u izdanku kao i eustomina i demetileustomina u korenovima, u poređenju sa obe kontrole, potvrđen je kod linije *AtCKX1*-29. Povećana sinteza demetileustomina kako u izdanku tako i u korenu potvrđena je kod linije *AtCKX2*-31.

5. D I S K U S I J A

Ova doktorska disertacija predstavlja istraživanje genetičke transformacije kičice *AtCKX1* i *AtCKX2* genima kao i uticaj izmenjene homeostaze citokinina na produkciju sekundarnih metabolita kičice. Svi predstavljeni rezultati do sada nisu objavljeni kod ove biljne vrste.

5.1. Uspostavljanje kulture korenova *in vitro* i spontana regeneracija biljaka kičice

Zbog mogućnosti direktne regeneracije pupoljaka i/ili somatskih embriona kičice, kulture korenova predstavljaju dobar model sistem za proučavanje morfogeneze *in vitro* ove biljne vrste. Kulturu korenova, pored lake manipulacije, karakterišu i druge prednosti kao što su male razlike u fiziološkom odgovoru i nizak nivo varijabilnosti, a takođe i visok potencijal rasta i metaboličke aktivnosti. Vremenom se pokazalo da se kulturom izolovanih korenova dobija genetski, biohemijski i fenotipski stabilan biljni materijal bez somaklonalnog variranja (Chaturvedi i Sharma, 1987). Kultura korenova kičice ima široku primenu i koristila se za određivanje sastava hranljivih podloga za što bolji rast korena *in vitro* (Marin i Marin, 1998), za proučavanje morfoloških ili fizioloških karakteristika korena (Izumi i sar, 1995) ili za proizvodnju sekundarnih metabolita (Maldonado-Mendoza i Lyola-Vargas, 1995). Međutim, do sada ne postoje literaturni podaci koji govore o upotrebi korena kao eksplantata za genetičku transformaciju. Kultura korenova kičice u ovom radu, po prvi put, pokazala se kao zahvalan model sistem za ispitivanje genetičke transformacije ove biljne vrste.

Uspostavljenje kulture *in vitro C. erythraea* Rafn. opisalo je samo nekoliko autora (**Tabela 2.**). Ipak, kao početni eksplantati, za uspostavljanje kulture *in vitro*, uglavnom su korišćeni segmenti listova. U većini radova navedenih u **Tabeli 2**. indukovano je samo formiranje kalusa. Proces somatske embriogeneze indukovan je u ćelijskoj suspenziji poreklom, takođe, od segmenata listova (Barešová i Kaminek, 1984). Prvi literaturni podaci

o kulturi korenova kičice pojavljuju se tek 2003. godine. U kulturi korenova na čvrstoj MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa IAA (2,85 μM) i BA (0,88 μM) indukovana je regeneracija adventivnih pupoljaka uz prethodno formiranje kalusa na početnim eksplantatima (Piatczak i Wysokinska, 2003). Na kalusu koji se formira na segmentima korenova u 93,5% slučajeva regenerišu se adventivni pupoljci. Spontanu regeneraciju adventivnih pupoljaka u kulturi korenova kičice opisali su i Subotić i sar. (2006) koji su pokazali da je prosečan broj spontano regenerisanih pupoljaka u kulturi korenova kičice, na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, na svetlosti (3,08 ± 0,45) veći nego u mraku (0,12 ± 0,03). Pomenuti autori su takođe pokazali da je prosečan broj regenerisanih pupoljaka u kulturi korenova najveći na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja u poređenju sa MS hranljivom podlogom u koju su dodati IAA, IBA, NAA ili 2,4-D u rasponu koncentracija 0,01-3,0 μM.

Svi navedeni rezultati pokazali su da je kultura korenova kičice vrlo jednostavna za manipulaciju i to su razlozi zbog kojih je ovaj sistem regeneracije i upotrebljen za istraživanja u ovom radu. Za uspostavljanje kulture korenova *in vitro* korišćeni su segmenti korena sterilno isklijalog semena kičice, koji su dalje gajeni na MS hranljivoj podlozi upola razblaženog sastava bez regulatora rastenja. Isti regenerativni sistem, korišćenjem korena kao početnog eksplantata, primenjen je za dalju spontanu regeneraciju i umnožavanje biljaka transformisanih pomoću *A. tumefaciens*.

5.2. Genetička transformacija *C. erythraea* Rafn. pomoću *A. tumefaciens*

Genetička transformacija *C. erythraea* pomoću *A. tumefaciens* imala je nekoliko ciljeva, a pre svega dobijanje transgenih biljaka u čiji se genom integriše i eksprimira *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gen. Glavni cilj ove genetičke transformacije bio je dobijanje biljaka kičice sa sniženim nivoom endogenih biljnih hormona citokinina, a zatim i ispitivanje izmenjene citokininske homeostaze na produkciju sekundarnih metabolita. Transformacija kičice pomoću *A. tumefaciens* takođe je imala za cilj ispitivanje osetljivosti

ove biljne vrste na infekciju pomenutom bakterijom. U skladu sa tim, u ovom radu je po prvi put pokazano da je kičica podložna infekciji sa *A. tumefaciens*.

Iako je upotreba *A. tumefaciens* kao vektora za genetičke transformacije počela odavno, do danas ne postoje literaturni podaci koji govore o transformaciji kičice pomoću ove bakterije. Uspešnost genetičke transformacije biljaka pomoću *A. tumefaciens* zavisi od velikog broja faktora, a pre svega od osetljivosti biljne vrste na bakterijsku infekciju, od vrste eksplantata, veličine povrede biljnog tkiva kao i od selekcije i regenerativnog kapaciteta transformanata (Kim, 2005).

Poznato je da povrede biljnog tkiva mogu pomoći u proizvodnji hemotaksičkih signala i olakšati prolaz bakterijama kroz ćelijski zid biljne ćelije (Gelvin, 2000). U skladu sa navedenim, zasecanje krajeva korenova koji su zatim potapani u *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* bakterijsku suspenziju verovatno je doprinelo relativno visokom stepenu zaražavanja kičice. Uspešnost infekcije pomoću *A. tumefaciens* takođe zavisi i od vrste eksplantata koji se koristi u inokulaciji, pa tako najbolji izbor predstavljaju eksplantati koji imaju visoku regenerativnu sposobnost *in vitro*. U dostupnoj literaturi skoro i da nema podataka o upotrebi korenova kao početnih eksplantata za inokulaciju. Korenovi kičice pokazali su se kao veoma pogodni eksplantati. Uspešnost inokulacije korenova kičice za *AtCKX1* gen iznosi 72% dok za *AtCKX2* gen iznosi 65% (**Tabela 21.**). Na korenovima kičice inokulisanim pomoću *A. tumefaciens* dobijen je visok procenat spontano regenerisanih potencijalno transformisanih *AtCKX* i *AtCKX2* (97,2% odnosno 92,3%) izdanaka *in vitro* (**Tabela 21.**).

Selekcija potencijalnih transformanata takođe je jedan od faktora koji može uticati na efikasnost transformacije. Kod transformacija biljaka pomoću *A. tumefaciens* često se koristi selektabilni marker *hpt* gen koji kodira higromicin fosfotransferazu i omogućava biljkama rezistentnost na antibitoik higromicin. Higromicinska selekcija prvi put je upotrebljena prilikom transformacije pirinča (Hiei i sar, 1994). Generalno se može reći da je higromicin jači selektabilni marker od kanamicina jer brže ubija netransformisane biljne ćelije (Angenon i sar, 1994). Koncentracija higromicina od 10 mgL^{-1} pokazala se najadekvatnijom u kontroli rasta i regeneracije netransformisanog biljnog tkiva kičice.

Početni eksplantati (segmenti korenova) *C. erythraea* i kasnije i regenerisani potencijalni transformanti, razvijali su se na podlozi sa higromicinom tokom četiri subkulture, a zatim i na podlozi bez antibiotika.

5.2.1. Utvrđivanje uspešnosti genetičke transformacije kičice

Analiza potencijalnih transformanata predstavlja jednako važan proces kao i sama genetička transformacija. Prvi korak u dokazivanju genetičke transformacije jeste potvrđivanje prisustva transgena u biljnom genomu. Standardna PCR analiza je kvalitativna metoda koja se uobičajeno koristi za analizu integracije stranog gena od interesa kod dobijenih potencijalnih transformanata (McGarvey i Kaper, 1991). Od segmenata korenova kičice koji su transformisani pomoću *A. tumefaciens* dobijeno je 40 *AtCKX1* odnosno 39 *AtCKX2* klonova koji su uspešno preživeli selekcioni tretman na higromicinu i spontano su se ožiljavali na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. PCR analizom potvrđeno je prisustvo *AtCKX1* i *AtCKX2* gena kod 12 (30%) odnosno 11 (28,2%) klonova.

Još devedesetih godina XX veka otkriveno je da stabilna integracija T-DNK u biljni genom ne garantuje ekspresiju transgena koja predstavlja drugi korak u dokazivanju genetičke transformacije. Kvantitativni RT-PCR je veoma osetljiva metoda koja ne zahteva upotrebu velike količine biljnog materijala, a ipak omogućava kvantifkaciju ekspresije gena od interesa koji je ugrađen u biljni genom (Kim i sar, 2002; Panchuk i sar, 2002; Svensson i sar, 2002). U cilju normalizacije ispitivane cDNK korišćen je referentni gen za aktin koji se obično koristi kao neka vrsta unutrašnje kontrole s obzirom na to da bi njegova ekspresija u biljnom genomu trebalo da bude konstitutivna (Livak i Schmittgen, 2001; Schmidt i Parrott, 2001). Ujednačena količina ukupne cDNK svih uzoraka kičice potvrđena je paralelnom specifičnom amplifikacijom referentnog gena za aktin što je prikazano na **Slici 22**. U cilju kvantifikacije nivoa ekspresije *AtCKX1* i *AtCKX2* gena svih 12 *AtCKX1* i 11 *AtCKX2* linija dalje je analizirano qRT-PCR metodom. Ekspresija *AtCKX1* gena potvrđena je kod šest linija (50%) dok je ekspresija *AtCKX2* gena potvrđena kod sedam linija (64%). Iz ovih rezultata zaključujemo da se *AtCKX1* i *AtCKX2* geni ne eksprimiraju u svim

analiziranim linijama, iako je prethodno dokazano da su uspešno ugrađeni u biljni genom. Ovi rezultati su u skladu sa ranije objavljenim podacima koji govore o tome da ekspresija transgena može da pokazuje manje ili veće razlike među transformantima duvana (Dean i sar, 1988). Kasnije je pokazano da ekspresija trangena varira kako među pojedinačnim transformantima tako i među različitim listovima jednog transformanta. Ovi rezultati mogli bi ukazati na to da se transgen, posle ugrađivanja u biljni genom, eksprimira samo u ciljanim ćelijama (van Leeuwen i sar, 2001). Stabilna ekspresija transgena u velikoj meri zavisi od transkripcione aktivnosti regiona DNK u koji se T-DNK insertovala. Poznato je da do inaktivacije transgena obično dolazi prilikom insertovanja T-DNK u heterohromatin, ali ukoliko se transgen insertuje u eurohromatin, verovatnoća njegove inaktivacije je mala (Meyer i Heidman, 1994). Inaktivacija transgena takođe može biti posledica utišavanja gena na nivou transkripcije što podrazumeva metilaciju DNK ili druge vidove remodelovanja hromatinakoji dovode do kondenzacije i prevođenja eurohromatina u heterehromatin, a samim tim i do inaktivacije promotora. Pri post-transkripcionom utišavanju gena nivo transkripcije je nepromenjen, ali u citoplazmi ne dolazi do akumulacije specifične iRNK usled njene degradacije (Depicker i Van Montagu, 1997; Flavell, 1994; Matzke i Matzke, 1998; Stam i sar, 1997). Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je moguće da se *AtCKX1* i *AtCKX2* geni ne eksprimiraju u svim analiziranim transgenim linijama kičice usled utišavanja gena, koje može biti na transkripcionom ili post-transkripcionom nivou. Postoje literaturni podaci koji govore o utišavanju gena u različitim uzorcima istog tkiva (Jorgensen i sar, 1996; Van der Krol i sar, 1988) što takođe može biti jedan od razloga izostanka ekspresije *AtCKX* gena u nekim analiziranim transgenim linijama kičice.

Krive topljenja dobijene u standardnim qPCR reakcijama imale su izgled tipičnih PCR reakcija u kojima se amplifikuju nespecifični fragmenti (**Slika 20 a i c**). Ovo je rezultat nespecifičnog vezivanja prajmera za sekvence slične ciljnoj sekvenci što dovodi do nespecifične amplifikacije. U ovakvim slučajevima neophodno je uraditi optimizaciju PCR protokola koja se obično sastoji od variranja brojnih parametara kao što su koncentracija Mg^{2+} jona, pH pufera, temperatura denaturacije nukleinskih kiselina i temperatura

vezivanja prajmera, broj cilkusa itd. Takođe je poznato da dodavanje različitih aditiva u PCR reakcionu smešu u potpunosti sprečava ili značajno umanjuje nespecifičnu amplifikaciju. Brojni aditivi dostupni su komercijalno i među njih spadaju DMSO, N,N,N-trimetilglicin (betain), formamid, glicerol, BSA, polietiln glikol, tetrametilamonijum hlorid itd. koriste se kao aditivi u PCR reakcijama (Frackman i sar, 1998; Kovárová i Dráber, 2000; Kitade i sar, 2003; Spiess i sar, 2004; Ralser i sar, 2006; Shaik i sar, 2008). Od svih navedenih aditiva, DMSO se najčešće koristi prilikom optimizacije brojnih PCR reakcija jer slabi vodonične veze i na taj način snižava tačku topljenja DNK i samim tim olakšava specifično vezivanje prajmera za matričnu DNK, a ujedno i otežava nespecifično vezivanje (Sarkar i sar, 1990; Bookstein i sar, 1990; Varadaraj i Skinner, 1994; Frackman i sar, 1998). Uprkos tome što DMSO poboljšava efikasnost i specifičnost standardnih PCR reakcija, oskudan broj literaturnih podataka govori o upotrebi DMSO-a kao aditiva u qPCR reakcijama. Jung i sar. (2001) su pokazali da dodavanje DMSO-a u većoj koncentraciji (10%) dovodi do inhibicije Taq polimeraze. Međutim, isti autori takođe su pokazali da 5% DMSO koji se dodaje u polugotovu reakcionu smešu za qPCR koja sadrži fluorescentnu boju (SYBR Green), značajno povećava osetljivost i specifičnost qPCR reakcije. Rezultati ove disertacije u potpunosti su u skladu sa prethodno navedenim rezultatima jer je dodavanje 5% DMSO-a u qPCR reakcije poboljšalo specifičnost amplifikacije *AtCKX1* i *AtCKX2* gena kičice, što potvrđuju dobre krive topljenja sa po jednim pikom (**Slika 20 b i d**).

