

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Suzana M. Pavlović

**EFEKAT EKSPRESIJE GENA ZA  
PROTEIN-KINAZU 1 DUVANA (*NPK1*)  
KOD TRANSFORMISANIH BILJAKA  
KARFIOLA  
(*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)  
NA RAZVOJ TOLERANCIJE PREMA  
POVIŠENIM KONCENTRACIJAMA  
*NaCl in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Suzana M. Pavlović

**EFFECT OF TOBACCO PROTEIN  
KINASE 1 (*NPK1*) GENE EXPRESSION  
IN TRANSFORMED CAULIFLOWER  
(*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)  
PLANTS ON THE DEVELOPMENT OF  
TOLERANCE TO INCREASED  
CONCENTRATIONS OF NaCl *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

**naučni savetnik dr Nevena Mitić**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

**vanredni profesor dr Dušica Janošević**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Članovi komisije:

**naučni savetnik dr Branka Vinterhalter**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

**naučni saradnik dr Jelena Savić**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

**docent dr Tijana Cvetić Antić**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Datum odbrane:

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u biološkoj laboratoriji Odeljenja za genetiku i oplemenjivanje povrća Instituta za povrtarstvo d.o.o. u Smederevskoj Palanci i laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković".*

*Koristim priliku da se zahvalim mentoru dr Neveni Mitić na pomoći, strpljenju i razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se dr Branki Vinterhalter na ukazanom gostoprimstvu i pomoći tokom eksperimenta. Veliku zahvalnost dugujem i ostalim članovima komisije na pomoći i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se kolegama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", dr Jeleni Savić i Jeleni Milojević na pomoći u izradi eksperimentalnog dela ove disertacije (molekularne i biohemijske analize).*

*Zahvaljujem se i kolegama Instituta za povrtarstvo d.o.o., posebno dr Zdenki Girek i Milanki Radivojević na ukazanom vremenu i pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Bakterija Agrobacterium tumefaciens EHA101(pSHX004) korišćena u ovom radu obezbeđena je zahvaljujući ljubaznosti dr Kan Wang sa Ajova Univerziteta (Iowa State University, USA) i na tome im najlepše zahvaljujem.*

*Posebnu zahvalnost dugujem roditeljima, ocu Milosavu i majci Zorici, koji su mi pružali bezuslovnu i bezrezervnu ljubav i podršku tokom čitavog mog života.*

*Hvala i svima ostalima koji su me podržavali tokom izrade ove teze.*

**Efekat ekspresije gena za protein-kinazu 1 duvana (*NPKI*) kod transformisanih biljaka karfiola (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) na razvoj tolerancije prema povišenim koncentracijama NaCl *in vitro***

**REZIME**

Biljke su neprekidno izložene različitim vrstama stresa iz spoljašnje sredine, koji nepovoljno utiču na njihov rast i razviće. Povećan salinitet zemljišta je jedan od faktora spoljašnje sredine, koji u velikoj meri ograničava produktivnost gajenih biljaka. Karfiol (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), je značajna povrtarska kultura koja je, kao i ostale povrtarske kupusnjače, podložna uticaju različitih stresnih faktora, pa i povećanom salinitetu usled intenzivnog zalivanja. Uz klasične metode oplemenjivanja, biotehnoške metode mogu biti efikasan pristup za povećanje tolerancije biljaka prema stresu. Mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK) igraju ključnu ulogu u rastu i razviću biljaka i njihovom odgovoru na biotičke i abiotičke faktore spoljašnje sredine. Introdukcija gena za komponente MAPK kaskada može dovesti do razvoja transgenih biljaka sa povećanom tolerancijom prema stresu, pri čemu su MAPKKK najpogodnije za genetički inženjering jer funkcionišu na početku kaskade koja vodi aktivaciji više transkripcionih faktora i stres inducibilnih gena. Preduslov za primenu ovih metoda u oplemenjivanju biljaka jeste uspostavljanje efikasnog sistema za regeneraciju biljaka *in vitro*.

Kod četiri varijeteta *B. oleracea* (karfiola, kupusa, brokolija i kelja) uspostavljen je sistem za regeneraciju pupoljaka *in vitro* putem organogeneze. Eksplantati hipokotila su kod skoro svih testiranih varijeteta imali najbolji regenerativni potencijal (od 75,0-91,2% sa produkcijom 3,5-7,4 pupoljaka po eksplantatu). Podloge koje su sadržale N<sup>6</sup>-benziladenin (BA) su bile optimalne, kako za regeneraciju pupoljaka, tako i za njihovu kasniju multiplikaciju. Regenerisani izdanci su uspešno ožiljeni i aklimatizovani.

Kod kupusa i karfiola uspostavljen je i jednostavan protokol za direktnu somatsku embriogenezu iz nezrelih zigotskih embriona gajenih na B5 podlozi bez regulatora rastenja (B5-0), koji je omogućio efikasnu transformaciju karfiola kao, u tom pogledu, problematičnog varijeteta. Kod oba varijeteta, zigotski embrioni u kotiledonarnom stadijumu razvoja imali su najveći kapacitet za formiranje somatskih

embriona (11,84 kod kupusa i 11,95 kod karfiola). Somatski embrioni obrazovali su sekundarne somatske embrione u visokoj frekvenci (83,3% kod kupusa i 87,5%, kod karfiola). Embriogeni potencijal kultura, sa postepenim opadanjem, održavan je deset ciklusa (deset meseci).

U cilju dobijanja transformisanih biljaka karfiola sa povećanom tolerancijom prema povišenim koncentracijama NaCl, hipokotili klijanaca karfiola i somatski embrioni transformisani su pomoću *Agrobacterium tumefaciens* vektora EHA101(pSHX004) koji nosi *NPKI* gen koji kodira MAPKKK duvana, za povećanje tolerancije prema stresu i *bar* gen, kao selektivni marker, koji kodira fosfinotricin acetyltransferazu koja omogućuje otpornost prema totalnom herbicidu fosfinotricinu (PPT). Efikasnija transformacija (7,33%) postignuta je korišćenjem somatskih embriona kao eksplantata uz dodatak 100 µM acetosiringona (AS) u hranljivu podlogu tokom kokultivacije sa agrobakterijama u odnosu na hipokotile sa (2,5%) i bez AS (0,83%). Integracija *NPKI* i *bar* gena potvrđena je kod 21 transformisane linije karfiola T<sub>0</sub> generacije. Broj kopija *NPKI* transkripata u transformisanim izdancima varirao je od 2341 do 1272\*10<sup>4</sup> po µg ukupne RNK, a *bar* transkripata od 990 do 7180\*10<sup>2</sup> po µg RNK, pri čemu je najveći broj kopija *NPKI* i *bar* transkripata detektovan kod izdanaka linije T<sub>0</sub>-L2, a najmanji kod linije T<sub>0</sub>-L12. Ekspresija oba transgena potvrđena je i u T<sub>1</sub> generaciji, dobijenoj iz semena nakon samooprašivanja T<sub>0</sub> biljaka. Ekspresija *NPKI* gena u transgenim biljkama karfiola uticala je na razvoj tolerancije prema povećanim koncentracijama NaCl *in vitro*. Sve transformisane linije T<sub>0</sub> generacije, koje su gajene na podlozi koja je sadržala 100 mM NaCl, su pokazale povećanu toleranciju na stres u odnosu na netransformisane, a većina je to svojstva zadržala i na tretmanu sa 200 mM NaCl. Nivo tolerancije transformisanih T<sub>0</sub> linija bio je u korelaciji sa nivoom ekspresije *NPKI* gena. Ujedno, ekspresija *bar* gena doprinela je otpornosti transformisanih biljaka prema totalnom herbicidu PPT, primenjenog u koncentracijama 2-3 puta većim od one koja se koristi za suzbijanje korova u usevu. Transformisane biljke karfiola gajene u stakleniku nisu pokazale morfološke abnormalnosti, kao ni razlike u prinosu cvasti u odnosu na kontrolne netransformisane biljke.

**Ključne reči:** *Brassica oleracea* L., karfiol, organogeneza, somatska embriogeneza, genetička transformacija, *Agrobacterium tumefaciens*, *NPK1* gen, *bar* gen, abiotički stres, salinitet

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK brojevi:** 581.1:582.683.2(043.3)

632.123:635.12(043.3)

**Effect of tobacco protein kinase 1 (*NPKI*) gene expression in transformed cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) plants on the development of tolerance to increased concentrations of NaCl *in vitro***

**ABSTRACT**

Plants are continuously exposed to various types of stress from the environment that adversely affect their growth and development. The increased salinity of the soil is one of the environmental factors that greatly limits the productivity of the cultivated plants. Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), is an important vegetable crop, which, like other *Brassica* vegetable, is grown under the influence of various biotic and abiotic stresses, including the increased salinity due to intensive watering. In addition to classical breeding methods, biotechnology methods may be an effective approach to increase plants stress tolerance. The mitogen-activated protein kinases (MAPK) play a key role in the growth and development of plants and their response to biotic and abiotic stresses. Introduction of genes for components of MAPK cascade may lead to the development of transgenic plants with the increased tolerance to stress, wherein MAPKKK are most suitable for genetic engineering, because they act at the beginning of the cascade that leads to activation of several transcription factors and stress inducible genes. A prerequisite for the application of these methods in plant breeding is establishing an efficient plant regeneration system *in vitro*.