Predstavljeni rezultati pokazuju da su biljke *C. erythraea* Rafn. osetljive na infekciju sa *A. tumefaciens*. Genetička transformacija pomoću soja *A. tumefaciens* GV3101 koji nosi pBinHTX plazmide pokazala se kao uspešna metoda za dobijanje transgenih biljaka kičice koje nose *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gen. Protokol razvijen u ovom radu najverovatnije se može primeniti i na genetičke transformacije kičice nekim drugim sojevima *A. tumefaciens*. Imajući u vidu da se kičica koristi kao dobar model organizam za ispitivanje najrazličitijih fizioloških procesa, može se reći da je uspešna genetička transformacija kičice opisana u ovoj disertaciji upotpunila niz uspešnih protokola za manipulaciju ove biljne vrste *in vitro*.

5.3. CKX aktivnost kod *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Imajući u vidu da CKX enzim ima ključnu ulogu u katabolizmu, a samim tim i u kontroli nivoa citokinina u biljnom tkivu, od transformanata koji imaju povišenu ekspresiju *CKX* gena može se očekivati da imaju povišenu CKX aktivnost.

Kod svih analiziranih, kako *AtCKX* transgenih linija kičice tako i kontrole, zapažena je veća CKX aktivnost u korenovima nego u izdancima. Takođe je uočena razlika u CKX aktivnosti između izdanaka i korenova analiziranih transgenih linija kičice. Kod samo jedne linije *AtCKX1*-5 i četiri linije *AtCKX2*-5, -15, -16, -29 pokazano je statistički značajno povećanje CKX aktivnosti u izdancina u odnosu na kontrolu (**Grafik 3a**). Kod *AtCKX1* i *AtCKX2* transgenih biljaka kičice CKX aktivnost je povećana i do 5,74 odnosno do 7,89 puta u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati koji pokazuju veću CKX aktivnost kod *AtCKX2* u odnosu na *AtCKX1* transgene biljke kičice u skladu su sa ranije opisanim kod transgenih biljaka *A. thaliana* (Werner i sar, 2003b). Povećana CKX aktivnosti kod transgenih biljaka kičice takođe je u skladu sa povećanjem koje je utvrđeno kod *AtCKX* transgenih biljaka duvana kod kojih iznosi 2,6 – 10,4 puta u odnosu na kontrolu (Werner i sar, 2001) i kod *AtCKX* transgenih biljaka krompira gde povećanje CKX aktivnosti iznosi 4,9 – 14,3 puta u odnosu na kontrolu (Raspor i sar, 2012). Za razliku od izdanaka, kod većine analiziranih *AtCKX* korenova kičice utvrđena je povećana CKX aktivnost (**Grafik 3b**). Ovi rezultati u skladu su sa ranije objavljenim koji ukazuju na to da je genetička transformacija duvana *AtCKX2* genom uzrokovala povišenu enzimsku aktivnost kod analiziranih korenova u poređenju sa kontrolom (Werner i sar, 2001).

Kvantitativni RT-PCR je pokazao da je broj kopija *AtCKX1* transkripata veći u korenovima nego u izdancima analiziranih linija (**Grafik 2a**), što je u skladu sa povećanom CKX aktivnošću u korenovima *AtCKX1* transgenih biljaka. Suprotno tome, broj kopija *AtCKX2* transkripata veći je u izdancima nego u korenovima analiziranih linija (**Grafik 2b**), dok je povećana CKX aktivnost zapažena kako u većini izdanaka tako i u korenovima svih analiziranih transgenih linija.

5.3.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka kičice iz kulture *in vitro*

Regulacija brojnih fizioloških procesa biljaka zavisi od količine citokinina u biljnom tkivu. Da bi se što bolje razumeo i objasnio uticaj CKX aktivnosti na citokininsku homeostazu po prvi put je analizirana količina i sadržaj ukupnih kao i pojedinačnih grupa endogenih citokinina netransfromisanih biljaka kičice. Posebno su analizirane sve 4 grupe u koje su citokini podeljeni prema svojoj biološkoj funkciji.

Bioaktivni citokinini (slobodne baze i ribozidi): U izdancima netransformisanih biljaka kičice *in vitro* detektovano je prisustvo *c*Z i *t*Z kao i njihovih ribozida *c*Z9R i *t*Z9R. Očekivano je primetiti da *t*Z i *t*Z9R ima u većoj količini u odnosu na *c*Z i *c*Z9R (**Grafik 4a**). Za razliku od izdanaka, u korenovima kičice *in vitro* nije detektovan *c*Z, ali njegov ribozid jeste (**Grafik 5a**). Dobijeni rezultati o količini *t*Z-tipa citokinina u biljnom tkivu kičice u potpunosti se slažu sa podacima o dominaciji istog tipa citokinina kod *A. thaliana* i duvana (Werner i sar, 2001, 2003a, 2003b; Miyawaki i sar, 2006). U izdancima kičice primećeno je odsustvo iP-a, ali i prisustvo njegovog ribozida iP9R. Za razliku od izdanaka, u korenovima kičice *in vitro* nije detektovan *c*Z, dok je njegov ribozid uspešno detektovan. Zajedničko za izdanke i za korenove je to da je u oba biljna organa određeno prisustvo DHZ-a, ali ne i njegovog ribozida (**Grafik 4a i 5a**). Sličan rezultat, odsustvo *c*Z i DHZ-a i prisustvo njihovih ribozida, zapažen je i kod *A. thaliana* (Dwivedi i sar, 2010). Imajući u vidu da su ribozidi prekursori slobodnih baza i da imaju veoma važnu ulogu u transportu citokinina, dobijeni rezultati verovatno ukazuju na različitu regulaciju citokininske homeostaze kako u izdancima tako i u korenovima netransformisanih biljaka kičice. Detekcija ribozida bi možda mogla da ukaže i na tkivnu specifičnost određenih tipova citokinina. Ukupna količina slobodnih baza i ribozida u korenu povećana je u poređenju sa izdankom, ali je njihov odnos isti (ukupni ribozidi su oko 3,5 puta veći od količine slobodnih baza u oba biljna organa). Povećana količina bioaktivnih formi citokinina u korenu kičice mogla bi se objasniti samom sintezom citokinina u korenu. Zanimljivo je

primetiti da iP, supstrat sa najvećim afinitetom za CKX, nije detektovan ni u izdancima ni u korenovima netransformisanih biljaka kičice.

Kada su u pitanju **forme za skladištenje citokinina (*O*-glukozidi)** primećen je sličan trend. U izdancima kičice *in vitro* dominira *t*ZOG dok u korenu dominira *c*Z9ROG (**Grafici 4b** i **5b**). Kod treće grupe citokinina odnosno kod **neaktivnih formi citokinina (7- i 9- glukozidi)** takođe je primećena najveća količina *t*Z-tipa citokinina. Zajedničko za izdanke i za korenove je to da u oba biljna organa preovladava 7-glukozid (*t*Z7G) i 9-glukozid (*t*Z9G) (**Grafici 4c** i **5c**). Ukupna količina 7- i 9- glukozida u izdanku veća je u poređenju sa korenom, ali je njihov odnos isti tj. količina 9-glukozida je oko 8,5 puta veća od količine detektovanih 7-glukozida. Dominacija *t*Z-tipa citokinina jedino nije primećena kod četvrte grupe citokinina u koju spadaju **citokininski nukleotidi tj. monofosfati**. U izdanku je primećena dominacija iPRMP-a, a u korenu cZRMP-a (**Grafici 4d** i **5d**). Prikazani rezultati ukazuju na evidentne razlike u biosintezi citokinina u izdancima i korenovima netransformisanih biljaka kičice.

Neaktivne forme citokinina preovladavaju u izdancima i korenovima netransformisanih biljaka kičice (**Grafici 4e** i **5e**). Bioaktivne forme citokinina izmerene su u najmanjoj količini u izdanku. Međutim, u izdanku je takođe zapažena 1,6 puta veća količina formi za skladištenje citokinina što se eventualno može objasniti mehanizmom citokininske homeostaze kojim biljka sama reguliše nivo citokinina u izdancima i korenovima u odnosu na svoje potrebe. Suprotno izdancima, u korenovima je izmerena 2,6 puta veća količina bioaktivnih formi citokinina nego formi za skladištenje citokinina. Ipak, količina ukupnih endogenih citokinina 1,4 puta veća je u izdanku nego u korenu. Veća količina endogenih citokinina u izdanku verovatno se može objasniti transportom citokinina u izdanak posle sinteze u korenu (Noodén i Letham, 2003).

5.3.2. Sadržaj endogenih citokinina i auksina kod odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Posle određivanja CKX aktivnosti u različtim biljnim organima odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*, praćen je i uticaj aktivnosti ovog enzima na količinu ukupnih citokinina kao i različitih citokininskih metabolita u različitim biljnim organima. Samo izdanci linije *AtCKX1*-29 pokazuju statistički značajno smanjenje ukupnih citokinina u izdanku u poređenju sa kontrolom, dok im je CKX aktivnost u nivou kontrole (**Grafik 6a** i **3a**). Međutim, za razliku od izdanaka, u svim analiziranim *AtCKX1* korenovima dobijena je povećana količina ukupnih citokinina (**Grafik 6a**). Ovaj rezultat na prvi pogled deluje kontradiktorno s obzirom na to da je u korenovima *AtCKX1* transformanata zapažena povećana CKX aktivnost (**Grafik 3a**) što bi teorijski podrazumevalo i sniženu količinu ukupnih citokinina. Sličan rezultat dobijen je i kod *AtCKX2* transformanata (**Grafik 6b**). Izdanci dve linije *AtCKX2*-26 i -29 pokazuju statistički značajno smanjenje ukupnih citokinina u poređenju sa kontrolom. Prethodno je određeno da ova dva klona imaju povećanu CKX aktivnost u izdancima. Za razliku od izdanaka, u korenovima svih analiziranih *AtCKX2* transformanata određeno je povećanje ukupnih endogenih citokinina. Znači, isti rezultat je dobijen i u korenovima *AtCKX1* i *AtCKX2* transformanata - povećana CKX aktivnost i porast ukupne količine endogenih citokinina. Ovo bi se moglo objasniti time da CKX pojačava svoju aktivnost u prisustvu veće količine endogenih citokinina u određenom biljnom tkivu što je pokazano kod krompira (Motyka i sar, 2003). Dobijeni rezultati svakako su u skladu sa zapažanjem da su citokinini najzastupljeniji u biljnom organu koji je dominantno mesto njihove sinteze tj. u korenu (Letham, 1994). Povećana CKX aktivnost i porast ukupne količine endogenih citokinina može se objasniti i time što se zna da je CKX aktivnost u direktnoj vezi sa količinom citokinina (Armstrong, 1994; Jones i Schreiber, 1997; Kamínek i sar, 1997). Motyka i Kamínek (1990) su pokazali da se CKX aktivnost značajno povećava kod ćelija duvana koje su tretirane egzogenim citokininima. Stimulisanje CKX aktivnosti takođe je zapaženo u slučaju povišenih egzogeno primenjenih ili endogenih citokinina što je pokazano kod *ipt* transgenih biljaka

duvana (Zhang i sar, 1995; Motyka i sar, 1996; Redig i sar, 1997). Može se reći da odnos CKX aktivnosti i količine endogenih citokinina funkcioniše po principu pozitivne povratne sprege i da biljka sama reguliše njihov odnos u cilju postizanja homeostaze citokinina u ćelijama (Kamínek i sar, 1997; Zažimalová i sar, 1999).

Interesantno je bilo pratiti i uticaj različite CKX aktivnosti na zastupljenost pojedinačnih grupa citokininskih metabolita u ukupnoj količini endogenih citokinina kako u izdancima tako i u korenovima svih transgenih linija. Tako je pokazano da su nivoi bioaktivnih formi citokinina, u koje spadaju sve slobodne baze i njihovi odgovarajući ribozidi, statistički značajno snižene u izdancima većine analiziranih transgenih *AtCKX1* linija (**Grafika 7a**). Važno je napomenuti da izdanci tri linije *AtCKX1*-29, -31 i -39 kao i tri linije *AtCKX2*-17, -26 i -31 imaju snižene bioaktivne forme citokinina u izdanku iako njihova CKX aktivnost nije povišena u izdanku. Takođe je uočeno da svih šest pomenutih linija ima povišenu CKX aktivnost u korenu. Ovo bi se možda moglo objasniti time da se citokinini više razgrađuju na mestu same biosinteze tj. u korenu i zbog toga manja količina citokinina dospeva u izdanak kičice. Za razliku od pomenutih, linija *AtCKX1*-5 ima snižene bioaktivne forme citokinina u izdancima kao i povišenu CKX aktivnost.

U korenovima samo jedne linije *AtCKX1*-29 zapaženo je statistički značajno sniženje bioaktivnih formi citokinina dok je u korenovima svih ostalih analiziranih *AtCKX1* linija nivo bioaktivnih formi citokinina povišen (**Grafik 7b**). Statistički značajno sniženje količine bioaktivnih citokinina kako u izdancima tako i u korenovima dobijeno je kod većine analiziranih *AtCKX2* linija (**Grafik 8**). Prethodno je pokazano da je u korenovima transgenih *AtCKX* linija uočena povećana CKX aktivnost, dok je količina bioaktivnih formi citokinina promenljiva – opada kod samo jedne *AtCKX1* linije (29) i kod čak tri *AtCKX2* linije (17, 26, 31). Sniženje količine bioaktivnih formi citokinina takođe je uočeno kod *AtCKX* transformanata duvana (Werner i sar, 2001) i kod krompira kultivara Désirée (Raspor i sar, 2012).

U izdancima pojedinih linija koje pokazuju značajno snižen nivo bioaktivnih formi citokinina utvrđen je porast nivoa formi za skladištenje (*AtCKX1*-29, -31 i -39 i *AtCKX2*-17). Porast nivoa citokininskih nukleotida uočen je kod dve transgene linije kičice –

AtCKX1-39 i *AtCKX2*-31. Međutim, kod *AtCKX1* linija koje imaju snižen nivo bioaktivnih formi citokinina, u izdancima je uočen snižen nivo dok je u korenovima uočen povišen nivo neaktivnih formi citokinina u odnosu na kontrolu (**Grafik 7**). Kod *AtCKX2* linija nije primećen isti slučaj. Kod dve linije (*AtCKX2*-26 i -31) uočen je snižen nivo, a kod korenova dve *AtCKX2* linije (26 i 29) detektovan je porast nivoa neaktivnih formi citokinina (**Grafik 8**).