A regenerative system via organogenesis was established in four *B. oleracea* varieties (cauliflower, cabbage, broccoli, kale). The hypocotyl explants in almost all the tested varieties have the best regenerative potential (from 75.0-91.2% with the production of 3.5-7.4 shoots per explant). The media containing N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) were optimal both for shoot regeneration and their subsequent multiplication. Regenerated shoots were successfully rooted and acclimatized.

In cabbage and cauliflower a simple protocol was established for the direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos grown on B5 medium without growth regulators (B5-0), which enabled the efficient transformation of cauliflower, in this regard, as a problematic variety. In both varieties, zygotic embryos at the cotyledonary stage of development had the highest embryo-forming capacity (11.84 in



cabbage and 11.95 in cauliflower). Secondary somatic embryos appeared on somatic embryos at a high frequency (83.3% in cabbage and 87.5% in cauliflower). The embryogenic potential of the cultures, with a gradual decline, was maintained for ten cycles (ten months).

In order to obtain transformed plants of cauliflower with the improved tolerance to increasing concentrations of NaCl, the seed hypocotyls of cauliflower and somatic embryos were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* vector EHA101(pSHX004) which carries the *NPK1* gene encoding the MAPKKK of tobacco, for increasing tolerance to stress and the *bar* gene, as a selective marker, which encodes phosphinothricin acetyltransferase which provides resistance to a total herbicide phosphinothricin (PPT). A more efficient transformation (7.33%) is achieved by using somatic embryos as explants, with the addition of 100  $\mu$ M acetosyringon (AS) in the nutrient medium during the co-cultivation with *Agrobacterium* compared to the hypocotyls with (2.5%) and in the absence of AS (0.83%). Integration of the *NPK1* and the *bar* gene was verified in 21 T<sub>0</sub> cauliflower transformed lines. The number of copies of *NPK1* transcripts in the transformed shoots varied from 2341 to  $1272 \times 10^4$  per  $\mu$ g of total RNA and *bar* transcripts from 990 to  $7180 \times 10^2$  per  $\mu$ g RNA, with the largest number of copies *NPK1* and *bar* transcripts detected in shoot lines T<sub>0</sub>-L2 and the lowest in line T<sub>0</sub>-L12. Expression of both transgenes were confirmed in T<sub>1</sub> generation derived from seeds after inbreeding of T<sub>0</sub> plants. *NPK1* gene expression in transgenic plants of cauliflower has influenced the development of tolerance to increasing concentrations of NaCl *in vitro*. All T<sub>0</sub> transformed lines grown on a medium containing 100 mM NaCl, showed better stress tolerance compared to non-transformed plants, and most of them displayed the same trend in the treatment with 200 mM NaCl. The tolerance level of T<sub>0</sub> transformed lines was in correlation with the level of *NPK1* gene expression. At the same time, the expression of the *bar* gene has contributed to resistance of transformed plants to the total herbicide PPT, applied at concentrations 2-3 times higher than the one that is used for weed control in the crop. Transformed plants of cauliflower grown in greenhouse conditions showed neither morphological abnormalities, nor was there any difference in the yield compared with untransformed plants.

**Keywords:** *Brassica oleracea* L., cauliflower, organogenesis, somatic embryogenesis, genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *NPK1* gene, *bar* gene, abiotic stress, salinity

**Scientific field:** Biology

**Scientific Area:** Plant Physiology

**UDC numbers:** 581.1:582.683.2(043.3)

632.123:635.12(043.3)

# SADRŽAJ

## SKRAĆENICE

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. STRES SOLI</b>	1
1.1.1. Oksidativni stres	5
<b>1.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI TOLERANCIJE</b>	8
1.2.1. Mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK)	9
1.2.2. <i>Nicotiana</i> protein-kinaza 1 (NPK1)	15
<b>1.3. GENETIČKA TRANSFORMACIJA U CILJU POVEĆANJA TOLERANCIJE BILJAKA NA ABIOTIČKI STRES</b>	18
<b>1.4. POVRTARSKÉ KUPUSNJAČE (<i>Brassica oleracea</i> L.)</b>	19
1.4.1. Karfiol ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> )	22
<b>1.5. OPLEMENJIVANJE VRSTE <i>B. oleracea</i> L.</b>	23
1.5.1. Klasične metode oplemenjivanja	23
1.5.2. Moderne metode oplemenjivanja	24
1.5.2.1. Regeneracija biljaka roda <i>Brassica</i> putem organogeneze i somatske embriogeneze	24
1.5.2.2. Genetičke transformacije biljne vrste <i>B. oleracea</i> L.	28
<b>2. CILJEVI</b>	33
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	34
<b>3.1. USPOSTAVLJANJE PROTOKOLA ZA REGENERACIJU VIŠE VARIJETETA VRSTE <i>B. oleracea</i> PUTE M ORGANOGENEZE</b>	34
3.1.1. Biljni materijal korišćen za organogenezu	34
3.1.2. Hranljiva podloga za indukciju organogeneze	34
3.1.3. Uslovi gajenja kultura <i>in vitro</i>	34
3.1.4. Sterilno isključavanje semena	35
3.1.5. Regeneracija pupoljaka	35
3.1.6. Umnožavanje pupoljaka	36
3.1.7. Ožiljavanje i aklimatizacija <i>in vitro</i> regenerisanih biljaka	36
<b>3.2. SOMATSKA EMBRIOGENEZA IZ NEZRELIH ZIGOTSKIH EMBRIONA</b>	37
3.2.1. Biljni materijal korišćen za uspostavljanje somatske embriogeneze	37
3.2.2. Hranljive podloge za indukciju somatske embriogeneze	38
3.2.2.1. Hranljiva odloga za indukciju sekundarne somatske embriogeneze	38
3.2.3. Uspostavljanje somatske embriogeneze	39

3.2.4.	Uspostavljanje sekundarne i repetitivne somatske embriogeneze	39
3.2.5.	Regeneracija i aklimatizacija <i>in vitro</i> biljaka	39
3.2.6.	Histološka analiza	40
3.2.7.	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	40
3.2.8.	Analiza genetičke stabilnosti biljaka regenerisanih iz somatskih embriona RAPD-PCR metodom	40
3.2.8.1.	Izolacija genomske DNK	40
3.2.8.2.	Komponente i uslovi za RAPD - PCR	42
<b>3.3.</b>	<b>GENETIČKA TRANSFORMACIJA KARFIOLA POMOĆU <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	43
3.3.1.	Konstrukt korišćen za genetičku transformaciju	43
3.3.2.	Hranljiva podloga za rast bakterija i priprema bakterijske suspenzije za transformaciju biljnog tkiva	44
3.3.3.	Određivanje selektivne koncentracije fosfinitricina (PPT)	45
3.3.4.	Inokulacija eksplantata sa <i>A. tumefaciens</i> i regeneracija pupoljaka	46
3.3.5.	Hlorofenol-crveno test	47
3.3.6.	Molekularna analiza transformisanih biljaka (PCR, RT-PCR i qPCR)	48
3.3.6.1.	PCR analiza	48
3.3.6.2.	RT-PCR analiza	49
3.3.6.2.1.	<i>Izolacija RNK</i>	50
3.3.6.2.2.	<i>Reakcija reverzne transkripcije (RT) i PCR amplifikacija cDNA</i>	51
3.3.6.3.	Kvantitativno određivanje nivoa ekspresije gena (qPCR)	53
<b>3.4.</b>	<b>TEST TOLERANCIJE TRANSFORMISANIH BILJAKA PREMA POVEĆANOJ KONCENTRACIJI NaCl</b>	55
3.4.1.	Određivanje kritične koncentracije NaCl za preživljavanje biljaka <i>in vitro</i>	55
3.4.2.	Ispitivanje efekata NaCl na rast i morfološke osobine biljaka <i>in vitro</i>	56
3.4.3.	Ispitivanje efekata NaCl na fiziološke osobine biljaka <i>in vitro</i>	56
3.4.3.1.	Određivanje sadržaja hlorofila i karotenoida	57
3.4.3.2.	Određivanje sadržaja ukupnih šećera	57
3.4.3.3.	Određivanje sadržaja prolina	58
3.4.3.4.	Analiza antioksidativnih enzima	59
3.4.3.4.1.	<i>Izolacija i kvantifikacija ukupnih proteina</i>	59
3.4.3.4.2.	<i>Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza</i>	59

3.4.3.4.3.	<i>Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza</i>	60
3.4.3.4.4.	<i>Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaze</i>	60
3.4.4.	Test otpornosti transformisanih biljaka prema herbicidu fosfinotricinu (PPT) <i>in vitro</i> i <i>ex vitro</i>	61
<b>3.5.</b>	<b>STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b>	61
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	63
<b>4.1.</b>	<b><i>In vitro</i> PROPAGACIJA KOD RAZLIČITIH VARIJETETA <i>B. oleracea</i></b>	63
4.1.1.	Uspostavljanje kulture <i>in vitro</i> organogenezom <i>de novo</i>	63
4.1.2.	Umnožavanje regenerisanih pupoljaka	73
4.1.3.	Ožiljavanje i aklimatizacija <i>in vitro</i> regenerisanih biljaka	75
<b>4.2.</b>	<b>USPOSTAVLJANJE SOMATSKE EMBRIOGENEZE IZ NEZRELIH ZIGOTSKIH EMBRIONA</b>	77
4.2.1.	<i>In vitro</i> indukcija somatske embriogeneze	77
4.2.2.	<i>In vitro</i> indukcija sekundarne somatske embriogeneze	82
4.2.3.	Uspostavljanje repetitivne somatske embriogeneze	84
4.2.4.	Rastenje i razviće <i>in vitro</i> formiranih somatskih embriona	86
4.2.5.	Aklimatizacija biljaka regenerisanih iz somatskih embriona	86
4.2.6.	Genetičke stabilnosti biljaka regenerisanih iz sekundarnih somatskih embriona	87
<b>4.3.</b>	<b>GENETIČKA TRANSFORMACIJA POMOĆU <i>A. tumefaciens</i></b>	88
4.3.1.	Selektivna koncentracija fosfinotricina (PPT)	88
4.3.2.	Genetička transformacija karfiola pomoću <i>A. tumefaciens</i> EHA101(pSHX004)	90
4.3.2.1.	Hlorofenol-crveno reakcija	94
4.3.2.2.	Umnožavanje transformisanih izdanaka <i>in vitro</i>	94
4.3.2.3.	Morfološke karakteristike, ožiljavanje i aklimatizacija <i>in vitro</i> transformisanih izdanaka	96
4.3.2.4.	Fenotipske karakteristike transformisanih biljaka aklimatizovanih u stakleniku	98
4.3.2.5.	Molekularna analiza biljaka transformisanih sa EHA101(pSHX004)	101
4.3.2.5.1.	<i>PCR</i> analiza potencijalno transformisanih linija	101
4.3.2.5.2.	<i>RT-PCR</i> analiza transformisanih linija	101
4.3.2.5.3.	<i>qPCR</i> analiza transformisanih linija	102
4.3.3.	Efekat povišenih koncentracija NaCl <i>in vitro</i> na transformisane biljke karfiola	105

4.3.3.1.	Rast i morfološke karakteristike transformisanih biljaka gajenih u uslovima povećane koncentracije NaC <i>in vitro</i>	107
4.3.3.2.	Sadržaj hlorofila i karotenoida kod transformisanih biljaka gajenih u uslovima povećane koncentracije NaC <i>in vitro</i>	111
4.3.3.3.	Sadržaj osmolita (šećera i prolina) kod transformisanih biljaka gajenih u uslovima povećane koncentracije NaC <i>in vitro</i>	112
4.3.3.4.	Aktivnost antioksidativnih enzima – peroksidaza (POD), katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD)	114
4.3.4.	Otpornost transformisanih biljaka karfiola prema totalnom herbicidu fosfinotricinu (PPT) <i>in vitro</i> i <i>ex vitro</i>	117
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	120
<b>5.1.</b>	<b>REGENERACIJA VARIJETETA <i>B. oleracea</i> L. PUTE M ORGANOGENEZE I SOMATSKE EMBRIOGENEZE</b>	120
<b>5.2.</b>	<b>GENETIČKA TRANSFORMACIJA KARFIOLA POMOĆU EHA101(pSHX004)</b>	125
<b>5.3.</b>	<b>EKSPRESIJA <i>NPK1</i> I <i>bar</i> TRANSGENA</b>	129
<b>5.4.</b>	<b>TOLERANCIJA TRANSFORMISANIH LINIJA KARFIOLA PREMA POVEĆANOJ KONCENTRACIJI NaCl <i>in vitro</i></b>	132
<b>5.5.</b>	<b>OTPORNOST TRANSFORMISANIH BILJAKA KARFIOLA PREMA TOTALNOM HERBICIDU FOSFINOTRICINU</b>	136
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	138
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	140
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	182

Prilog 1 – Izjava o autorstvu doktorskog rada

Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Prilog 3 – Izjava o korišćenju doktorskog rada

## SKRAĆENICE

2,4-D - 2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina

AA – askorbinska kiselina

ANOVA - analiza varijanse

APX - askorbat peroksidaze

AS - acetosiringon

B5 podloga – podloga po Gamborg i sar. (1968)

BA - N<sup>6</sup>-benziladenin

BSA - (eng. *Bovine Serum Albumin*)

BSE - srednji broj somatskih embriona po eksplantatu

CAT - katalaze

cDNK - komplementarni lanac dezoksiribonukleinske kiseline

CTAB - cetil-trimetil-amonijum bromid

DTT - ditiotreitrol

DHA - dehidroaskorbat

DHAR - dehidroaskorbat reduktaze

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP - dezoksiribonukleotid trifosfati

EDTA - etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

KFE – kapacitet formiranje embriona

FSE - frekvenca somatske embriogeneze

GR - glutation reduktaze

GSH - redukovani glutation

GSSG - oksidovani glutation

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodonik peroksid

HFC - hlorofenol-crveno reakcija

HSF (eng. *Heat Shock Transcription Factors*)

IBA - indol-3-buterna kiselina

IM - indeks multiplikacije

IR - indeks kapaciteta za regeneraciju

KIN - 6-furfurilaminopurin (kinetin)

LSD (eng. *Least Significant Difference*) - najmanja statistički značajna razlika

MAPK (eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) - mitogenom aktivirana protein-kinaza

MAPKK - MAP kinaza kinaze

MAPKKK - MAP kinaza kinaze kinaze

MDHA - monodehidro askorbat

MDHAR - monodehidroaskorbat reduktaze

MS podloga - podloga po Murashige i Skoog-u (1962)

NAA - naftil sirćetna kiselina

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NBT - nitroblu tetrazolium hlorid

NPK1 - *Nicotiana* protein-kinaza 1

caNPK1 - konstitutivno aktivna NPK1

PCD (eng. *Programmed Cell Death*) – programirana ćelijska smrt

PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) - lančana reakcija polimeraze

PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid

POD - peroksidaze

PPT - fosfinotricinom

PVP - polivinilpirolidon

qPCR - kvantitativni PCR

RAPD - PCR (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction*)

RF - frekvencija regeneracije

RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNK - ribonukleinska kiselina

ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*) - reaktivne vrste kiseonika

RR - regulatori rasteenja

RT - reverzna transkripcija

SBP - srednji broj pupoljaka po eksplantatu

SDS - (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*) Na-dodecil sulfat

SE - somatski embrioni

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

SSE - sekundarni somatski embrioni

SOD - superoksid dismutaze



TBE - TRIS-boradni-EDTA pufer

T-DNK - (eng. *transferred DNA*) deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom

TDZ - tidiazuron

TRIS - tris(hidroksimetil)aminometan

## 1. UVOD

Biljke, kao sesilni organizmi, su neprekidno izložene abiotičkim i biotičkim faktorima spoljašnje sredine. Abiotički stres izazivaju ekstremne temperature (niske i visoke), voda, soli, jonizujuće zračenje, mehaničke povrede, nedostatak hranljivih materija u zemljištu, herbicidi i prisustvo drugih zagađivača u zemljištu i vazduhu (teški metali, SO<sub>2</sub>, ozon). Biotički stres izazivaju korovi, štetočine (insekti, ptice, glodari, nematode) i različiti patogeni (bakterije, virusi, gljive).

Oba tipa stresa nepovoljno utiču na rast i razviće biljaka, smanjujući im produktivnost na nivo niži od njihovog genetičkog potencijala (Bowler i sar., 1994). Posledica delovanja faktora abiotičkog stresa može biti smanjenje prinosa gajenih kultura i za više od 50% (Rodriguez i sar., 2005; Acquaah, 2007).

Osmotski stres, izazvan bilo sušom ili povećanim salinitetom, dovodi do smanjanja vodnog potencijala ćelija (Hohmann, 2002). Ćelije gube vodu procesom osmoze, što dovodi do inhibicije transporta supstrata i kofaktora u ćelije, oštećenja i na kraju do programirane ćelijske smrti (PCD - eng. *Programmed Cell Death*) (Lang i sar., 2004).

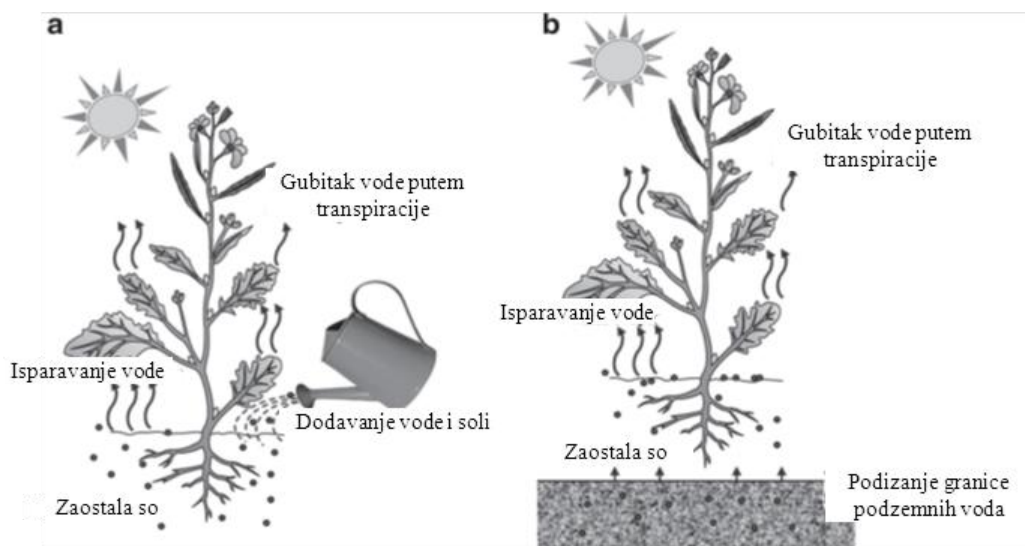
U prirodnom ekosistemu, jedan tip abiotičkog stresa retko deluje samostalno. Suša, salinizacija zemljišta i ekstremne temperature su blisko povezani i predstavljaju stresne faktore čiji se fiziološki efekti preklapaju (Krasensky i Jonak, 2012). Visoka temperatura je često praćena sušom i vodnim deficitom (Xiong i sar., 1999; Bitá i Gerats, 2013). Povećano prisustvo soli u zemljištu je čest problem kod suvih i polusuvih zemljišta, gde su biljke primorane da razvijaju mehanizme tolerancije osmotskog stresa izazvanog povećanim salinitetom i vodnim deficitom (Rengasamy, 2006).