Dobijeni rezultati pokazuju da ukoliko povećana ekspresija *AtCKX* gena kičice uzrokuje pojačanu CKX aktivnost ne mora nužno da dovede i do sniženja ukupne količine endogenih citokinina. Sniženje bioaktivnih formi citokinina karakteriše citokininske *AtCKX* transformante. Povećanje nivoa ukupnih endogenih citokinina kičice može se objasniti prvenstveno povećanjem količine formi za skladištenje citokinina, neaktivnih formi citokinina i citokininskih nukleotida. Na nivo bioaktivnih formi citokinina ne utiče samo CKX aktivnost nego i drugi mehanizmi regulacije i transporta citokinina kroz biljku. Povećanje svake od ove grupe citokinina i pored sniženja nivoa bioaktivnih formi citokinina, može da dovede do povećanja ukupne količine citokinina. Najverovatnije, kod *AtCKX* transformanata bioaktivne forme citokinina (koje su ujedno i najvažniji supstrati za CKX) stalno bivaju degradovane od strane CKX enzima koji ima povećanu aktivnost. Usled degradacije bioaktivnih formi citokinina, možemo pretpostaviti, da biljka stalno dobija signal za *de novo* sintezu citokinina koji se dalje konvertuju u forme za skladištenje, neaktivne forme citokinina kao i citokininske nukleotide. Analiza transgenih biljaka krompira sorte Solara koje imaju povišenu ekspresiju *AtCKX1* gena pokazala je povećanu količinu formi za skladištenje citokinina (Hartmann i sar, 2011). Povećana sinteza formi za skladištenje kao i neaktivnih formi citokinina takođe je pokazana i kod *AtCKX2* transformanata krompira kultivara Désirée (Raspor i sar, 2012). Navedeni rezultati bi mogli da ukažu da je povećana količina formi za skladištenje i neaktivnih formi citokinina uobičajena pojava kod biljaka koje se transformišu *AtCKX* genima. Sinteza svih navedenih formi citokinina značajno utiče i može da opravda povećanje ukupne količine endogenih citokinina *AtCKX* transformanata kičice.

Promenjena citokininska homeostaza izazvana ekspresijom *AtCKX* gena kod transgenih biljaka kičice bez sumnje se odražava i na metabolizam auksina što rezultuje prilično nepredvidivim promenama količine auksina u samom biljnom tkivu. Iako endogeni nivo citokinina nema jednoznačan efekat na promenu endogenog nivoa IAA, ipak se može reći da je odnos endogenih citokinina i auksina prilično međusobno zavisan kod transgenih biljaka kičice. Kod izdanaka dve od četiri *AtCKX1* linije, povećanje ukupnih endogenih citokinina utiče na smanjenje endogenog nivoa IAA u odnosu na kontrolu (**Grafik 9a**). Kod korenova istih linija zapažen je isti odnos citokinina i auksina – količina endogenih citokinina povećana je u odnosu na kontrolu dok je količina IAA smanjena (**Grafik 9b**). Iz ovog bi se moglo zaključiti da kod transgenih *AtCKX1* linija kičice, citokinini negativno utiču na količinu auksina tj. povišen nivo citokinina utiče na smanjenje količine IAA i obrnuto, što je već potvrđeno *ipt* mutanata duvana i *A. thaliana* (Eklöf i sar, 1997; Nordström i sar, 2004) i kod *pls* mutanata *A. thaliana* (Liu i sar, 2010). Dobijeni rezultati nisu u skladu sa prethodno opisanim koji govore o tome da povećana CKX aktivnost smanjuje nivo endogenih citokinina što utiče na sniženje nivoa endogenih auksina kod *A. thaliana* (Werner i sar, 2001; Jones i sar, 2010). Sa druge strane, odnos nivoa ukupnih endogenih citokinina i IAA pokazuje variranje u izdancima svih analiziranih *AtCKX2* transformanata (**Grafik 10a**). Međutim, kod korenova svih transgenih *AtCKX2* linija kičice primećeno je smanjenje količina endogene IAA, bez obzira na povećanje ili smanjenje nivoa ukupnih endogenih citokinina (**Grafik 10b**).

5.4. Morfološka karakterizacija kontrolnih i transgenih linija kičice *in vitro*

Efekat citokinina na brojne fiziološke procese, ranijih godina je prevashodno određivan egzogenom primenom samih citokinina. Povećanje nivoa pojedinih endogenih biljnog hormona, uključujući i citokinine, ubacivanjem stranog gena od interesa, može da uzrokuje nefiziološke efekte. Zbog napomenutog razloga dobijanje transgenih biljaka koje

imaju snižen nivo citokinina smatra se veoma važnim u boljem razjašnjavanju fizioloških procesa koje su pod kontrolom pomenutih biljnih hormona (Faure i Howell, 1999).

5.4.1. Regeneracija i umnožavanje kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Promena citokiniske homeostaze izazvana ekspresijom *AtCKX* gena u transgenim biljkama kičice utiče na smanjenje morfogenetskog potencijala kičice *in vitro*. Prosečan broj spontano regenerisanih pupoljaka pojedinih transgenih *AtCKX* linija kičice je i do 13 puta manji od kontrole (**Grafik 11**). Ispitivanje regeneracije izdanaka transgenih biljaka kičice vršeno je primenom kulture korenova koja može da posluži kao dobar model sistem prilikom ispitivanja uticaja brojnih regulatora rastenja na mofrogenetske procese (Bálványos i sar, 2001). Subotić i sar. (2009a) su opisali da primena šest citokinina (KIN, BA, 2iP, CPPU, TDZ, ZEA) različitih koncentracija (0,01-3,0 μM) indukuje razvoj adventivnih pupoljaka kod *hairy roots* i netransformisanih korenova kičice *in vitro* pa se može zapaziti da egzogeno primenjeni citokini stimulišu regeneraciju kičice u kulturi. Dosadašnja istraživanja pokazala su da egzogena primena sintetičkih derivata feniluree (TDZ i CPPU) stimulišu razviće adventivnih pupoljaka više nego adeninski tipovi citokinina (BA i KIN) (Huettaman i Preece, 1993). Imajući u vidu navedeno potpuno je opravdano i razumljivo da se transgene *AtCKX* linije kičice slabije regenerišu, a samim tim i slabije umnožavaju u kulturi korenova. Ovaj rezultat potpuno je u skladu sa regeneracijom izdanaka *DSCKX1* transformanata *A. thaliana* koja je u kulturi korenova značajno smanjena u odnosu na kontrolu (Yang i sar, 2003b).

Zapaža se da su regenerisani *AtCKX* transformanti kičice dosta sitniji od kontrole (**Slika 15**). S obzirom na to da citokinini stimulšu ćelijske deobe, od *AtCKX* transformanata koji imaju snižen nivo endogenih citokinina može se i očekivati da imaju redukovanu površinu lista i da same biljke budu patuljaste (Gan i Amasino, 1995). Kod transgenih biljaka kičice u kulturi *in vitro* potvrđena je veoma važna i pozitivna uloga citokinina tokom procesa morfogeneze.

5.4.2. Prirast mase kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Uzimajuću u obzir da citokinini utiču na morfogenezu *in vitro*, može se pratiti i promena sveže mase biljnog tkiva. Rezultati ove disertacije ukazuju da većina transgenih *AtCKX* linija kičice nije pokazala značajno odstupanje prirasta mase u odnosu na kontrolu (**Grafik 12**). Još je interesantnije napomenuti da je kod dve transgene linije koje inače regenerišu najmanji broj adventivnih pupoljaka (*AtCKX1*-39 i *AtCKX2*-31) zapažen značajan prirast mase izdanaka u poređenju sa kontrolom posle 4 nedelje gajenja u kulturi *in vitro*. Suprotno ovim rezultatima biomasa izdanaka *DSCKX1* transformanata *A. thaliana* posle samo 22 dana od zasejavanja upola je manja u odnosu na netransformisane izdanke (Yang i sar, 2003b). Pokazano je da, u poređenju sa kontrolom, egzogeno primenjeni zeatin smanjuje prirast mase kalusnog tkiva *DSCKX1* transformanata *A. thaliana* (Yang i sar, 2003b). Imajući u vidu da egzogeno primenjeni citokinini utiču na smanjenje prirasta mase od *AtCKX* transformanata bi se teorijski moglo očekivati da imaju značajan prirast mase što u praksi nije pokazano kod transgenih biljaka kičice kao ni kod izdanaka *DSCKX1* transformanata *A. thaliana* (Yang i sar, 2003b)

5.5. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata kontrolnih i odabranih *AtCKX* transgenih linija kičice *in vitro*

Poznato je da senescenciju, između ostalog, regulišu citokinini (Wilhelmová i sar, 2004) i da se opadanje nivoa hlorofila odavno koristi kao jedan od markera senescencije (Jordi i sar, 2000; Stessman i sar, 2002; Jiao i sar, 2003; Weng i sar, 2005).

Porast količina ukupnog hlorofila (hlorofil a + b) kvantifikovan je kod većine transgenih *AtCKX* linija kičice u odnosu na kontrolu (**Grafik 14**). Isti rezultat dobijen je i kod svih analiziranih transgenih *AtCKX2* linija duvana kod kojih su listovi duže ostajali

zeleni za razliku od kontrolnih listovi koji su brže žuteli. Takođe je primećeno da količina ukupnog hlorofila u listovima transgenog duvana opada vremenom (Mýtinová i sar, 2006).

Odnos hlorofila a i b predstavlja važan indikator adaptacije fotosintetičkog aparata biljke na uslove svetlosti (Lichtenhaler i sar, 1981). Uobičajen odnos hlorofila a i b kod dikotiledonih biljaka je 3:1. U slučaju kontrolnih kao i listova transgenih linija kičice *in vitro* zapažen je mnogo manji odnos hlorofila a i b nego što je to uobičajeno. Ovakav rezultat bi se možda mogao objasniti samim uslovima *in vitro* u kojima je svetlosni fluks, iako konstantno kontrolisan, niži nego u prirodi pa biljke moraju da se adaptiraju na uslove svetlosti. Povećanje vrednosti odnosa hlorofila a i b u odnosu na kontrolu nije zapaženo ni kod jednog *AtCKX* klona kičice (**Grafik 13**). Veći odnos hlorofila a i b, zapažen je i u kontrolnim listovima i u listovima *AtCKX2* transgenog duvana (Mýtinová i sar, 2006). Iz navedenog rezultata moglo bi se zaključiti da se tokom senescencije prvenstveno degraduje hlorofil a. Isti rezultat dobijen je analizom hlorofila tokom starenja kotiledona pasulja (Wilhelmová i sar, 1998).

Odnos ukupnih hlorofila i karotenoida predstavlja indikator svetlosti pod kojom biljke rastu i razvijaju se (Lichtenhaler i sar, 1981). Kod biljaka koje rastu u prirodi, za listove koji su izloženi suncu odnos hlorofila i karotenoida obično iznosi 4,2-5,0 odnosno 5,5-7,0 za listove koji su u senci. Niže vrednosti odnosa ukupnih hlorofila i karotenoida su indikator senescencije ili oštećenja fotosintetičkog aparata biljke, što se naročito odražava na brzu degradaciju hlorofila. Listovi čiji odnos hlorofila i karotenoida iznosi 2,5-3,5 obično su žuto zelene boje i proces senescencije je u toku (Lichtenhaler i Buschmann, 2001). Svi *AtCKX* transformanti kičice dobijeni su i gajeni *in vitro*. Odnos ukupnih hlorofila i karotenoida kontrolnih listova kičice *in vitro* iznosi 7,87 ± 0,89, a kod listova *AtCKX* transgenih linija ovaj odnos je još veći kod onih klonova kod kojih je određen povećan nivo ukupnih hlorofila (**Grafik 14**). Na osnovu velike vrednosti odnosa hlorofila i karotenoida, može se samo pretpostaviti da transgene *AtCKX* biljke kičice imaju odloženu senescenciju. Opisani rezultati u skladu su sa ranije opisanim kod transgenih *AtCKX* listova *A. thaliana* i duvana koji su ostajali čak i duže zeleni od listova netransformisanih biljaka i

nisu pokazivali ubrzanu nego, nasuprot očekivanjima, odloženu senescenciju (Werner i sar, 2003b; Mýtinová i sar, 2006).

Iako se zna da citokinini mogu odložiti senescenciju (Gan i Amasino, 1995), saznanje da citokininski *AtCKX* transformanti ne ubrzavaju proces senescencije kao što se očekivalo, bilo je prilično iznenađujuće. Na osnovu svega izloženog može se pretpostaviti da je sniženje citokinina svakako jedan od preduslova, ali ne i sam signal za početak senescencije.

5.6. Sekundarni metaboliti kičice *in vitro*

Do sada nema literaturnih podataka o genetičkoj transformaciiji kičice pomoću *A.tumefaciens*, a samim tim nema ni podataka o sekundarnim metabolitima biljaka kičice koje su na ovaj način genetički transformisane. Upravo zbog toga rezultati ove disertacije pružaju važne i nove informacije o uticaju izmenjenog nivoa endogenih citokinina na proizvodnju sekundarnih metabolita kičice.

Na osnovu spektralnih karakteristika jedinjenja koja su detektovana u metanolnom ekstraktu izdanaka i korenova kičice iz prirode, utvrđeno je prisustvo sekoiridoida, sverciamarina, genciopikrina i sverozida, kao i prisustvo ksantona, eustomina i demetileustomina (**Slike 22** i **23**). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Schimmera i Mauthnera koji su 1996. godine u nadzemnom delu kičice i u korenu detektovali prisustvo istih sekundarnih metabolita.

Ranijim istraživanjima je pokazano da u izdancima i korenovima kičice iz prirode dominira sverciamarin, dok u izdancima i korenovima biljaka gajenih *in vitro* dominira genciopikrin, a sverciamarin je detektovan samo u tragovima (Van der Sluis, 1985a, 1985b; Janković i sar, 1997; Piatczak i sar, 2005). Rezultati ove disertacije samo se delimično slažu sa prethodnim rezultatima, gde je pokazano da je sverciamarin dominantna komponenta samo u kontrolnim izdancima iz prirode i kulture, a takođe i u svim analiziranim *AtCKX* izdancima *in vitro*. Međutim, sverciamarin u korenovima svih

kontrolnih i transformisanih biljaka kičice nije dominantan sekoiridoid kao što je to slučaj u izdancima.

Međutim, iako su u izdancima i korenovima kičice detektovani isti sekoiridoidi, zapažena je promena njihovog sadržaja. Između izdanaka kičice iz prirode i kulture nema statistički značajne razlike u količini produkovanog sverciamarina. Skoro sve analizirane transgene *AtCKX* linije, imaju sniženu produkciju sverciamarina u poređenju sa kontrolnim izdancima iz kulture i prirode (**Grafik 15**). Sadržaj detektovanog sverciamarina i genciopikrina u kontrolnim korenovima iz kulture i prirode približno je ista, dok je u kontrolnim korenovima iz kulture sadržaj genciopikrina duplo veći u poređenju sa sadržajem sverciamarina (**Grafik 16**). Takođe ja zapaženo da se sve analizirane transgene *AtCKX* linije odlikuju smanjenjem sadržaja sverciamarina u odnosu na kontrolne korenove iz prirode i korenove gajene *in vitro*. U pojedinim linijama sverciamarin se detektuje samo u tragovima. Isti odnos sadržaja dobijen je i za genciopikrin. Sve analizirane transgene *AtCKX* linije produkuju manji sadržaj genciopikrina u odnosu na korenove gajene *in vitro* i korenove iz prirode. U pojedinim linijama genciopikrin se takođe detektuje samo u tragovima (**Grafik 16**).