### 1.1. STRES SOLI

Većina biljka je osetljiva prema povećanim koncentracijama soli u zemljištu, što u velikoj meri ograničava produktivnost i smanjuje prinos (Hasanuzzaman i sar., 2013). Salinizacija se definiše kao prisustvo određene količine rastvorenih soli u zemljištu i izražava se preko električne provodljivosti rastvora. Zemljište je slano ako mu je električna provodljivost veća od 4 dS m<sup>-1</sup>, što je ekvivalentno koncentraciji NaCl od 40 mM (USSL, 2005).

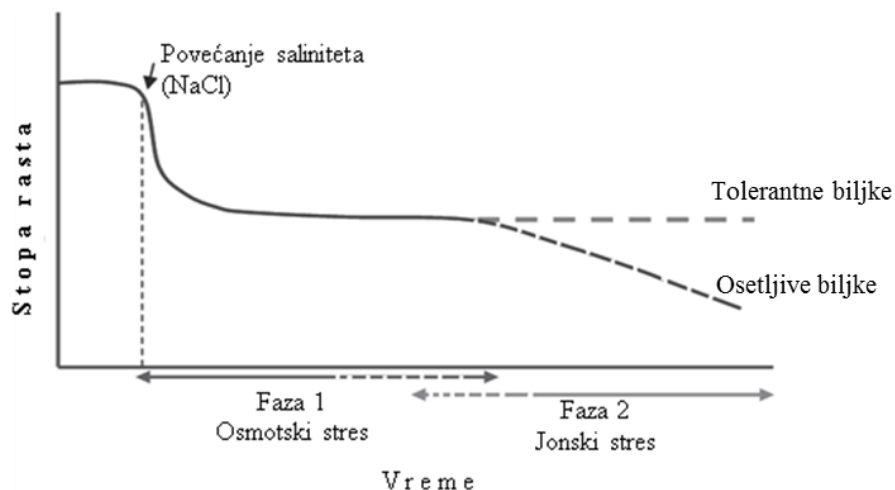
Značajne površine zemljišta u svetu su pogođene povećanim salinitetom i one se povećavaju iz dana u dan. Salinitet zemljišta se naročito pogoršava navodnjavanjem. U svetu oko 17% obradivog zemljišta se navodnjava i na toj površini se odvija više od 30% svetske poljoprivredne proizvodnje (Hillel, 2000). Procenjuje se da je više od 20% navodnjavanog zemljišta (oko 45 miliona hektara) pogođeno povećanim salinitetom (Pitman i Lauchli, 2002) i da se usled salinizacije svake godine za proizvodnju gubi oko 1.5 Mha obradivog zemljišta (Munns i Tester, 2008). Smatra se da bi salinizacija kod obradivih površina mogla imati globalne destruktivne efekte, vodeći ka gubitku 50% ovih površina do sredine 21. veka (Mahajan i Tuteja, 2005), dok se s druge strane svetska populacija povećava velikom brzinom i očekuje se da će do 2050. godine na planeti živeti oko 9 milijardi ljudi (Varshney i sar., 2011).

Nakon zalivanja, voda se ili koristi od strane biljaka ili isparava iz vlažnog zemljišta što je posebno izraženo u toplijim krajevima. Višak soli ostaje u zemljištu i akumulira se u procesu koji se naziva salinizacija (Hasanuzzaman i sar., 2013) (Slika 1.1a). Dodatno, slane podzemne vode takođe mogu doprineti povećanom salinitetu. Prekomernim navodnjavanjem i neefikasnom drenažom zemljišta, podiže se gornja granica slanih podzemnih voda što im omogućava da prodru u više slojeve zemljišta i rizosferu (Hasanuzzaman i sar., 2013) (Slika 1.1b).



**Slika 1.1.** Salinizacija obradivog zemljišta izazvana zalivanjem (a) ili podizanjem gornje granice slanih podzemnih voda (b). (Modifikovano prema Hasanuzzaman i sar., 2013).

Jedan od početnih efekata povišenog saliniteta na biljke jeste inhibicija rasta. Munns (2002b) je razvio model “dvofaznog odgovora na biljaka na stres soli” (Hasanuzzaman i sar., 2013) (Slika 1.2). Prva faza smanjenja rasta je brži proces izazvan povećanjem koncentracija soli u rizosferi i pojavom osmotskog stresa, dok je druga faza je značajno sporija i posledica je jonskog disbalansa u ćelijama, akumulacije jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u listovima i njihovog toksičnog efekta (jonski stres).

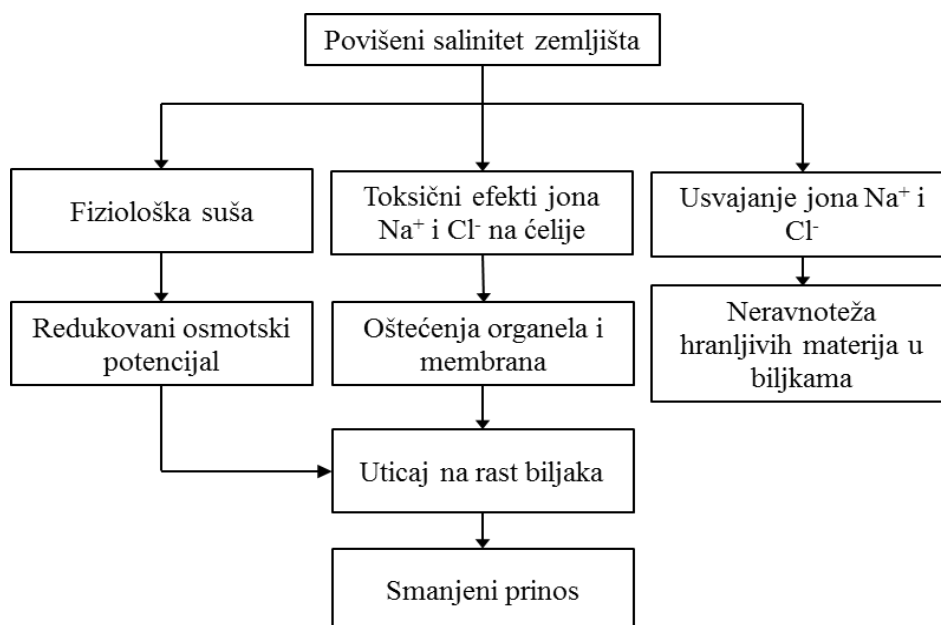


**Slika 1.2.** Efekat stresa soli na rast osetljivih biljaka (Modifikovano prema Hasanuzzaman i sar., 2013).

Visoka koncentracija soli u zemljištu smanjuje vodni potencijal zemljišta usled čega biljke ne mogu da usvajaju vodu iz podloge, s jedne strane, dok pokazuju tendenciju gubitka vode usled pojačane transpiracije, s druge strane. Da bi preživele u uslovima osmotskog stresa biljke moraju ograničiti gubitak vode regulišući transpiraciju i prilagođavajući sopstveni osmotski potencijal. U cilju sprečavanja gubitka vode tokom transpiracije u uslovima vodnog deficita biljke zatvaraju stome (Hsiao, 1973; Taiz i Zeiger, 2002). Zatvaranje stoma rezultira smanjenom količinom dostupnog  $\text{CO}_2$  što za posledicu ima smanjenje intenziteta fotosinteze u uslovima stresa (Brugnoli i Bjorkman, 1992).

Dugotrajno izlaganje stresu soli dovodi biljke u stanje jonskog stresa koji nastaje usled povećane akumulacije soli u biljci i ispoljavanja njihovih toksičnih efekata. Toksičnost  $\text{Na}^+$  se ogleda u tome što ometa preuzimanje  $\text{K}^+$  i regulaciju otvaranja stoma, rezultirajući gubitkom vode i nekrozom. S druge strane,  $\text{Cl}^-$  izaziva hlorozu listova smanjujući sintezu hlorofila (Hasanuzzaman i sar., 2013). Izlaganje biljaka

povećanom salinitetu dovodi do značajnog opadanja sadržaja hlorofila i karotenoida (Saha i sar., 2010; Chutipaijit i sar., 2011). Smanjenje fotosintetičke površine zbog propadanja listova izazvanog toksičnim delovanjem  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  i smanjena biosinteza fotosintetičkih pigmenata dovode do smanjenja intenziteta fotosinteze i posledično do smanjenja prinosa (Evelin i sar., 2009) (Slika 1.3). Brojna istraživanja su pokazala da povećan salinitet zemljišta redukuje akumulaciju azota (N) u biljkama. Smanjeno usvajanje N se dešava usled interakcije između  $\text{Na}^+$  i  $\text{NH}_4^+$  i/ili između  $\text{Cl}^-$  i  $\text{NO}_3^-$  što dovodi do redukcije rasta i prinosa kultura (Rozeff, 1995).

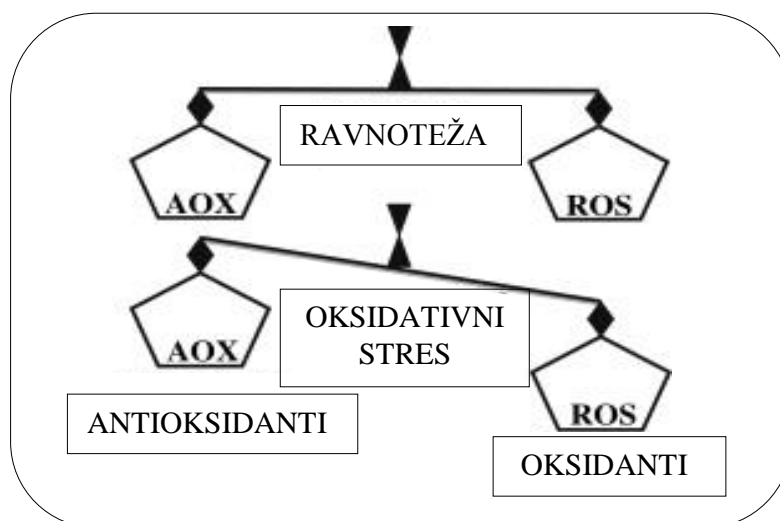


**Slika 1.3.** Efekat stresa soli na biljke (Modifikovano prema Evelin i sar., 2009).

Biljke razvijaju različite mehanizme da bi se oduprele povišenom salinitetu. U tom procesu osmotskog prilagođavanja dolazi do izbacivanja soli, akumulacije toksičnih jona u različitim tkivnim kompartmentima, vakuolama ili starim listovima (Munns, 1993; Yeo, 1998) i sinteze osmolita (Ashraf, 1994, Mahajan i Tuteja, 2005) čime se snižava osmotski potencijal i omogućava usvajanje vode. Osmoliti (prolin, šećeri, glicinbetain) su hidrofилna jedinjenja koja deluju kao osmoprotektanti i šaperoni male molekulske mase (Rhodes i sar., 1986; Hare i Cress, 1997; Verbruggen i Hermans, 2008; Szabados i Savoure, 2010). Nivo osmolita je određen ravnotežom između njihove sinteze i razgradnje (Szabados i Savoure, 2010). Pod uslovima stresa stimuliše se njihova sinteza, a nakon što prođe dejstvo stresogenog faktora u fazi oporavka dolazi do pojačane razgradnje i korišćenja ovih jedinjenja kao izvora ugljenika i azota.

### 1.1.1. Oksidativni stres

Pored osmotskog i jonskog stresa, kao posledica povišenog saliniteta javlja se i sekundarni oksidativni stres usled produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS – eng. *Reactive Oxygen Species*) kao što su superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ ) i singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) (Parida i Das, 2005; Ahmad i Sharma, 2008; Ahmad i sar., 2010a, 2011). ROS su neizbežni produkti aerobnog metabolizma (Asada i Takahashi, 1987) i nastaju tokom procesa fotosinteze i respiracije. U normalnim uslovima postoji balans između produkcije i uklanjanja ROS, tako da se njihova koncentracija održava na niskom nivou. Međutim u uslovima stresa dolazi do disbalansa u brzini formiranja i razgradnje ROS, produkcija ROS nadmašuje odbrambene antioksidativne kapacitete i kada njihova koncentracija prevaziđe fiziološki prihvatljiv nivo, smatra se da je ćelija u stanju oksidativnog stresa (Gill i Tuteja, 2010) (Slika 1.4).



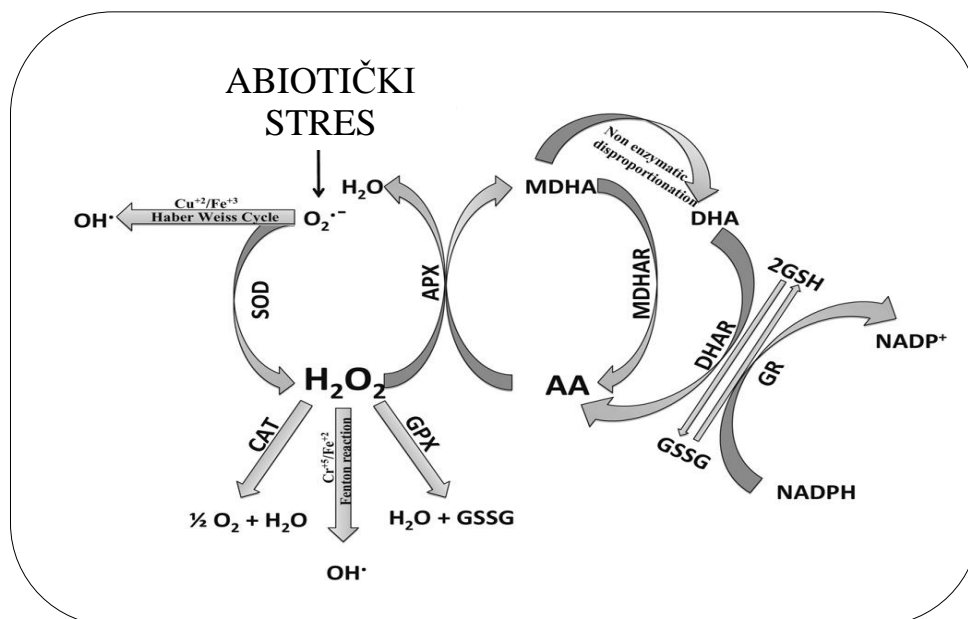
**Slika 1.4.** Odnos između oksidativnih i antioksidativnih procesa u uslovima odsustva i prisustva stresa (Modifikovano prema Gill i Tuteja, 2010).

Prekomerna akumulacija ROS vodi ka ćelijskoj smrti (Asada i Takahashi, 1987; Niu i sar., 1995; Hammond-Kosack i Jones, 1996; Yeo, 1998; Asada, 1999; Glenn i sar., 1999; Dat i sar., 2000) usled oksidativnih procesa kao što su peroksidacija lipida, oksidacija proteina, inhibicija enzima i oštećenja DNK i RNK (Flowers i sar., 1977; Greenway i Munns, 1980; Pastori i Foyer, 2002; Apel i Hirt, 2004; Ahmad i sar., 2010a,b; Turan i Tripathy, 2012). Najčešće ispitivane posledice delovanja ROS jesu

strukturna i funkcionalna oštećenja ćelijskih membrana koja nastaju usled lipidne peroksidacije (Boguszewska i Zagdanska, 2012).

Niske i umerene koncentracije  $H_2O_2$ , koje nastaju normalno tokom metaboličke aktivnosti ćelije, imaju značajnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima: regulaciji signalnih puteva unutar ćelije i između ćelija, regulaciji genske ekspresije, ćelijskog ciklusa i PCD. Jedna od bitnih uloga  $H_2O_2$ , do čije produkcije dolazi ubrzo po percepciji signala (Wojtaszek, 1997; Foyer i Noctor, 2005), jeste da u ćelijama deluju kao signalni molekuli (Apel i Hirt, 2004; Foyer i Noctor, 2005; Hancock i sar., 2006; Meng i sar., 2010; Spoel i Loake, 2011) koji aktiviraju odgovarajuće odbrambene mehanizame (Desikin i sar., 2001; Knight i Knight, 2001). Dodatno, produkcija  $H_2O_2$  može potpomoći međućelijsku komunikaciju pojačavajući signal kroz RBOHD (eng. *Respiratory Burst Oxidase Homologue D*), može delovati kao sekundarni glasnik modifikujući strukturu proteina i aktivirajući gene koji učestvuju u odbrani od stresa (Spoel i sar., 2010; Spoel i Loake, 2011). Dokazano je da je najmanje 80 gena kod biljaka indukovano reaktivnim kiseoničnim vrstama (Vranová i sar., 2002; Apel i Hirt, 2004). Stoga se ROS mogu razmatrati i kao ćelijski indikatori stresa i kao sekundarni glasnici uključeni u stres signalne puteve.

Kako bi smanjile ili sprečile oštećenja koja ROS uzrokuju, biljke su razvile funkcionalan antioksidativni mehanizam koji čine antioksidativni enzimi (npr. superoksid dismutaze, katalaze, peroksidaze), neenzimatski antioksidansi (npr. glutation, askorbinska kiselina, karotenoidi) (Bhattacharjee, 2005; Gill i Tuteja, 2010) kao i enzimi koji učestvuju sintezi i regeneraciji neenzimskih komponenti, tj. niskomolekulskih antioksidanata (glutation reduktaze, monodehidroaskorbat reduktaze i dehidroaskorbat reduktaze) (Jimenez i sar., 2002) (Slika 1.5). Jedan od mehanizama povećanja tolerancije prema stresu jeste i aktivacija antioksidativnog sistema i ekspresije odbrambenih gena (Bohnert i Shevela, 1998).