Janković i sar. (1997) i Piatczak i sar. (2005) su na osnovu sadržaja sverciamarina koji je veći od genciopikrina kako u izdancima tako i korenovima kičice zaključili da uslovi *in vitro* utiču na smanjenje produkcije ovog gorkog jedinjenja. Međutim, rezultati ove disertacije ukazuju na to da uslovi *in vitro* samo u korenu kičice stimulišu povećanu akumulaciju genciopikrina. Rezultate potpuno suprotne ovima dobili su Janković i sar. (1997) koji su pokazali da se genciopikrin u većem sadržaju sintetiše samo u izdancima kičice *in vitro* u odnosu na izdanke iz prirode.

Genetičke transformacije mogu da utiču na produkciju sekundarnih metabolita kičice. Pokazano je da transformisani korenovi kičice, koji su dobijeni inokulacijom pomoću *A. rhizogenes* (soj A4M70GUS), produkuju samo ksantone odnosno ne produkuju nijedan sekoiridoid (Janković i sar, 2002). Takođe postoji literaturni podatak koji govori o tome da transformisani izdanci kičice inokulisani pomoću *A. rhizogenes* (soj LBA9402)

sintetišu dva puta veću količinu ukupnih sekoiridoida u odnosu na netransformisane izdanke (Piatczak i sar, 2006).

Iz svih navedinih rezultata koji su prikazani teško je doneti samo jedan sveobuhvatan zaključak o sadržaju sintetisanih sekundarnih metabolita u *AtCKX* transgenim biljkama kičice *in vitro*. U svakom slučaju, može se reći da genetička transformacija kičice *AtCKX* genima bez sumnje utiče na sekundarni metabolizam ove biljne vrste s obzirom na to da je količina produkovanog sverciamarina u izdancima svih transgenih linija manja u poređenju sa izdancima gajenim *in vitro* koji imaju približno isti sadržaj sverciamarina u poređenju sa izdancima iz prirode (**Tabela 22.**). Sa druge strane, veoma je zanimljivo primetiti da je kod izdanaka, ali ne i korenova, većine transgenih *AtCKX* linija stimulisana produkcija genciopikrina. Sve transgene i kontrolne biljke *in vitro* gajene su pod istim uslovima temperature i svetlosti i zbog toga se može pretpostaviti da ova promena u sadržaju sekundarnih metabolita može biti posledica same genetičke transformacije koja predstavlja neku vrstu stresa za biljku. Može se pretpostaviti da stres izazvan genetičkom transformacijom utiče na promenu metabolizma koji ide u pravcu povećane produkcije genciopikrina. U metaboličkom putu iridoida, genciopikrin nastaje od sverciamarina tako da je povećana akumulacija genciopikrina u *AtCKX* izdancima transformanata kičice u skladu sa sniženim sadržajem sverciamarina. Najverovatnije, povećana aktivnost enzima koji prevodi sverciamarin u genciopikrin utiče na povišen sadržaj genciopikrina.

Eustomin se u kontrolnim izdancima kičice *in vitro* sintetiše u duplo većoj količini u odnosu na izdanke iz prirode. Primećuje se da izdanci većine analiziranih transgenih *AtCKX* linija kičice proizvode više eustomina u odnosu na izdanke iz prirode, ali manje u odnosu na kontrolne izdanke *in vitro*. Porast sadržaja eustomina u odnosu na izdanke iz kulture, uočen je samo kod linije *AtCKX1*-29 dok je odsustvo detekcije eustomina u izdancima zapaženo samo kod *AtCKX1*-39 (**Grafik 16**). U kontrolnim izdancima *in vitro* zapažen je pet puta veći sadržaj demetileustomina u odnosu na kontrolne izdanke iz prirode. Kao i u slučaju eustomina, izdanci svih analiziranih transgenih *AtCKX* linija kičice imaju veći sadržaj demetileustomina u poređenju sa kontrolnim izdancima iz prirode, ali

manje u poređenju sa kontrolnim izdancima *in vitro*. Samo izdanci linije *AtCKX2*-31 imaju značajno povećan sadržaj demetileustomina u poređenju sa izdancima gajenim *in vitro* (**Grafik 17**).

Utvrđeno je da se približno jednak sadržaj eustomina i demetileustomina sintetiše u korenovima iz prirode. Uslovi *in vitro* stimulišu proizvodnju ksantona u korenovima, tako da se sadržaj eustomina povećava deset, a demetileustomina tri puta u odnosu na korenove iz prirode. Sadržaj eustomina i demetileustomina u korenovima odgovara sadržaju pomenutih ksantona u izdancima tj. veći je u skoro svim transgenim *AtCKX* linijama kičice u poređenju sa kontrolom iz prirode, ali je manji u odnosu na kontrolu iz kulture.

Veći sadržaj demetileustomina u odnosu na kontrolne izdanke iz prirode, ali manji u odnosu na kulturu *in vitro* detektovan je kod korenova linije *AtCKX2*-31. U izdancima iste linije takođe je uočeno značajno povećanje sadržaja demetileustomina. Ranije je pokazano da ova transgena linija ima povećanu CKX aktivnost, a takođe i sniženu količinu bioaktivnih formi citokinina kako u izdanku tako i u korenu. Količina oba ksantona, veća čak i od vrednosti dobijenih kod kontrolnih korenova u kulturi, potvrđena je kod linije koja već ima povećan sadržaj eustomina u odnosu na izdanke iz prirode, a to je linija *AtCKX1*-29 (**Grafik 18**). Veoma je interesantno napomenuti da baš ova transgena linija u korenovima ima povećanu CKX aktivnost, a takođe i snižen nivo bioaktivnih formi citokinina i u izdanku i korenu.

Svi navedeni rezultati ukazuju da je produkcija ksantona u uslovima *in vitro* stimulisana kako u izdancima tako i u korenovima kičice. Dobijeni rezultati u potpunosti se slažu sa podacima koje su dobili Janković i sar. (2000). Oni su pokazali da izdanci i korenovi kičice *in vitro* imaju povećanu produkciju ksantona u odnosu na biljke iz prirode.

Uzimajući u obzir da je kičica na mnogim staništima proređena pa čak i iskorenjena, smatra se ugroženom biljnom vrstom. Pojedine transgene *AtCKX* linije kičice koje imaju povećanu količinu eustomina i/ili demetileustomina predstavljaju vrlo pogodnu alternativu za izolaciju ovih sekundarnih metabolita i dalje ispitivanje njihovih različitih farmakoloških dejstava, i to bez ugrožavanja zastupljenosti ove biljne vrste sa njenih prirodnih staništa.

6. Z A K LJ U Č C I

1. Kultura netransformisanih korenova *Centaurium erythraea* Rafn. uspešno je uspostavljena MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja *in vitro*. U kulturi korenova kičice izdanci se spontano regenerišu.

2. Unošenje *AtCKX1* i *AtCKX2* gena, radi dobijanja biljaka sa sniženim nivoom endogenih biljnih hormona citokinina, uspešno je izvršeno pomoću dva bakterijska soja *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 koji nose pBinTX plazmid sa jednim od dva pomenuta gena. Odsečci korenova predstavljaju pogodne eksplantate za transformaciju, jer u kulturama inokulisanih korenova dolazi do spontane regeneracije transgenih biljaka. Transformacija biljnog materijala potvrđena je genomskom PCR i qRT-PCR analizom. Genetičkom transformacijom kičice pomoću *A. tumefaciens* GV3101 po prvi put je potvrđena osetljivost ove biljne vrste na infekciju ovom bakterijom, što svakako otvara široke mogućnosti za dalje genetičke modifikacije ovom lekovitom biljnom vrstom.

3. Povećana CKX aktivnost u izdancima, u odnosu na kontrolu, uspešno je potvrđena kod jedne *AtCKX1* i četiri *AtCKX2* transgene linije. Za razliku od izdanaka, kod korenova većine analiziranih transgenih *AtCKX* linija kičice uočena je povećana CKX aktivnost koja se, u odnosu na kontrolu, kod biljaka kod kojih je ugrađen *AtCKX1* gen povećava i do 5,74 odnosno do 7,89 puta kod biljaka kod kojih je ugrađen *AtCKX2* gen.

4. Analizirana je količina i sadržaj ukupnih kao i pojedinačnih grupa endogenih citokinina netransfromisanih biljaka kičice čime je, po prvi put, određen citokiniski profil kičice *in vitro*.

5. Pokazano je da ekspresija *AtCKX* gena kod transgenih biljaka kičice menja metabolizam citokinina. CKX aktivnost varira u transgenim *AtCKX* linijama kičice, a samim tim varira i količina ispitivanih endogenih citokinina. Ipak, moguće je zaključiti da je dobijena jedna linija *AtCKX1*-29 i tri linije *AtCKX2*-17, -26, -31 kod kojih je, kako u izdanku tako i u korenu, određeno značajno smanjenje najznačajnijih, bioaktivnih, formi citokinina od kojih zavise brojne fiziološke funkcije.

6. Potvrđeno je da se promene u metabolizmu citokinina, izazvane ekspresijom *AtCKX* gena kod transgenih biljaka kičice, bez sumnje odražavaju i na endogeni nivo auksina tj. količinu endogene IAA kako u izdancima tako i korenovima. Međutim, iako promenjena citokininska homeostaza nema jednoznačan efekat na promenu endogenog nivoa IAA, ipak se može reći da je odnos endogenih citokinina i auksina prilično međusobno zavisan kod transgenih biljaka kičice. Analiza transgenih *AtCKX1* linija kičice je pokazala da povećana količina endogenih citokina rezultuje smanjenom količinom endogene IAA. Sa druge strane, odnos količine ukupnih endogenih citokinina i IAA pokazuje značajno variranje u izdancima i korenova svih analiziranih *AtCKX2* transformanata.

7. Pokazano je da ekpresija *AtCKX* gena utiče i na neke morfološke parametre transformisanih biljaka kičice. Pored toga što su transformanti sitniji od kontrolnih biljaka, primećeno je i da promenjena citokininska homeostaza utiče na smanjenje morfogenetskog potencijala kičice. Takođe je pokazano da količina endogenih citokinina kod većine transgenih *AtCKX* biljaka kičice ne utiče na značajno odstupanje prirasta mase u odnosu na kontrolu.

8. Kod većine transgenih *AtCKX* linija kičice kvantifikovan je porast količina ukupnog hlorofila (hlorofil a + b) u odnosu na kontrolu. U slučaju kontrolnih kao i listova transgenih linija kičice *in vitro* zapažen je mnogo manji odnos hlorofila a i b nego

što je to uobičajeno. Kod listova svih analiziranih *AtCKX* transgenih linija kičice takođe je zapažena velika vrednost odnosa hlorofila i karotenoida. Na osnovu svega izloženog može se samo pretpostaviti da transgene *AtCKX* biljke kičice imaju odloženu senescenciju.

9. Kičica u kulturi *in vitro* produkuje sekundarne metabolite koji su karakteristični za ovu biljnu vrstu u prirodi. Sadržaj sekoiridoidnih komponenti biljaka gajenih *in vitro* ne razlikuje se mnogo u odnosu na biljke iz prirode dok se sadržaj ksantonskih jedinjenja značajno povećava kod biljaka gajenih u uslovima *in vitro*.

10. Transgene *AtCKX* biljke kičice takođe sintetišu sekoiridoide i ksantone s tim da većina transgenih linija produkuje manji sadržaj sekoiridoida u odnosu na biljke gajene *in vitro* i biljke iz prirode. Povećan sadržaj ksantona detektovan je u izdancima i korenovima skoro svih analiziranih transgenih *AtCKX* linija kičice u poređenju sa kontrolnim uzorkom iz prirode, ali je manji u odnosu na kontrolni uzorak iz kulture. Od svih dobijenih transgenih biljaka kičice može se izdvojiti linija *AtCKX1*-29 koji ima veći sadržaj ksantona u odnosu na kontrolne korenove i iz prirode i kulture *in vitro*.

11. Ksantoni, koji pored sekoiridoida spadaju u glavne sekundarne metabolite kičice, danas predstavljaju značajan izvor za proizvodnju mnogih novih lekova. Upravo zbog toga *AtCKX* transgene biljke kičice mogle bi biti dobar izvor biljnog materijala za izolaciju ksantona i njihovu primenu u ispitivanju antimikrobne aktivnosti kao i u proizvodnji farmakološki aktivnih supstanci.

7. L I T E R A T U R A

- Abd el Mawla A. M. A., Schmidt W., Beerhues L. (2001): Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythraea* Rafn. Planta 212(2): 288-293.
- Abe H., Uchiyama M., Tanaka Y., Saito H (1976): Structure of discadine, a spore germination inhibitor from cellular slime-mold, *Dictyostelium discoideum*. Tetrahedron Letters 17(42): 3807-3810.
- Akin-Idowu P.E., Ibitoye D.O., Ademoyegun O.T. (2009): Tissue culture as a plant production technique for horticulrure crops. African Journal of Biotechnology 8(16): 3782–3788.
- Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984): T-DNA of Agrobacterium tumefaciens encoded an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(19): 5994-5998.
- Aloni R (1995): The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Davies P.J. (ed.) Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 531-546.
- An G. (1995): Binary Ti plasmid vectors. In: Methods in molecular biology. *Agrobacterium* protocols. Gortland K.M.A., Davey M.R. (eds.), Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 44: 47–58.
- Anderson A., Moore L. (1979): Host specificity in the genus *Agrobacterium*. Phytopathology 69: 320-323.
- Angenon G., Dillen W., Montagu M. V. (1994): Antibiotic resistance markers for plant transformation. In: Plant molecular biology manual. Second edition. Gelvin S.B., Schilperoort R.A. (eds.), Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, pp. C1: 1–13.

- Armstrong D.J. (1994): Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. Mok D.W.S., Mok, M.C. (eds.), Boca Raton: CRC Press, pp. 139-154.
- Assad F.F., Tucker K.L., Singer E.R. (1993): Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology 22(6): 1067-1085.
- Astot C., Dolezal K., Nordström A., Wang Q., Kumkel T., Moritz T., Chua N.H., Sandberg G. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(26): 14778-14783.
- Atkinson J.E., Gupta P., Lewis J.R. (1968): Benzophenone participation in xanthone biosynthesis (*Gentianaceae*). Chemical Communication (London), 22: 1386-1387.
- Bae T.W., Park H.R., Kwak Y.S., Lee H.Y., Ruy S.B. (2005): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80(1): 51-57.
- Bálványos I., Kursinszki L., Szõke E. (2001): The effect of plant growth regulators on biomass formation and lobeline production of *Lobellia inflata* L. hairy root culture. Plant Growth Regulators 34(3): 339-345.
- Barešová H., Herben T. (1985): Chenges in sensitivity of the leaf segments of *Centaurium erythraea* during their regeneration. Abstract of the Intenational Symposium of Regulation of Plant Integrity. ČSSR, p. 35.
- Barešová H., Herben T., Kaminek M., Krekule J. (1985): Hormonal control of morphogenesis in leaf segments of *Centaurium erythraea*. Biologia Plantarum 27: 286-291.
- Barešová H., Kaminek M. (1984): Light induce embryogenesisd in suspension culture of *Centaurium erythraea* Rafn. In: Plant tissue and cell culture propagation to crop improvement. Novák F. J., Havel L. and Doležel J. (eds.) Czech Academy of Sciences, Prague, pp. 163-164.