**Slika 1.5.** Antioksidativni odbrambeni mehanizmi kod biljaka. SOD - superoksid dismutaze, CAT - katalaze, APX - askorbat peroksidaze, MDHAR - monodehidroaskorbat reduktaze, DHAR - dehidroaskorbat reduktaze, GR - glutation reduktaze, AA – askorbinska kiselina, DHA – dehidroaskorbat, GSH – redukovani glutation, GSSG – oksidovani glutation, MDHA – monodehidro askorbat, NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (Modifikovano prema Gill i Tuteja, 2010).

Superoxid dismutaze (SOD) su metaloproteini koji predstavljaju prvu liniju odbrane biljke od toksičnog efekta povišenih nivoa ROS i najefikasniji enzimatski antioksidans koji uklanja  $O_2^{\bullet-}$  prevodeći ga u  $H_2O_2$ :  $2 O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . (Gill i Tuteja, 2010). Proces dismutacije se zasniva na istovremenoj oksidaciji jednog radikala i redukciji drugog (Michalski, 1996). Nastali  $H_2O_2$  se zatim uklanja delovanjem katalaza (CAT) i peroksidaza (APX – askorbat peroksidaza i GSX – glutation peroksidaza). Za razliku od katalaza, koje direktno katalizuju razgradnju vodonik peroksida do vode i kiseonika:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ , APX i GSX za uklanjanje peroksida katalizuju oksidaciju supstrata (askorbata i glutationa), pri čemu se on prevodi u oksidovani oblik uz oslobađanje vode:  $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$  (Slika 1.5). Askorbat peroksidaza učestvuje u brzom uklanjanju  $H_2O_2$  na mestu njegovog nastanka (Slika 1.5) i ima znatno veći afinitet prema  $H_2O_2$  od katalaze, ali u slučaju kada je redukcija kiseonika ograničena, aktivnost APX je značajno smanjena (Asada, 2006).

Ravnoteža između aktivnosti SOD s jedne strane i APX ili CAT s druge strane je ključna za održavanje stabilnog nivoa superoksidnog radikala i vodonik peroksida unutar ćelija (Bowler i sar., 1991). Ova ravnoteža je bitna za sprečavanje stvaranja



visoko toksičnog hidroksil radikala kroz Haber-Weiss-ovu ili Fentonovu reakciju (Asada i Takahashi, 1987) (Slika 1.5). Različiti afiniteti APX i CAT za  $H_2O_2$  ukazuju da pripadaju različitim klasama enzima: APX je prisutna u skoro svim ćelijskim delovima, ima visok afinitet prema  $H_2O_2$  i odgovorna je za finu modulaciju ROS tokom ćelijske signalizacije, dok su CAT prisutne samo u peroksizomima i učestvuju u uklanjanju viška ROS tokom stresa (Willekens i sar., 1997). Pokazano je da oksidativni stres dovodi do proliferacije peroksizoma (Lopez-Huertas i sar., 2000).

Antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina i glutacion, koji su pronađeni u visokim koncentracijama u hloroplastima i drugim ćelijskim kompartmentima, takođe imaju ulogu u odbrani biljaka od oksidativnog stresa (Noctor i Foyer, 1998). Održavanje visokog odnosa redukovane u odnosu na oksidovanu formu askorbinske kiseline i glutaciona je ključno za adekvatnu razgradnju ROS u ćelijama. Ovaj odnos se održava pomoću glutacion reduktaze (GR), monodehidroaskorbatske reduktaze (MDHAR) i dehidroaskorbatske reduktaze (DHAR) korišćenjem NADPH kao izvora energije za redukciju (Noctor i Foyer, 1998; Asada, 1999) (Slika 1.5). Takođe je pokazano i da odnos redukovanih i oksidativnih formi različitih antioksidanata može služiti kao signal za modulaciju mehanizama za razgradnju ROS (Karpinski i sar., 1997).

Procesi razgradnje ROS su prisutni u svim ćelijskim delovima, ali su hloroplasti, mitohondrije i peroksizomi glavne organele u kojima se nalaze antioksidativni sistemi biljne ćelije. U tilakoidima hloroplasta, superoksidni anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) i vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) se uklanjaju u ciklusu voda–voda (Asada, 1999). ROS forme koje napuštaju tilakoide i/ili nastaju u stromi hloroplasta, uklanjaju se pomoću SOD, kao i u askorbats–glutacionom ciklusu. ROS forme nastale u peroksizomima tokom fotorespiracije, oksidacije masnih kiselina i u drugim reakcijama se uklanjaju pomoću SOD, CAT i APX. SOD i komponente askorbats–glutacionog ciklusa su prisutne u mitohondrijama, u kojima se nalaze i antioksidansi, kao što su glutacion i askorbinska kiselina, koji štite ćeliju od oksidativnih oštećenja (Krasensky i Jonak, 2012).

## **1.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI TOLERANCIJE**

U odgovoru na abiotički stres, na molekularnom nivou, dolazi do transkripcione aktivacije niza gena čija ekspresija treba da obezbedi toleranciju na stres produkujući proteine od vitalnog značaja i regulišući ekspresiju nizvodnih gena (Kavar i sar., 2007).

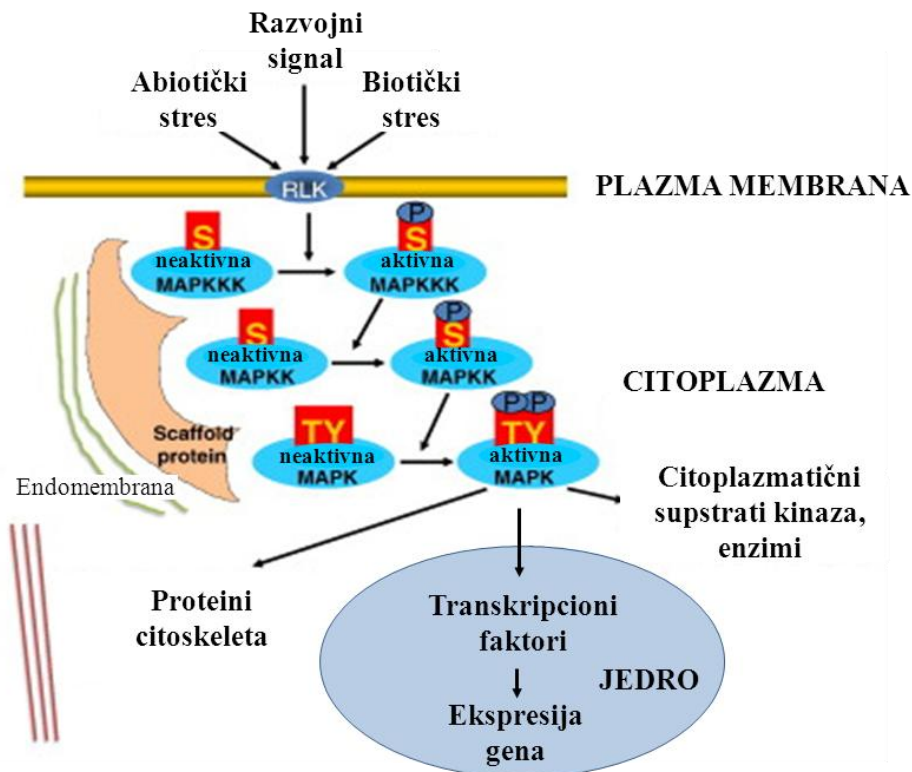
Geni aktivirani stresom mogu biti klasifikovani u dve grupe (Bohnert i sar., 2001; Fowler i Thomashow, 2002; Seki i sar., 2002). Prva grupa predstavlja funkcionalne gene koji kodiraju proteine čija je uloga u zaštiti ćelija od efekata stresa: antioksidativni enzimi, enzimi koji učestvuju u biosintezi antioksidanata i osmolita, inhibitori proteaza i proteini koji štite makromolekule (osmotin, šaperoni, LEA proteini). Drugu grupu gena čine regulatorni geni čiji produkti regulišu transdukciju signala i ekspresiju ostalih gena. Tu pre svega spadaju transkripcioni faktori, proteinske kinaze, fosfataze i proteaze (Seki i sar., 2003; Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

### **1.2.1. Mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK)**

Biljke su, radi preživljavanja, razvile sisteme za brzu detekciju i prepoznavanje promena u okruženju i njihovo prevođenje u adaptivne/odbrambene odgovore. Nakon detekcije i prepoznavanja stresa, odbrambeni mehanizmi biljaka (Andreasson i sar., 2010) aktiviraju kompleksne odbrambene signalne kaskade koje variraju u zavisnosti od tipa stresa (Chinnusamy i sar., 2004; Abou Qamar i sar., 2009). Kod svih eukariota, MAP kinaze su visoko konzervirane i imaju ključnu ulogu u transdukciji signala uključenih u odgovore na stres, ali i regulaciju rasta, diferencijaciju, proliferaciju i ćelijsku smrt (Šamajová i sar., 2013). MAPK učestvuju i u ROS i ABA signalnim putevima doprinoseći tako odbrani biljaka i aklimatizaciji prema obema vrstama stresa i abiotičkom i biotičkom (Lu i sar., 2002; Miura i sar., 2014; Zhou i sar., 2014).

MAP kinaze deluju u okviru tzv. MAPK kaskada koje se sastoje od tri visoko konzervirana enzimska modula: MAP kinaza kinaze kinaze (MAPKKK), MAP kinaza kinaze (MAPKK) i MAP kinaze (MAPK), koje se aktiviraju reverzibilnom fosforilacijom (Hirt, 2000).