- Barik D.P., Mohapatra U., Chand P.K. (2005): Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. Plant Cell Reports 24(9): 523-531.
- Barna K.S., Mehta S.L. (1995): Genetic –transformation and somatic embryogenesis in *Lathyrus sativus*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 4(2): 67-71.
- Baron C., Zambryski P.C. (1995): Notes from the undergraund: highlights from plant-microbe interactions. Biotechnology. Elsevier Sciences Ltd. 13: 356–362.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984): Identification of cloned cytokinin biosynthesis gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(15): 4776-4780.
- Barz W., Ellis B. (1981): Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production. In: Natural Products as Medicinal Agents. Beal J.L., reinhard E. (eds.), Stuttgart, Hippokrates, pp. 471-507.
- Beemster G.T.S., Baskin T.I. (2000): STUNTED PLANT 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. Plant Physiology 124(4): 1718-1727.
- Beerhues L.and Berger U. (1994): Xanthones in cell suspension cultures of two *Centaurium* species. Phytochemistry 35(5): 1227.1231.
- Bertani G. (1951): Studies of lysogenesis I: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 62: 293-300.
- Bertell G., Eliasson L. (1992): Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. Physiologia Plantarum 84(2): 255-261.
- Bhattacharya S.K., Reddy P.K.S.P., Ghosal S., Singh A.K., Sharma P. (1976): Chemical constituents of *Gentianaceae*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 65: 1547-1549.

- Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J. (2001): Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. Plant Physiology 125(1): 378-386.
- Binns A.N., Labriola J., Black R.C. (1987): Initiation of auxin autonomy in *Nicotiana glutinosa* cells by the cytokini-biosynthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens*. Planta 171(4): 539-548.
- Bookstein R., Lai C.C., To H., Lee W.H. (1990): PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. Nucleic Acids Research 18(6): 1666.
- Bourquin M., Pilet P.E. (1990): Effect of zeatin on the growth and indolyl-3-acetic acid and abscisiclevels in maize roots. Physiologia Plantarum 80(3): 342-349.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brzobohaty L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S. (2003): Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes and pollen of *Arabidopsis*. The Plant Journal 34(1): 13-26.
- Buchman I., Marner F.J., Schröder P., Waffenscmidt S., Schröder J. (1985): Tumour genes in plants: T-DNA encoded cytokinin biosynthesis. The EMBO J 4: 853-859.
- Bundock P., Hooykaas P. (1998): Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and plant cells. In: Phytochemical Signals and Plant-Microbe Interactions. Romeo J.T., Downum K.R., Verpoorte R. (eds.), Plenum New York, pp. 207-229.
- Carpenter L., Locksley H.D., Scheinmann F. (1969): Xanthones in higher plants: Biogenetic proposals and chemotaxonomic survey. Phytochemistry 8(10): 2013-2025.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M.J. (2001): Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. The Plant Cell 13(4): 843-852.

- Cavill G.W.K., Ford D.L. (1960): The chemistry of ants-III. Structure and reactions of iridodial. Australian Journal of Chemistry 13: 296-310.
- Cavill G.W.K., Ford D.L., Locksley H.D. (1956): The chemistry of ants I. Terpenoid constituent of some australian *Iridomyrmex* species. Australian Journal of Chemistry 9(2): 288-293.
- Chandler S., Lu C-Y. (2005): Biotechnology in ornamental horticulture. In *Vitro* Cellular & Developmental Biology; ProQuest Agriculture Journals 41(5): 591–601.
- Chatfield J.M., Armstrong D.J. (1987): Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus tissues: enhanced *in vitro* activity of the enzyme in the presence of copper-imidazole complexes. Plant Physiology 84(3): 726-731.
- Chatfield J.M., Armstrong D.J. (1988): Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus cultures: affinity for concanavalin A. Plant Physiology 88(2): 245-247.
- Chatuverdi H.C., Sharma M. (1987): Excited root culture: A novel method for germplast conservation. In: Plant cell and tissue culture of economically important plants. Reedy G.M. (ed.), Osmania University, Hyderabad, India, pp. 175-179.
- Chaves das Neves H.J., Pais M.S.S. (1980): A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. Tetrahedron Letters 21(45): 4387-4390.
- Chen C.M. (1997): Cytokinin biosynthesis and interconversions. Physiologia Plantarum 101(4): 665-673.
- Chen W.P., Punja Z.K. (2002): *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene. Plant Cell Reports 20(11): 1039-1045.
- Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T., Wan Y. (1997): Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology 115: 971-980.
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer M., Ye X., Armstrong C.L. (2004): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant 40: 31-45.
- Chevallier A (2000): Encyclopedia of Herbal Medicine, Dorling Kindersley, London.

- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorogenesis. Cell 11: 263–271.
- Chiu W.L., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. (1996): Engineered GFP as a vital reporter in plants. Current Biology 6(3): 325–330.
- Coenen C., Lomax T.L. (1997): Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends in Plant Science 2(9): 351-356.
- Conn E. (1991): The metabolism of a natural product: lessons learned from cyanogenic glycosides. Planta medica 57: S1-S9.
- Coscia C.J., Guarnaccia R. (1968): Natural occurence and biosynthesis of a cyclopentanoid monoterpene carboxylic acid. Chemical Communications (London) 3: 138-140.
- Custers J.B.M., Snepvangers S.C.H.J., Jansen H.J., Zhang L., Van Lookeren Campagne M.M. (1999): The 35S-CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sporophytic development in microspore culture. Protoplasma 208(1-4): 257-264.
- Cucu N., Gabriela N., Gavrila L. (2002): Genetically modified medicinal plants. II Transfer and expression of a marker kanamycine resistance gene in *Atropa belladonna* plants. Romanian Biotechnological Letters 7: 869-874.
- Čellárová E., Repčáková K., Repčák M., Hončariv R. (1983): Morphogenesis in tissue cultures of some medicinal plants. Acta Horticulturae (ISHS) 132: 249-256.
- Čellárová E., Repčáková K., Hončariv R. (1984): Vegetative propagation of some medicinal plants through tissue cultures. In: Plant tissue and cell culture propagation to crop improvement. Novák F. J., Havel L. and Doležel J. (eds.), Czech Academy of Sciences, Prague, pp. 515-516.
- Dale J.W., von Schantz M. (2002): From genes to genomes concepts and applications of DNA technology. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.
- Davies P.J. (1995): Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

- Dean C., Jones J., Favreau M., Dunsmuir P., Bedbrook J. (1988): Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. Nucleic Acids Research 16(19): 9267-9283.
- De Cleene M., De Ley J. (1976): The host range of crown gall. Botanical Review 42: 389-466.
- Depicker A., Van Montagu M. (1997): Post-transcriptional gene silencing in plants. Current Opinion in Cell Biology 9(3): 373-382.
- Deroles S.C., Ledger S.E., Miller R.M., Davies K.M., Given N.K. (1993): Tranformation of *Eustoma grandiflorum* (Lisianthus). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y.P.S. Bajaj (ed.), Series: Plant Protoplasts and Genetic Engineering III, Springer Vol. 22, pp. 202-212.
- Deus B., Zenk M.H. (1982): Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. Biotechnology and Bioengineering 24: 1965-1974.
- Dewitte W., Scofield S., Alacasabas A.A., Maughan S.C., Menges M., Braun N., Collins C., Nieuwland J., Prinsen E., Sundaresan V., (2007): Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(36): 14537-14542.
- Do T., Popov S., Marekov N., Trifonov A. (1987): Iridoids from *Gentianaceae* plants growing in Bulgaria. Planta Medica 53: 580.
- Dobrev P.I., Havlíček L., Vágner M., Malbeck J., Kamínek M. (2005): Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 1075: 159-166.
- Dobrev P.I., Kamínek M. (2002): Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid phase extraction. Journal of Chromatography A 950: 21-29.

- Dronne S., Moja S., Jullien F., Berger F., Caissard J.C. (1999): *Agrobacterium*-mediated transformation of lavandin (*Lavandula intermedia* Emeric ex Loiseleur). Transgenic Research 8(5): 335-347.
- Dwivedi S., Vanková R., Motyka V., Herrera C., Zizkova E., Auer C. (2010): Characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant *ror-1* (*roscovitine-resistant*) and its utilization in understanding of the role of cytokinin *N*-glucosylation pathway in plants. Plant Growth Regulation 61(3): 231-242.
- Eklöff S., Astot C., Blackwell J., Mortiz T., Olsson O., Sandberg G. (1997): Auxin-cytokinin interctions in wild-type and transgenic tobacco. Plant Cell Physiology 38(3): 225-235.
- Emery R.J.N., Leport L., Barton J.E., Turner N.C., Atkins A. (1998): *cis*-Isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. Plant Physiology 117(4): 1515-1523.
- Ernst D., Schäfer W., Oesterhelt D. (1983): Isolation and identification of a new, naturally occurring cytokinin (6-benzylaminopurine riboside) from an old anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). Planta 159(3): 222-225.
- Faure J.-D., Howell S.H. (1999): Cytokinin perception and signal transduction. In: Biochemistry and molecular biology of plant hormones. Hookaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam, pp. 461-474.
- Feng D.S., Wang H.G., Zhang X.S., Kong L.R., Tian J.C., Li X.F. (2008): Using an inverse PCR method to clone the wheat cytokinin oxidase/dehydrogenase gene *TaCKX1*. Plant Molecular Biology Reporter 26(3): 143-155.
- Flavell R.B. (1994): Inactivation of geneexpression in plants as a consequence of specific gene duplication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(9): 3490-3496.
- Frackman S., Kobs G., Simpson D., Storts D. (1998): Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. Promega Notes 65: 27-30.

- Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T., Schmülling T., Pec P. (2002): Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedures and applications. Analytical Biochemistry 306(1): 1-7.
- Galuczka P., Frébortvá J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmülling T., Frébort I. (2004): Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat Cloning and heterologous expression. European Journal of Biochemistry 271(20): 3990-4002.
- Galuczka P., Popelková H., Werner T., Frébortvá J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. Journal of Plant Growth Regulation 26(3): 255-267.
- Gan S., Amasino R.M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinins. Science 270(5244): 1986-1988.
- Gašić K., Hernandez A., Korban S.S. (2004): RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. Plant Molecular Biology Reporter, 22: 437a–437g.
- Gatz C., Frohberg C., Wendenburg R. (1992): Stringent repression and homogenous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter n intact transgenic tobacco plants. Plant Journal 2(3): 397-404.
- Gaudinová A., Dobrev P.I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Friedecký D., Motyka V. (2005): The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. Journal of Plant Growth Regulation 24: 188-200.
- Gelvin S. B. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 223–256.
- Gelvin S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(1): 16–37.

- George E.F., Sherrington P.D. (1984): Micropropagation: uses and methods. In: Plant Propagation by Tissue Culture. George E.F. (ed.), Exegetics Ltd., Eversley, England, pp. 39-71.
- Giri A., Narasu L.M. (2000): Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology advances 18: 1-22.
- Goff S.A., Klein T.M., Roth B.A., Fromm M.E., Cone K.C., Radicalle J.P., Chandler V.L. (1990): Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues. The EMBO Journal 9(8): 2517–2522.
- Gómez-Galera S., Pelacho A.M., Gené A., Capell T., Christou P. (2007): The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. Plant Cell Report 26: 1689-1715.
- Govannini A., Pecchioni N., Allavena A. (1996): Genetic transformation of lisanthus (*Eustoma grandiflorum* Griseb) by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Genetics and Breeding 50(1): 35-39.
- Groweiss A., Cardellina J.H., Boyd M. R. (2000): HIV-Inhibitory Prenylated Xanthones and Flavones from *Maclura tinctoria*. Journal of Natural Products 63(11): 1537-1539.
- Grujić-Injac B., Lajšić S. (1983): Hemija prirodnih proizvoda, Univerzitet u Nišu, Niš, str. 328.
- Hadacek F. (2002): Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences 21(4): 273-322.
- Haloui M., Louedec L., Michel J.B., Lyoussi B. (2000): Experimental diuretic effect of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. Journal of Ethnopharmacology 71(3): 465-472.
- Han K.H., Fleming P., Walker K., Loper M., Chilton W.S., Mocek U., Gordon M.P., Floss H.G. (1994): Genetic transformation of mature taxus-an approach to genetically control-the *in vitro* production of the anticancer drug, taxol. Plant Science 95(2): 187-196.

- Handa T. (1992): Regeneration and characterization of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum*) plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Tissue Culture Letters 9(1): 10-14.
- Handa T., Sujimura T., Kato E., Kamada H., Takayanagi K. (1995): Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* with *rol* genes. Acta Horticulturae (ISHS) 392: 209-218.
- Hansen G., Wright M.S. (1999): Recent advances in transformation of plants. Trends in Plant Science, Elsevier Trands Journals 4: 226-231.
- Hartmann A., Senning M., Hedden P., Sonnewald U., Sonnewald S. (2011): Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tuber require both cytokinin and gibberellin. Plant Physiology 155(2): 776-796.
- Hartmann T. (1996): Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. Entomologia Experimentalis et Applicata 80: 177-188.
- Hayta S., Gurel A., Akgun I.H., Altan F., Ganzera M., Tanyolac B., Bedir E. (2011): Induction of *Gentiana cruciata* hairy roots and their secondary metabolites. Biologia 66(4): 618-625.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the tDNA. Plant Journal 6(2): 271-282.
- Hirgikopi M., Kamarainen T., Teeri T., Hohtola A. (2002): *Agrobacterium*-mediated transformation of round leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.). Plant Science 162(4): 537-542.
- Horgan R., Hewett E.W., Horgan J.M., Purse J.G., Wareing P.F. (1975): A new cytokinin from *Populus x robusta*. Phytochemistry 14(4): 1005-1008.
- Horgan R., Hewett E.W., Purse J.G., Wareing P.F. (1973): A new cytokinin from *Populus robusta*. Tetrahedron Letters 14(30): 2827-2828.
- Hosokawa K., Matsuki R., Oikawa Y., Yamamura S. (1997): Genetic transformation of gentian wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51(2): 137-140.