MAPK signali mogu biti pokrenuti različitim stimulusima kao što su stres i razvojni signali posredstvom RLK (eng. *Receptor-Like protein Kinase*), a putem specifičnih senzora aktiviraju MAPKKK koja aktivira sledeću kinazu u nizu, MAPKK fosforilacijom dva serinska/treoninska ostatka u okviru konzerviranog S/T-X35-S/T motiva. MAPKK dalje fosforilacijom treoninskog i tirozinskog ostatka u okviru T-X-Y motiva aktiviraju MAPK. Za aktivaciju MAP kinaza je neophodna fosforilacija oba ostatka, i tirozina i treonina, pa stoga fosfataze koje odstranjuju fosfat sa bilo kojeg od ova dva mesta je inaktiviraju (Hirt, 2000; Šamajová, 2013) (Slika 1.6).



**Slika 1.6.** Model subćelijske organizacije mitogenom aktiviranih protein-kinaza (MAPK) i njihovih supstrata. MAPK su organizovane u proteinske komplekse, MAPK module, u okviru kojih ih zajedno drži “*scaffold*” protein. MAPK signali mogu biti pokrenuti različitim stimulusima kao što su stres i razvojni signali posredstvom RLK (eng. *Receptor-Like protein Kinase*). Tokom signalne transdukcije, MAPKKK aktivira MAPKK fosforilacijom serinskih (S) ili treoninskih (T) ostataka, dok MAPK za aktivaciju zahtevaju fosforilaciju i treoninskih (T) i tirozinskih (Y) ostataka. Aktivirane MAPK se oslobađaju iz modula i deluju na različite supstrate (transkripcione faktore, enzime i proteine citoskeleta) koji se nalaze u različitim ćelijskim delovima (jedru, citoplazmi). (Modifikovano prema Šamajová, 2013).

MAPK pripadaju familiji proteinskih serin treonin kinaza koje u zavisnosti od fiziološkog ili biohemijskog stanja MAP kinaze deluju na različite supstrate. Aktivirane MAP kinaze se translociraju u jedro gde kroz regulaciju transkripcionih faktora i/ili drugih proteina uključenih u transkripciju menjaju ekspresiju gena, reprogramiraju program razvoja i/ili dovode do odgovora na stres. MAP kinaze mogu delovati i na proteine citoskeleta kao i na različite regulatorne proteine prisutne u citoplazmi (kinaze, fosfataze i fosfolipaze) (Šamajová, 2013) (Slika 1.6).

Signalnim putevima mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) reguliše se aktivnost velikog broja transkripcionih faktora:

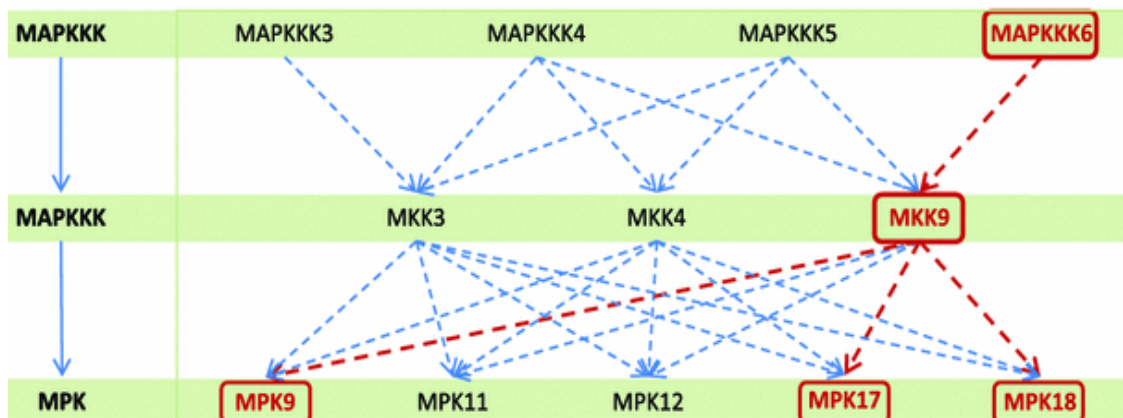
1. CBF/DREB1 proteini (eng. *C-repeat Binding Factor/Dehydration Responsive Element Binding proteins*) su članovi AP2/EREBP (eng. *APetala2/Ethylene-Responsive Element Binding Protein*) familije transkripcionih faktora. Povišena ekspresija ovih transkripcionih faktora kod *Arabidopsis*-a poboljšava toleranciju prema suši, salinitetu i niskim temperaturama, ukazujući na taj način da CBF/DREB1 proteini mogu aktivirati set različitih gena koji učestvuju u odgovoru na stres (Liu i sar., 1998; Kasuga i sar., 1999; Gilmour i sar., 2000, 2004). Biljke sa povišenom ekspresijom CBF/DREB1 akumuliraju veće količine prolina i solubilnih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza i rafinoza) tokom rasta pod normalnim uslovima i tokom aklimatizacije na niske temperature (Gilmour i sar., 2000, 2004; Cook i sar., 2004; Achard i sar., 2008).

2. HSF (eng. *Heat Shock Transcription Factors*) su transkripcioni faktori kodirani od strane velike genske familije sa centralnom ulogom u odgovoru na toplotni stres (von Koskull-Doring i sar., 2007). Kod *Arabidopsis*-a povišena ekspresija HSFA2 vodi akumulaciji osmolita, galaktinola i rafinoze i povećava toleranciju prema različitim vrstama stresa (Nishizawa i sar., 2006, 2008; Ogawa i sar., 2007).

3. NAC familija transkripcionih faktora, specifičnih za biljke, predstavlja jednu od najvećih u biljnom genomu, sa 106 članova kod *A. thaliana* i 149 kod pirinča (Gong i sar., 2004; Xiong i sar., 2005). Transkripcioni faktori iz NAC familije su uključeni u procese razvoja, hormonsku regulaciju i odbranu od stresa (Olsen i sar., 2005; Lata i sar., 2011). Pokazano je da povišena ekspresija OsNAC5, koju indukuju osmotski stres i ABA, dovodi do akumulacije većeg nivoa prolina i solubilnih šećera i povećava toleranciju prema niskim temperaturama, salinitetu i suši (Takasaki i sar., 2010; Song i sar., 2011).

Analize MAPK kaskada kod *Arabidopsis*-a, *Medicago sp.* i duvana su ukazale da komponente MAPK puta mogu funkcionisati u različitim kombinacijama i imati različite funkcije u zavisnosti od biološkog konteksta (Moustafa i sar., 2014) (Slika 1.7). U zavisnosti od stimulusa, određena MAPKKK može interagovati sa različitim MAPKK i na taj način aktivirati više različitih MAPK (Cardinale i sar., 2002). S druge strane, MAPK mogu interagovati sa nizom supstrata i na taj način pokrenuti različite

ćelijske odgovore u zavisnosti od stimulusa. Identifikovano je 48 potencijalnih supstrata MPK3 i 39 supstrata MPK6 kinaze *Arabidopsis*-a (Feilner i sar., 2005).



**Slika 1.7.** Hipotetička MAP kinazna kaskada. Tačkaste strelice ukazuju na potencijalne interakcije između MAP kinaza u odgovorima na abiotički stres. Na osnovu profila genske ekspresije, genske koregulacije i obrasca indukcije glavnim abiotičkim stresovima (suša, salinizacija, temperatura) može biti ispitana i funkcija hipotetičke MAP kinazne kaskade (crvene strelice) u toleranciji biljaka prema abiotičkim stresovima: MAPKKK6→MKK9→MPK9/MPK17/MPK18 (Modifikovano prema Moustafa i sar., 2014).

Specifičnost ćelijskog odgovora na određene ekstracelularne signale, uprkos činjenici o učešću istih elemenata u različitim signalnim putevima, obezbeđuju „scaffold“ proteini tj. proteini koji imaju funkciju organizatora i koji u zavisnosti od specifičnog ekstracelularnog signala organizuju grupu signalnih proteina u komplekse unutar kojih se vrši prenos signala. (Šamajová, 2013) (Slika 1.6).

Kovtun i sar. (2000) su prvi utvrdili funkcionalno postojanje MAPK modula kod biljaka. Oni su dokazali da ANP1 i NPK1, MAPKKK ortolozi iz *Arabidopsis*-a i duvana, posreduju u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transdukciji signala aktivirajući dve *Arabidopsis* stres MAPK, AtMPK3 i AtMPK6. Isti autori su pokazali i da konstitutivno aktivan ANP1 može oponašati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signal i u odsustvu osmotskog stresa. Interesantno je da iako H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, niske temperature i apscisinska kiselina aktiviraju MAPK, AtMPK3, koekspresiju ANP1 pojačava jedino efekat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ovi podaci ukazuju da je AtMPK3 put aktiviran od strane različitih MAPKKK, a da je ANP1 kinaza uključena u signalni put oksidativnog stresa.