- Hosokawa K., Matsuki R., Oikawa Y., Yamamura S. (2000): Production of transgenic gentian plants by particle bombardment of suspension-culture cells. Plant Cell Reports 19(5): 454-458.
- Hostettmann K., Hostettmann M. (1989): Xanthones. In: Methods in Plant Biochemistry Vol. 1 – Plant Phenolics. Dey P.M., Harbone J.B. (eds.), Academic Press Ltd., p. 493.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): *N*-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 279(46): 47822-47832.
- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999): Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purufication, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. The Plant Journal 17(6): 615-626.
- Howard E.A., Zupan J., Citovsky V., Zambryski P. (1992): The *VirD2* protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implication for nuclear uptake of DNA in plant cells. Cell 68: 109-118.
- Huettaman C.A., Preece J.E. (1993): Thidiayuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33(2): 105-119.
- Innis M.A., Gelfand D.H. (1990): PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 3-12.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. Nature 409(6823): 1060-1063.
- Inouye H., Uesato S. (1986): Biosynthesis of iridoids and secoirisoids. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 50: 169-236.
- Iriondo J.M.and Perez C. (1996): Micropropagation and *in vitro* storage of *Centaurium riguali* Esteve (*Gentianaceae*). Israel Journal of Plant Sciences 44: 115-123.

- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. (1996): High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology 14: 745-750.
- Ishimura K., Sudo H., Satake M., Matsunaga Y., Takemoto S., Shimomura K. (1990): Amarogentin, amaroswerin and four xanthones from root culture of *Swertia japonica*. Phytochemistry 29(5): 1563-1565.
- Izumi K., Nakagawa S., Kobayashi M., Oshio H., Sakurai A., Takashi N. (1988): Levels of IAA, cytokinins, ABA and ethylene in rice plants as affected by a gibberellin biosynthesis inhibitor, uniconazole-P. Plant Cell Physiology 29(1): 97-104.
- Izumi Y., Kono Y., Aoshima T., Yamauchi A., Iijama M. (1995): Effect of physiological and morphological characteristcs of root tips excised from rice seminal roots on subsequent growth *in vitro*. Japanase Journal of Crop Sciences 64(3): 622-628.
- Jägger E (1978): Centaurium Hill. In: Vergleichende Chrologie der Zentraleuropäischen. Meusel H. (ed.), Flora 2, Gustav Ficher, Jena, pp: 352-353.
- Janković T., Krstić D., Šavikin-Fodulović K., Menković N., Grubišić D. (1997): Comparative investigation of secoiridoid compounds of *Centaurium erythraea* grown in nature and cultured *in vitro*. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 7(4): 30-32.
- Janković T., Krstić D., Šavikin-Fodulović K., Menković N., Grubišić D. (2000): Xanthone compounds of *Centaurium erythraea* grown in nature and cultured *in vitro*. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 10(1): 23-25.
- Janković T., Krstić D., Šavikin-Fodulović K., Menković N., Grubišić D. (2002): Xanthones and secoiridoids from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* and *C. pulchellum*. Planta Medica 68(10): 944-946.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987): GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6(13): 3901–3907.

- Jensen S.R. (1991): Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. In: Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Harborne J.B., Tomas-Barbaran F.A. (eds.), Clarendon Press, Oxford, UK, pp. 133-158.
- Jensen S.R., Schripsema J. (2002): Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae*. In: *Gentianaceae* - Systematics and Natural History. Struve L., Albert V. (eds.), Cambridge University Press, pp. 573-631.
- Jiao D., Ji B., Li X. (2003): Characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane-lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice. Photosynthetica 41(1): 33-41.
- Jin S., Roitsch T., Ankenbauer R.G., Gordon M.P., Nester E.W. (1990): The *VirA* protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphoryllated and is essential for *vir* gene regulation. Journal of Bacteriology 172: 525-530.
- John M.C., Amasino R.M. (1988): Expression of an *Agrobacterium* Ti plasmid gene involved in cytokinin biosynthesis is regulated by virulence loci and induced by plant phenolic compounds. Journal of Bacteriology 170(2): 790-795.
- Jones B., Andersson Gunnears S., Petrsson S.V., Tarkowski P., Graham N., May S., Dolezal K., Sandberg G., Ljung K. (2010): Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. The Plant Cell 22(9): 2956-2969.
- Jones R.J., Schreiber B.M.N. (1997): Role and function of cytokinin oxidase in plants. Plant Growth Regulation 23(1-2): 123-134.
- Jorgensen R.A., Cluster P.D., English J., Que Q., Napoli C.A. (1996): Chalcone synthase co-suppression in *Petunia* flowers: comparison of sense versus antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. Plant Molecular Biology 31(5): 957-973.
- Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G.M., Pot C.S., De Visser R., Van Rhijn J.A., Gan S., Amasino R.M. (2000): Increased cytokinin levels in transgenic

P_{SAG12}-*IPT* tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. Plant Cell Environment 23(3): 279-289.

- Jovanović-Dunjić R. (1977): U: Flora SR Srbije, Josifović M. SANU, Beograd, Tom V: 408.
- Jung M., Muche J.M., Lukowsky A., Jung K., Loening S.A. (2001): Dimethyl sulfoxide as additive in ready-to-use reaction mixtures for real-time polymerase chain reaction analysis with SYBR Green I dye. Analytical Biochemistry 289(2): 292-295.
- Junior P. (1990): Recent developments in the isolation and structure elucidation of naturally occuring iridoid compounds. Planta Medica 56(1): 1-13.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopenthyltransferases. Plant & Cell Physiology 42(7): 677-685.
- Kaminek M., Motyka V., Vaňková R. (1997): Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiologia Plantarum 101(4): 689-700.
- Kant P., Kant S., Jain R.K., Chaudhury V.K. (2007): *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation in dwarf recalcitrant rice cultivars. Biologia Plantarum 51: 61-68.
- Kaouadji M., Vaillant I., Mariotte A.M. (1986): Polyoxygenated xanthones from *Centaurium erythraea* roots. Journal of Natural Products 49(2): 359.
- Karami O., Esna-Ashari M., karimi Kurdistani G., aghavaisi N (2009): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. Biologia Plantarum 53(2): 201-212.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiva Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntesis of *trans*-zeatin. The Journal of Biological Chemistry 279(14): 14049-14054.

- Kim C.H., Kim K.I., Chung I.S. (2000): Expression of modified green fluorescent protein in suspension culture of *Taxus cuspidata*. Journal of Microbiology and Biotechnology 10(1): 91-94.
- Kim J.B. (2005): Development of efficient regeneration and transformation systems in *Alstroemeria*. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands, pp. 1-100.
- Kim M.K., Jeon J.H., Fujita M., Davin L.B., Lewis N.G. (2002): The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. Plant Molecular Biology 49(2): 199-214.
- Kitade Y., Ootsuka S., Iitsuka O., Saga N. (2003): Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (*Rhodophyta*) gene. Journal of Applied Phycology 15: 555–557.
- Klee H (1994): Transgenic plants and cytokinin biology. In: Cytokinins-Chemistry, Activity and Function. Mok D.W.S., Mok, M.C. (eds.), Boca Raton: CRC Press, pp. 289-293.
- Klee H., Estelle M. (1991): Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42(): 529-551.
- Komari T., Kubo T. (1999): Methods in genetic transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In: Molecular Improvement of Cereal Crops. Vasil I.K. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-83.
- Kondo Y., Takano F., Hojo H. (1994): Suppresion of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice. Planta Medica 60(5): 414-416.
- Koroch A.R., Kapteyn J., Juliani H.R., Simon J.E. (2002): *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* transformation of *Echinacea purpuria* leaf explants. Trends New Crop News.
- Kovárová M., Dráber P (2000): New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Research 28(13): *e70*, i-iiii.

- Krstić D., Janković T., Šavikin-Fodulović K., Menković N., Grubišić D. (2003): Secoiridoids and xanthones in the shoots and roots of *Centaurium pulchellum* cultured *in vitro*. *In vitro* cellular & developmental biology – plant 39: 203-207.
- Kumarasamy Y., Nahar L., Cox P.J., Jaspars M., Sarker S. D. (2003a): Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. Phytomedicine 10: 344-347.
- Kumarasamy Y., Nahar L., Sarker S. D. (2003b): Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parets of *Centaurium erythraea*. Fitoterapia 74: 151-154.
- Laloue M., Fox J.E. (1989): Cytokinin oxidase from wheat: partial purufication and general properties. Plant Physiology 90(3): 899-906.
- Laureová D., Čellárová E., Honačariv R. (1986): Tollerance of plant tissue of *Centaurium erythraea* to increased concentrations of ions present in soils Eastern Slovakian lowlands. In: Repčák M. (ed.) Dni rastlinnej fyziológie IV. Slovenska botaničká spoločnost pri Sav., pp. 221-222.
- Li J., Krichevsky A., Vaidya M., Tzfira T., Citovsky V. (2005): Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:5733-5738.
- Liang J., Han D., Li H., Yuan X. (1982): Isolation and identification of swertiamarin, the active principle in *Swertia patens* Burk. Yaoxue Tongbao 17: 242-243.
- Liu J., Mehdi S., Topping J., Tarkowski P., Lindsey K. (2010): Modelling and experimental analysis of hormonal crosstalk in *Arabidopsis*. Molecular Systems Biology 6, Article number 373: 1-13.
- Lievre K., Hehn A., Tran T.L.M., Gravot A., Thomasset B., Bourgaud F., Gontier E. (2005): Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. Plant Science 168(4): 883-888.
- Linsmaier E.M. and Skoog F. (1965): Organic growth factor requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151.158.

- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001): Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, pp. F4.3.1.-F4.3.8.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Döll M., Fietz H.-J. Bach T., Kozel U., Meier D., Rahmsdorf U. (1981): Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. Photosynthesis Research 2(2): 115-141.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using relative quantitative PCR and the $^{2\Delta\Delta C1}$ method. Methods 25(4): 402-408.
- Ledger S.E., Deroles S.C., Manson D.G., Bradley J.M., Gicen N.K. (1997): Transformation of lisanthus. Plant Cell Reports 16(12): 853-858.
- Letham D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea Mays*. Life Sciences 2(8): 569-573.
- Letham D.S. (1994): Cytokinins as phytohormones-sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. In: Cytokinins-Chemistry, Activity and Function. Mok D.W.S., Mok, M.C. (eds.), Boca Raton: CRC Press, pp. 57-80.
- Letham D.S., Zhang R. (1989): Cytokinin translocation and metabolism in lupin species II. New nucleotide metabolites of cytokinins. Plant Science 64(2): 161-165.
- Loyter A., Rosenbluh J., Zakai N., Li J., Kozlovsky S.V., Tzfira T., Citovsky V. (2005): The plant *VirE2* interacting protein 1. A molecular link between the *Agrobacterium* T-complex and the host cell chromatin? Plant Physiology 138: 1318-1321.
- Luckner M. (1977): Secondary matabolism in plants and animals. Chapman and Hall, Ltd., Science Paperbacks, London.
- Ludwig S.R., Habera L.F., Dellaporta S.L., Wessler S.R. (1989): Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production,

encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(18): 7092–7096.

- Maessen G.D.F. (1997): Genomic stability and stability of expression in genetically modified plants. Acta Botanica Neerlandica 46: 3-24.
- Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. (2000): A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. Genes & Development 14(23): 2938-2943.
- Maldonado-Mendoza I.E., Lyola-Vargas V.M. (1995): Establishment and characterization of photosynthetic hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 40(3): 197-208.
- Mandal S., Das P.C., Joshi P.C. (1992): Naturally occuring xanthones from terrestrial flora. Journal of Indian Chemical Society 69: 611-636.
- Marin M.L., Marin J.A. (1998): Excised rootstocks roots cultured *in vitro*. Plant Cell Reports 18(3-4): 350-355.
- Martindale (1982): Bitters. In: The Extra Pharmacopoeia 28. Reynolda J.E.F. (ed.), The Pharmaceutical Press, London.
- Massonneau A., Houba-Hérin N., Pethe C., Madzak C., Falque M., Mercy M., Kopecny D., Majira A., Rogowsky P., Laloue M. (2004): Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. Journal of the Experimental Botany 55(408): 2549-2557.
- Matzke A.J.M., Matzke M.A. (1998): Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. Current Opinion in Plant Biology 1(2): 142-148.
- Matzke A.J.M., Neuhuber F., Park Y., Ambros P.F., Matzke A.M. (1994): Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. Molecular and General Genetics 244: 219-229.
- McGarvey P., Kaper J.M. (1991): A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. Biotechniques 11(4): 428-432.

- McGaw B.A., Horgan R. (1983): Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. Phytochemistry 22(5): 1103-1105.
- McGaw B.A., Horgan R., Heald J.K., Wullems G.J., Schilperoort R.A. (1988): Mass spectrometric quantitation of cytokinins in tobacco crown-gall tumors induced by mutated octopine Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Planta 176(2): 230-243.
- Meravy L. (1987): Phenolic compaunds in tissue culture of *Centaurium erythraea*. Biologia Plantarum 29: 81-87.
- Meyer P., Heidmann I. (1994): Epigenic variations of a transgenic petunia line show hipermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of hipermethylation in transgenic plants. Molecular and General Genetics 243(4): 390–399.
- Messens E., dekeyser R., Stachel S.E. (1990): A nontransformable *Triticum monoccocum* monocityledonous culture produces the potent *Agrobacterium vir*-inducing compound ethyleferulate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 4368-4372.
- Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1955a): Structure and synthesis of kinetin. Journal of the American Chemical Society 77(9): 2662-2663.
- Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1955b): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. Journal of the American Chemical Society 77(5): 1329.
- Mishiba K., Nishihara M., Abe Y., Nakatsuka T., Kawamura K., Komada K., Takesawa T., Abe J., Yamamura S. (2006): Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Biotechnology 23(1): 33-38.
- Mišić D., Šiler B., Nestorović Živković J., Simonović A., Maksimović V., Budimir S., Janošević D., Đuričković M., Nikolić M. (2011): Contribution of inorganic cations and organic compounds to osmotic adjustment in root cultures of two

Centaurium species differing in tolerance to salt stress. Plant Cell Tissue and Organ Culture 108(3): 389-400.

- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(44): 16598-16603.
- Moffatt B., Pethe C., Laloue M (1991): Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. Plant Physiology 95(3): 900-908.
- Mok M.C., Martin R.C., Dobrev P.I., Vankova R., Ho P.S., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D.W. (2005): Topolins and hydroxylated thidiazuron derivates are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. Plant Physiology 137(3): 1057-1066.
- Mok D.W., Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 89-118.
- Mok D.W., Mok M.C., Armstrong D.J., Shudo K., Isogai Y. (1982): Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N*'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (Thidiazuron). Phytochemistry 21(7): 1509-1511.
- Mok D.W., Mok M.C., Turner J.E., Mujer C.V. (1987): Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenyl-urea derivates in tissue culture systems. Hort Science 22: 1194-1197.
- Momčilović I., Grubišić D., Kojić M., Nešković M. (1997): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and plant regeneration of four *Gentiana* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50(1): 1-6.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. Biochemical and Biophysical Research Communications 255(2): 328-333.

- Motyka V., Faiss M., Strnad M., Kaminek M., Schmülling T. (1996): Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. Plant Physiology 112(3): 1035-1043.
- Motyka V., Kaminek M. (1992): Characteristics of cytokinin oxidase from tobacco and poplar callus cultures. In: Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants. Kaminek M., Mok DWS (eds.), The Netherlands: SPB Academic Publisher, The Hague, pp. 33-39.
- Motyka V., Kaminek M. (1992): Cytokinin oxidase from auxin- and cytokinin-dependent callus cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Journal of Plant Growth Regulation 13(1): 1-9.
- Motyka V., Vaňková R., Čapková V., Petrášek J., Kamínek M., Schmülling T. (2003): Cytokinin induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes 858 changes in enzyme glycosylation and secretion. Physiologia Plantarum 117: 11–21.
- Moureau F., Wouters J., Vercauteren D. P., Colin S., Edrvard G., Durant F., Ducrey F., Koenig J., Jarreau F.X. (1994): A reversible monoamine oxidase inhibitor, toloxatone: spectrophotometric and molecular orbital studies of the interaction with flavin adenine dinucleotide (FAD). European Journal of Medicinal Chemistry 29(4): 269-277.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-479.
- Mýtinová Z., Haisel D., Wilhelmová N. (2006): Photosynthesis and protective mechanisms during ageing in transgenic tobacco leaves with over-expressed cytokinin oxidase/dehydrogenase and thus lowered cytokinin content. Photosynthetica 44(4): 599-605.
- Naina N.S., Gupta P.K., Mascarenhas A.F. (1989): Genetic transformation and regeneration of transgenic neem (*Aza dirachta indica*) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Current Sciensce 58: 184-187.

- Nandi S.K., Letham D.S., Palni L.M.S., Wong O.C., Summons R.E. (1989): 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. Plant Science 31(2): 189-196.
- Nishikawa K., Shimomura K., Kayano T., Ishimaru K. (1997): Shoot regeneration in root cultures of *Centaurium scilloides*. Plant Biotechnology 14(2): 117-118.
- Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M., Yanofsky M.F. (1984): Crown gall: a molecular and physiological analysis. Annual Review of Plant Physiology 35: 387-413.
- Noodén L.D., Letham D.S. (2003): Cytokinin metabolism and signaling in the soybean plant. Australian Journal of Plant Physiology 20(4-5): 639-653.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Astot C., Dolezal K., Sandberg G. (2004): Auxin regulation of catokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(21): 8039-8044.
- Otten L., DeGreve H., Leemans J., Hain R., Hooykaas P., Schell J. (1984): Restoration of virulence of *vir* region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* strain B6S3 by coinfection with normal and mutant *Agrobacterium* strains. Molecular Genetics & Genomics 195: 159-163.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenosine to adenosine by anzyme activity in tobacco tissue. Plant Physiology 48(6): 775-778.
- Palni L.M.S., Burch L., Horgan R. (1998): The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. Planta 174(2): 231-234.
- Panchuk I.I:, Volkov R.A., Schoffl F. (2002): Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent eypression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. Plant Physiology 129(2): 838-853.

- Park S.U., Chae Y.A., Facchini P.J. (2003b): Genetic transformation of the figwort, *Scrophularia buergeriana* Miq., an Oriental medicinal plant. Plant Cell Reports 21(12): 1194-1198.
- Pazour G.J., Das A. (1990): *VirG*, an *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional activator, initiates translation at a UAG codon and is a sequence specific DNA-binding protein. Journal of Bacteriology 46: 631-638.
- Pedro M., Cerqueira F., Sousa M. E., Nascimento M.S.J., Pinto M. (2002): Xanthones as inhibitors of growth of human cancer cell lines and their effects on the proliferation of human lymphocytes *in vitro*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 10: 3725-3730.
- Peres V., Nagem T. J., Faustino de Oliveira F. (2000): Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. Phytochemistry 55(7): 683-710.
- Peters S., Schmidt W., Beerhues L. (1997): Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3′,4,6 -tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaurium erythraea* Rafn. and *Hypericum androsaemum* L. Planta 204(1): 64-69.
- Pettit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempé J. (1983): Further extension of opine concept: Plassmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. Molecular Genetics and Genomics, 190: 204–214.
- Piatczak E., Krolicka A., Wysokinska H. (2006): Genetic transformation of *Centaurium erythraea* Rafn by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of secoiridoids. Plant Cell Reports 25: 1308-1315.
- Piatczak E., Wielanek M., Wysokinska H. (2005): Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurium erythraea* Rafn. Plant Science 168(2): 431-437.
- Piatczak E., Wysokinska H. (2003): *In vitro* regeneration of *Centaurium erythraea* Rafn from shoot tips and other seedling explants. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 72(4): 283-288.
- Popelková H., Galuszka P., Frébortová J, Bilyeu K.D., Frébort I. (2004): Cytokinin dehydrogenase: characterization and structure homology modeling of the

flavoprotein catabolising plant hormones cytokinins. In: Recent Research Developments in Proteins. Pandalai S.G. (ed.), Transworld Research Network, Kerala, India, Vol. II, pp. 63-81.

- Porter J.R. (1991): Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Critical Reviews in Plant Sciences 10: 387-421.
- Powell G.K., Hommes N.G., Kuo J., Castle L.A., Morris R.O. (1988): Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. Molecular Plant-Microbe Interaction 1: 235-242.
- Ralser M., Querfurth R., Warnatz H.J., Lehrach H., Yaspo M. L., Krobitsch S. (2006): An efficient and economic enhancer mix for PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 347: 747–751.
- Raspor M., Motyka M., Žižková E., Dobrev P., Trávničkóvá A., Zdravković-Korać S., Simonović A., Niniković S., Dragićević I. (2012): Cytokinin profiles of *AtCKX2*-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*. Journal of Plant Growth Regulation, DOI 10.1007/s00344-011-9255-3.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (1999): Biology of plants. W.H. Freeman & Company, New York.
- Redig P., Motyka V., Van Onckelen H.A., Kamínek M. (1997): Regulation of cytokinin oxidase activity in tobacco callus expressing the T-DNA *ipt* gene. Physiologia Plantarum 99(1): 89-96.
- Reed R.C., Brady S.R., Muday G.K. (1998): Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidpsis*. Plant Physiology 118: 1369-1378.
- Reynaerts A., De Block M., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M. (1988): Selectable and screenable markers In: Plant molecular biology manual. Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds.). Kluwer Academic Publishers, London, A9:1–16.

- Riker A.J., Banfieled W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H.E. (1930): Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. Journal of Agricultural Research 41: 507.
- Rodriguez S., Marston A., Wolfender J.L., Hostettmann K. (1998): Iridoids and secoiridoids in the *Gentianaceae*. Current Organic Chemistry 2: 627-648.
- Rulko F., Witkiewicz K. (1972): Gentiana alkaloids. Part VII: Alkloids of centaury (*Erythraea centaurium*) Diss. Journal of pharmacy and Pharmacology 24: 73-77.
- Ruegger M., Dewey E., Hobbie L., Brown D., Bernasconi P., Turner J., Muday G., Estelle M. (1997): Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. The Plant Cell 9(5): 745-757.
- Rukachaisirikul V., Kamkaew M., Sukavisit D., Phongpaichit S., Sawangchote P., Taylor W.C. (2003): Antibacterial Xanthones from the Leaves of *Garcinia nigrolineata*. Journal of Natural Products 66(12): 1531-1535.
- Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004): Molecular cloning, expression and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). Phytochemistry 25(17): 2439-2446.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. Annual Review of Plant Biology 57(1): 431-449.
- Sakina K., Aota K. (1976): Studies on the constituents of *Erythraea centaurium* (Linne) Persoon. Part I: The structure of centapicrin, a new bitter secoiridoid glucoside. Yakugaku Zasshi 96(6): 683-688.
- Samanani N., Park S.U., Facchini P.J. (2002): *In vitro* regeneration and genetic transformation of the berberine-producing plant, *Thalictrum flavum* ssp *glaucum*. Physiologia Plantarum 116(1): 79-86.
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. (1990): Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. Nucleic Acids Research 18(24): 7465.

- Schaufelberger D., Hostettmann K. (1988): Chemistry and Pharmacology of *Gentiana lactea*. Planta Medica 54(3): 219-221.
- Schimmer O., Mauthner H. (1996): Polymetoxilated xanthones from the herb of *Centaurium erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*. Planta Medica 62(6): 561-564.
- Schmidt M.A., Parrott W.A. (2001): Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. Plant Cell Reports 20(5): 422-428.
- Schmidt W., Beerhues L. (1997): Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. FEBS Letters 420(2-3): 143-146.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and funcyion of cytokinin oxidase / dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. Journal of Plant Research 116 (3): 241-252.
- Schwinn K.E., Davies K.M., Deroles S.C., Markham K.R., Miller R.M., Brdaley J.M., Manson D.G., Given N.K. (1997): Expression of an *Antirrhinum majus* UDP-glucose:flavonoid-3-o-glucosyltransferase transgene alters flavonoid glycosylation and acylation in lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise.). Plant Science 125: 53-61.
- Semeria L., Ruffoni B., Rabaglio M., Ganga A., Vaira A.M., Accotto G.P. (1996): Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47(1): 67-72.
- Semeria L., Vaira A.M., Accotto G.P., Allavena A. (1995): Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* Griseb. By microprojectile bombardment. Euphytica 85: 125-130.
- Shaik G.M., Dráberová L., Dráber P., Boubelík M., Dráber P. (2008): Tetraalkylammonium derivatives as real-time PCR enhancers and stabilizers of the qPCR mixtures containing SYBR Green I. Nucleic Acids Research 36(15): *e93*, 1-10.

- Shantz E.M., Steward F.C. (1955): The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. Journal of the American Chemical Society 77(23): 6351-6353.
- Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D.W. (1995): Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. The Plant Journal 8(5): 777–784.
- Shen J., Citovsky V. (1996): *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: virulence proteins will travel. The Plant Cell 8: 1699-1710.
- Shou H., Frame B.R., Whitham S.A., Wang K. (2004): Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. Molecular Breeding 13: 201-208.
- Shudo K. (1994): Chemistry of phenylurea cytokinins. In: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. Mok D.W.S., Mok, M.C. (eds.), Boca Raton: CRC Press, pp. 35-42.
- Simonović A (2011): Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka. NNK internacional, Beograd.
- Singh S., Letham D.S., Jameson P.E., Zhang R., Parker C.W., (1988): Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence: IV. Cytokinin metabolism in soybean explants. Plant Physiology 88(3): 788-794.
- Skoog F., Miller C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symposium of Society of Experimental Biology 11: 118-131.
- Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. (2004): Plant Biotechnology. The Genetic Manipulation of Plants. Oxford University Press, New York, pp. 35–52.
- Spiess A. N., Mueller N., Ivell R. (2004): Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of *Taq* polymerase by the disaccharide trehalose. Clinical Chemistry 50(7): 1256-1259.
- Staba E.J. (1980): Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Stachel S.E., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318: 624-629.
- Stafford A., Morris P., Fowler M.W. (1986): Plant cell biotechnology: a perspective. Enzyme and microbial technology 8: 578-587.
- Stam M., Mol J.N.M., Kooter J.M. (1997): The silence of genes in transgenic plants. Annals of Botany 79(1): 3-12.
- Stessman D., Miller A., Spalding M., Rodermel S. (2002): Regulation of photosynthesis during *Arabidopsis* leaf development in continuous light. Photosynthetic Research 72(1): 27-37.
- Stirk W.A., Novák O., Strnad M., Van Staden J. (2003): Cytokinins in macroalgae. Plant Growth Regulation 41(1): 13-24.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. Physiologia Plantarum 101(4): 674-688.
- Subotić A., Budimir S., Grubišić D., Momčilović I. (2003/4): Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes.* Biologia Plantarum 47(4): 617-619.
- Subotić A., Janković T., Jevremović S., Grubišić D. (2006): Plant itssue culture and secondary metabolite production of *Centaurium erythraea* Rafn., a medicinal plant. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Bajaj Y.P.S. (ed.), Global Science Books UK, Vol. II, pp. 564-570.
- Subotić A., Jevremović S., Grubišić D. (2009a): Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaurium erythrae*a-Valuable medicinal plant. Scientia Horticulturae 120: 386-390.
- Subotić A., Jevremović S., Grubišić D., Janković T. (2009b): Spontaneous plant regeneration and production of secondary metabolites from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Rafn. In: Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. S.M. Jain, P.K. Saxena (eds.), Series: Methods in Molecular Biology, Springer Vol. 547, pp. 205-217.

- Subotić A., Jevremović S., Trifunović M., Petrić M., Milošević S., Grubišić D. (2009c): The influence of gibberelic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Gillib. African Journal of Biotechnology 8(14): 3223-3228.
- Suginuma C., Akihana T. (1995): Tranfformation ofgentian with *Agrobacterium* rhizogenes. Acta Horticulturae (ISHS) 392: 153-160.
- Sun S.B., Meng L.S. (2010): Genetic transformation of *Gentiana dahurica* Fish. by *Agrobacterium tumefaciens* using zygotic embryo-derived callus. Acta Physiologia Plantarum 32: 629-634.
- Sunandakumari C., Zhang C.L., Martin K.P., Slater A., Madhusoodanan P.V. (2005): Effect of auxins on indirect *in vitro* morphogenesis and expression of *gusA* transgene in a lectinaceous medicinal plant, *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 41(5): 695-699.
- Svensson A.S., Johnsson F.I., Moller I.M., Ramsusson A.G: (2002): Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. FEBS Letters 517(1-3): 79-82.
- Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T., Bennett M. (2002): Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. Plant Molecular Biology 49(3-4): 409-426.
- Šiler B., Mišić D., Filipović B., Popović Z., Cvetić T., Mijović A. (2007): Effect of salinity on *in vitro* growth and photosynthesis of common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.). Archives of Biological Sciences 59(2): 129-134.
- Šmehilová M., Galuszka P., Bilyeu K.D., Jaworek P., Kowalska M., Sebela M., Sedlářová M., English J.T., Frébort I. (2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. Journal of Experimenatl Botany 60 (9): 2701-2712.
- Tagaki S., Yamaki M., Yumioka E., Nishimura T., Sakina K. (1982): Studies on the constituents of *Erythraea centaurium* (Linne) Persoon. Part II: The structure of centauroside, a new bis-secoiridoid glucoside. Yakugaku Zasshi 102(4): 313-317.

- Takahashi M., Nishihara M., Yamamura S., Nishizava S., Irifune K., Morikawa H. (1998): Stable transformation of *Eustoma grandiflorum* by particle bombardment. Plant Cell Reports 17: 504-507.
- Takahashi S., Shudo K., Okamoto T., Yamada K., Isogai Y. (1978): Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N*'-(4-pyridyl)urea derivates. Phytochemistry 17(8): 1201-1207.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenylltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 276(28): 26405-26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyse the biosynthesis of *trans*-zeatin. The Journal of Biological Chemistry 279(14): 41866-41872.
- Takhtajan A. (1980): Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*). Botanical Review 46: 225.
- Tamamoto S., Aoyama T., Takamani M., Oka A. (1990): Binding of the regulatiry protein *VirG* to the phased signal sequences upstream from virulence genes on the hairy root inducing plasmid. Journal of Molecular Biology 215: 537-549.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H (2006): Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. The Plant Journal 45(6): 1028-1036.
- Tarkowska D., Dolezal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus canadensis* leaves by LC-(+) ESIMS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. Physiologia Plantarum 117(4): 579-590.
- Tepfer D. (1984): Transformation of several species of higher plants by *Argobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37: 959–967.
- Terzi M., Lo Sciavo F (1990): Somatic embryogenesis. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. S.S. Bhojwani (ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 54-66.

- Thomashow M.F., Hughly S., Bucholtz W.G., Thomashow L.S. (1986): Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crow gall tumour tissue. Science 231: 616-618.
- Thomashow L.S., Reeves S., Thomashow M.F. (1984): Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyses synthesis of indoleacetic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(16): 5071-5075.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. The Plant Journal 11: 1369-1376.
- Tiwari R.K., Trivedi M., Gunag Z.C., Guo G.Q., Zheng G.C. (2007): Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentopicroside in transformed hairy root culture. Plant Cell Reports 26(2): 199-210.
- Todorović S., Giba Z., Simonović A., Božić D., Banjanac T., Grubišić D. (2009): Manganese effects on *in vitro* development of lesser centaury [*Centaurium pulchellum* (Sw.) Druce]. Archives of Biological Sciences 61(2): 279-283.
- Todorović S., Grubišić D., Giba Z., Mišić D., Konjević R. (2006): Sucrose effects on *in vitro* fruiting and seed production of *Centaurium pulchellum*. Biologia Plantarum 50(4): 771-774.
- Toki S. (1997): Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Molecular Biology Reporter 15: 16-21.
- Tor M., Ainsworth C., Mantell S.H. (1993): Stable transformation of the food yam *Dioscorea alata* L. by particle bombardment. Plant Cell Report 12(7-8): 468-473.
- Trick H.N., Finer J.J. (1999): Induction of somatic embryogenesis and genetic transformation of Ohio buckeye (*Aesculus glabra* Willd.). In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 35(1): 57-60.
- Tucakov J. (1996): Lečenje biljem: Fitoterapija, Rad, Beograd, str. 390.
- Tutin T.G. (1972): Flora Europea, Cambridge, University Press, UK, Vol. 3, p. 56.

- Tzfira T., Citovsky V. (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 17: 147–154.
- Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. (2004b): Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. Trends in Genetics 20: 375-383.
- Tzfira T., Vaidya M., Citovsky V. (2001): VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with Agrobacterium *VirE2*, is involved in *VirE2* nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. EMBO J 20: 3596-3607.
- Tzfira T., Vaidya M., Citovsky V. (2004a): Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by*Agrobacterium*. Nature 431: 87-92.
- Van der Krol A.R., Lenting P.E., Veenstra J., Van der Meer I.M., Koes R.E., Gerats A.G.M., Mol J.N.M., Stuitje A.R. (1988): An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. Nature 333(6176): 866-869.
- Van der Sluis W.G. (1985a): Secoiridoids and xanthones in the genus *Centaurium* Hill (*Gentianaceae*) – a pharmacognostical study. Drukkerij Elinkwijk bv – Utrecht.
- Van der Sluis W.G. (1985b): Chemotaxonomical investigations of the Genera *Blackstonia* and *Centaurium* (*Gentianaceae*). Plant Systematics and Evolution 149: 253-286.
- Van der Sluis W.G., Labadie R.P. (1981): Secoiridoids and xanthones in the genus *Centaurium*. Part II: Secoiridoid glucosides in *Centaurium spicatum*. Planta Medica 41(3): 150-160.
- Van der Sluis W.G., Van der Nat J.M., Spek Á.L., Ikeshiro Y., Labadie R.P. (1983): Secoiridoids and xanthones in the genus *Centaurium*. Part VI: Gentiogenal, a conversion product of gentiopikrin (gentiopicroside). Planta Medica 49(12): 211-215.
- Van Larebeke N., Genetello C., Shell J., Schilperooort R.A., Hermans A.K., Hernalsteens J.P., Van Montagu M. (1975): Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature 255: 742–743
- Van Onckelen H., Prinsen E., Inzé D., Rüdelsheim P., Van Lijesebettens M., Follin A., Schell J., Van Montagu M., De Greef J. (1986): *Agrobacterium* T-DNA gene*1*

codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown gall cells. FEBS Letters 198: 357-360.

- Van Staden J., Crouch N.R. (1996): Benzyladenine and derivates – their significance and interconversion in plants. Plant Growth Regulation 19(2): 153-175.
- Varadaraj K., Skinner D.M. (1994): Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G _ C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. Gene 140 (1): 1–5.
- Vaseva-Gemisheva I., Lee D., Karanov E. (2005): Response of *Pisum sativum* cytokinin oxidase/dehydrogenase expression and specific activity to drought stress and herbicide treatments. Plant Growth Regulation 46(3): 199-208.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W., Malbeck J., Vankova R., Mok M.C. (2003): *O*-Glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous Cytokinins. Plant Physiology 131(3): 1374-1380.
- Veluthambi K., Ream W., Gelvin S.B. (1988): Virulence genes, borders and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bacteriology 170(4): 1523-1532.
- Venna V., Taylor G.C. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 43: 383–403.
- Vergunst A.C., Hooykass P.J.J. (1999): Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. Critical reviews in plant science 18: 1-31.
- Vinterhalter B., Momčilović I., Vinterhalter D. (2000): High biomass producing root cultures of *Gentiana punctata* L. Tranformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pArA4b). Archives of Biological Science Belgrade 52: 85-90.
- Vinterhalter B., Orbović V., Vinterhalter D. (1999): Transgenic root cultures of *Gentiana punctata* L. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 68: 275-280.
- Von Schwartzenberg K., Nunez M.F., Blaschke H., Dobrev P.I., Novák O., Motyka V., Strnad M. (2007): Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses

of activity, distributio and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins Plant Physiology 145(3): 786-800.

- Wang C-Z., Maier U. H., Keil M., Zenk M. H., Bacher A., Rondich F., Eisenreich W. (2003): Phenylalanine-independent biosynthesis of 1,3,5,8-tetrahydroxyxanthone. European Journal of Biochemistry 270(14): 2950-2958.
- Wang H.M., To K.Y. (2004): *Agrobacterium*-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*. Plant Science 166(4): 1087-1096.
- Wang J.N., Hou C.Y., Liu Y.L. (1994): Swertiafrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimer, from *Swertia franchetiana*. Journal of Natural Products 57(2): 211-217.
- Wang Y., Luo J.P., Wei Z.J., Zhang J.C. (2009): Molecular cloning and expression analysis of a cytokinin oxidase (DhCKX) gene in *Dendrobium huoshanense*. Molecular Biology Reports 36(6): 1331-1338.
- Watson B., Currier T.C., Gordon M.D., Chilton M.D., Nester E.W. (1975): Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. The Journal of Bacteriology 123: 255–264.
- Wei X.P., Gou X.P., Yuan T., Russell S.D. (2006): A highly efficient in vitro plant regeneration system and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Plumbago zeylanica*. Plant Cell Reports 25(6): 513-521.
- Weng X.-Y., Xu H.-X., Jiang D.-A. (2005): Characteristics of gas exchange, chlorophyll fluorescence and expression of key enzymes in photosynthesis during leaf senescence in rice plants. Journal of Integrative Plant Biology 47(5): 560-566.
- Werner T., Hanus J., Holub J., Schmülling T., van Onckelen H., Strnad M. (2003a): New cytokinin metabolites in IPT transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. Physiologia Plantarum 118(1): 127-137.
- Werner T., Holst K., Pors Y., Guivarc'h A., Mustroph A., Chriqui D., Grimm B., Schmülling (2008): Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. Journal of Experimental Botany 59(10): 2659-2672.

- Werner T., Köllmer I., Bartrina K., Holst K., Schmülling T. (2006): New insights into the biology of cytokinin degradation. Plant Biology 8(3): 371-381.
- Werner T., Motyka V., Strnad M, Schmülling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(18): 10487-10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Stems R., Van Onckelen H., Schmülling T (2003b): Cytokinin deficient transgenic *Arabidopsis* plant show multiple developmental alterations indicating opposite function of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem sctivity. The Plant Cell 15(11): 2532-2550.
- Werner T., Schmülling T. (2009): Cytokinin action in plant development. Current Opinion in Plant Biology 12(5): 527-538.
- Whitty C.D., Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. Canadian Journal of Biochemistry 52: 787-799.
- Wilhelmová N., Procházková D., Macháčková I., Vágner M., Srbová M., Wilhelm J. (2004): The role of cytokinins and ethylene in bean cotyledon senescence. The effect of free radicals. Biologia Plantarum 48(4): 523-529.
- Wilhelmová N., Wilhelm J., Kutík J., Haisel D. (1998): Changes in French bean cotyledon composition associated with modulated life-span. Photosynthetica 34(3): 377-391.
- Wilson G. (1990): Screening and selection of cultivated plant cells for increased yields of secondary metabolites. In: Plant Cell Line Selection. P.J. Dixon (ed.), Weinheim, pp. 187-213.
- Winkelmann T., Geier T., Preil W. (2006): Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 319–327.
- Xie D.Y. Hong Y. (2002): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Acacia mangium*. Plant Cell Reports 20(10): 917-922.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding

receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. Plant & Cell Physiology 42(9): 1017-1023.

- Yamamura J., Kobayashi M., Matsuda H., Aoki S. (1991): Anticholinergic action of *Swertia japonica* and an active constituent. Journal of Ethnopharmacology 33(1-2): 31-35.
- Yang S.H., Yu H., Goh Y.C. (2002): Isolation and characterization of the orchid cytokinin oxidase *DSCKX1* promoter. Journal of Experimental Biology 53(376): 1899-1907.
- Yang S.H., Yu H., Xu Y., Goh Y.C. (2003a): Functional characterization of a cytokinin oxidase gene *DSCKX1* in *Dendrobium* orchid. Plant Molecular Biology 51(2): 237-248.
- Yang S.H., Yu H., Xu Y., Goh Y.C. (2003b): Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid *DSCKX1*. FEBS Letters 555(2): 291-296.
- Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. Plant Physiology 134(4): 1654-1664.
- Yun D.J., Hashimoto T., Yamada Y. (1992): Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 11799-11803.
- Zafar R., Aeri V., Datta A. (1992): Application of plant tissue and cell culture for production of secondary metabolites. Fitoterapia 63: 33-43.
- Zeng Q-W., Qin S., Song S-Q., Zhang M., Xiao Y-H., Luo M., Hou L., Pei Y. (2012): Molecular cloning and characterization of a cytokinin dehydrogenase gene from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Molecular Biology Reporter 30(1): 1-9.

- Zhang H.L., Xue S.H., Pu F., Tiwari R.K., Wang X.Y. (2010): Establishment of hairy root lines and analysis of gentipicroside in the medicinal plant *Gentiana macrophylla*. Russian Journal of Plant Physiology 57(1): 110-117.
- Zhang K, Letham DS, John PCL (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of $p34^{cdc2}$ -like H1 histone kinase. Planta 200 (1)**:** 2–12.
- Zhang R., Zhang X., Wang J., Letham D.S., McKinney S.A., Higgins T.J.V. (1995): The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene. Planta 196(1): 84-94.
- Zhou J. (1991): Bioactive glycosides from Chinese medicines. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 86(suppl. 2): 231-234.
- Zhou X., Guangcheng C., Rufa L., Yongru S., Wenbin L. (1994): A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. Proceedings of IPBA, Rogla, pp. 171–175.
- Zhu Y., Nam J., Humara J.M., Mysore K.S., Lee L.Y., Cao H., Valentine L., Li J., Kaiser A.d., Kopecky A.L., Hwang H.H., Bhattacharjee S., Rao P.K., Tzfira T., Rajagopal J., Yi H.C., Veena, Yadav B.S., Crane Y.M., Lin K., Larcher Y., Gelvin M.J.K., Knue M., Ramos C., Zhao X., Davis S.J., Kim S.I., Ranjith-Kumar C.T., Choi Y.J., Hallan V.K., Chattopadhyay S., Sui X., Ziemienowicz A., Matthysse A.G., Citovsky V., Hohn B., Gelvin S.B. (2003): Identificaion of *Arabidopsis rat* mutants. Plant Physiology 132(2): 494-505.
- Zubko E., Adams C.J., Machaekova I., Malbeck J., Scollan C., Meyer P. (2002): Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active Cytokinins in plants. The Plant Journal 29(6): 797-808.

B I O G R A F I J A A U T O R A

Milana M. Trifunović rođena je 30. januara 1980. godine u Kikindi, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1998. godine na studijskoj grupi Biologija. Fakultet je završila 2003. godine i iste godine upisala je poslediplomske studije na smeru Fiziologija biljaka Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u okviru studijskog programa Fiziologija i molekularna biologija biljaka, upisala je 2006. godine.

Od juna 2003. godine Milana Trifunović zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka IBISS-a. U zvanje istraživač saradnik izabrana je aprila 2008. godine. Milana Trifunović je tokom istraživačkog rada u periodu od 2003. do 2010. godine učestvovala u realizaciji dva projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od 2011. godine pa do danas angažovana je na realizaciji zadataka dva nacionalna projekta fininsiranih od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije i jednog međunarodnog bilateralnog naučnoistraživačkog projekta između Republike Srbije i Republike Hrvatske.

Tokom 2010. godine u trajanju od šest nedelja boravila je na Institutu za Hortikulturu u Anžeu, Francuska, u okviru akcije evropske organizacije za saradnju u oblasti nauke i tehnologije. Dobitnik je nagrade za najbolju poster prezentaciju mladog istraživača na jednom nacionalnom i dva međunarodna skupa.

Milana Trifunović je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Evropskog društva za biljnu biologiju (FESPB), Internacionalne asocijacije za biljnu biotehnologiju (IAPB) kao i Internacionalnog društva za hortikulturna istraživanja (ISHS).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милана Трифуновић

број уписа ЕА060014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Генетичка трансформација кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)

AtCKX1 и *AtCKX2* генима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 18.04.2012.

Трифуновић Милана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора МилануТрифуновић

Број уписа ЕА060014

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада Генетичка трансформација кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.) *AtCKX1* и *AtCKX2* генима

Ментор др Ангелина Суботић

Потписани МилануТрифуновић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 18.04.2012.

Трифуновић Милена

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Генетичка трансформација кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)

AtCKX1 и *AtCKX2* генима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

(1.) Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 18.04.2012.

Трифуновић Милена

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.