Aktivirana kaskada ima dvojnu funkciju u regulaciji genske ekspresije: aktivira ekspresiju stres inducibilnih gena koji učestvuju u odbrani i prilagođavanju biljaka i inhibira auksin inducibilne promotore (*GH3*). Pošto  $H_2O_2$  može aktivirati ANP MAPK kaskadu, Kovtun i sar. (2000) su pretpostavili da oksidativni stres može blokirati aktivnost *GH3* promotora. Činjenica da  $H_2O_2$  može blokirati (zaustaviti) ćelijski ciklus (Reichheld i sar., 1999), dok ga auksin inicira (Walker i Estelle, 1998). MAPK kaskada inhibira aktivnost auksina i ćelijskog ciklusa i na taj način omogućuje preživljavanje biljaka (Kovtun i sar., 2000).

Kasnije genetičke studije su otkrile ulogu MKK7 kinaze *Arabidopsis*-a kao negativnog regulatora polarnog auksinskog transporta (Dai i sar., 2006). MPK12 kinaza *Arabidopsis*-a je takođe identifikovana kao negativni regulator auksinskog signala (Lee i sar., 2009) tako što je utvrđeno da transgene biljke sa redukovanom ekspresijom *MPK12* gena pokazuju pojačanu osetljivost na auksine.

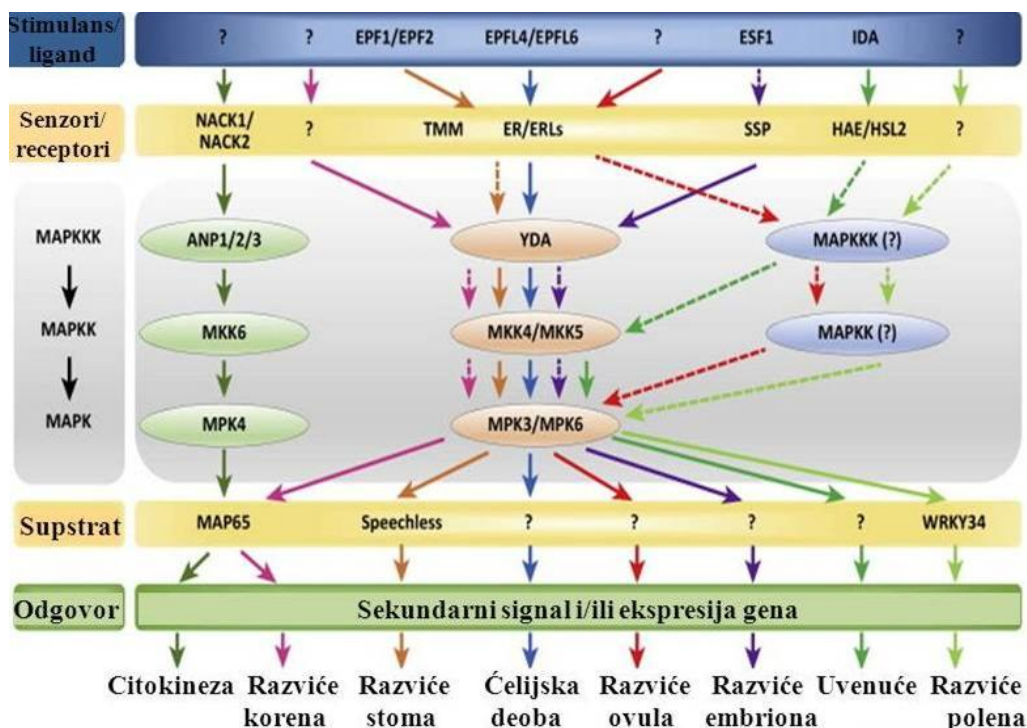
Kod *Arabidopsis*-a je identifikovan signalni put, sastavljen od MEKK1, MKK2 i MPK4/MPK6, koji učestvuje u odgovoru na povećani salinitet i niske temperature (Teige i sar., 2004). Pokazano je da i MKK4 *Arabidopsis*-a posreduje u odgovorima na osmotski stres posredstvom MPK3 (Kim i sar., 2011). Nova MAPKKK, označena kao MKKK20, je identifikovana kao potencijalni regulator osmotskog stresa kod *Arabidopsis*-a kroz aktivaciju MPK6 (Kim i sar., 2012). Transgene biljke sa povećanom ekspresijom MKKK20 pokazuju povećanu toleranciju prema osmotskom stresu izazvanog NaCl ili manitolom, što ukazuje na značajnu ulogu MKKK20 u osmotskom prilagođavanju i toleranciji prema stresu (Kim i sar., 2012). Interesantno je da u uslovima osmotskog stresa, MPK20 *Arabidopsis*-a se indukuje po istom obrascu kao i prolin dehidrogenaza (ProDH) (Moustafa i sar., 2008), što ukazuje na to da MPK20 i ProDH interaguju međusobno i da su deo funkcionalnog hipoosmotskog signalnog puta.

Novija istraživanja su ukazala na pozitivnu ulogu MAPK signala u stres indukovanoj akumulaciji prolina (Kong i sar., 2011a; Zhang i sar., 2011). Pod uticajem uslova sredine brzo se menja i metabolizam ugljenih hidrata. OsCIPK03, OsCIPK12 pirinča i MAPKK kukuruza ZmMKK4, koje podstiču akumulaciju prolina u uslovima stresa takođe stimulišu stresom indukovano povećanje sadržaja šećera (Xiang i sar., 2007; Kong i sar., 2011a).

Kong i sar. (2011b) su izolovali MAPKK kukuruza (*ZmMKK4*) i pokazali da je ekspresija ove kinaze modulirana povećanim salinitetom. Prekomerna ekspresija *ZmMKK4* kod transgenih biljaka duvana rezultirala je pojačanom osmotskom regulacijom.

Na ulogu u regulaciji ćelijske deobe ukazuje različita ekspresija MAP kinaza lucerke i duvana u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa (Calderini i sar., 1998; Bögre i sar., 1999; Nishihama i sar., 2001; Soyano i sar., 2003). Kod *Arabidopsis*-a MAPKKK označene kao ANP2/3 učestvuju u poslednjoj fazi ćelijske deobe, citokinezi (Beck i sar., 2011; Kosetsu i sar., 2010). Takođe su identifikovane i okarakterisane MAPK koje interaguju sa proteinima mikrotubula citoskeleta (Nishihama i sar., 2002; Sasabe i sar., 2006; Smertenko i sar., 2006; Takahashi i sar., 2010). Šta više, neke MAPK kao što su MPK18, MPK6 i MPK4 regulišu i interaguju sa kortikalnim mikrotubulama i tako učestvuju u određivanju oblika ćelije (Walia i sar., 2009; Beck i sar., 2010; Müller i sar., 2010). MPK6 *Arabidopsis*-a je uključena i u regulaciju polarnosti ćelijske deobe tokom postembrionalnog razvoja korena klijanca (Müller i sar., 2010), kao i u regulaciju razvoja antera (Bush i Krysan, 2007).

Razvoj stoma je dobar primer razvojnog regulatornog procesa kontrolisanog putem MAPK kaskada (Xu i Zhang, 2015) (Slika 1.8). Kod *Arabidopsis*-a ova kaskada se sastoji od YODA, MKK4/MKK5 i MPK3/MPK6 (Bergmann i sar., 2004; Wang i sar., 2007; Lampard i sar., 2009). YODA (MAPKKK) reguliše asimetričnu ćelijsku deobu i ima ulogu u ranoj embriogenezi i formiranju stoma (Bergmann i sar., 2004; Lukowitz i sar., 2004), dok nizvodne komponente ove kaskade imaju ulogu u regulaciji funkcionisanja (otvaranje/zatvaranje) stoma (Wang i sar., 2007; Lampard i sar., 2008). Regulacija otvaranja stoma od strane MPK3 je značajan odbrambeni mehanizam koji efikasno sprečava bakterijsku invaziju kroz stome (Gudesblat i sar., 2007). Zigoti, homozigotni za *mpk3 mpk6* mutacije, imaju abnormalne prve ćelijske deobe, fenotip sličan *yda* mutantima, što ukazuje na to da MPK3/MPK6 mogu učestvovati nizvodno od YDA u embriogenezi (Wang i sar., 2007).



**Slika 1.8.** Šema funkcionisanja *Arabidopsis* mitogenom aktivirajućih protein-kinaza (MAPK) MPK3, MPK6 i MPK4 u različitim procesima rasta i razvoja biljaka. U levoj koloni je prikazan tipičan MAPK signalni put nizvodno od receptora/senzora. Nakon aktivacije tkivno/ćelijsko specifičnog signalnog molekula, receptoru slične protein-kinaze (RLK – eng. *Receptor-Like protein Kinase*) aktiviraju MAPK kaskade, direktno ili posredstvom medijatora. Aktivirane MAPK fosforilišu svoje supstrate, što vodi tkivno specifičnoj ćelijskoj deobi ili diferencijaciji regulišući tako rast i razvoj. Strelice sa punim linijama pokazuju interakcije koje su potvrđene genetičkim i/ili biohemijskim dokazima. Komponente specifičnog funkcionalnog puta su povezane strelicama iste boje. Znak pitanja (?) ukazuje na neidentifikovane signalne komponente, usled kojih jedna strelica može predstavljati i višestruke korake (Modifikovano prema Xu i Zhang, 2015).

Pored embriogeneze, MAPK takođe učestvuju i u drugim fazama reprodukcije biljaka (Xu i Zhang, 2015) (Slika 1.8), uključujući razvoj antera (Bush i Krysan, 2007; Hord i sar., 2008), ovula (Wang i sar., 2008), polena (Chaiwongsar i sar., 2006; Zeng i sar., 2011; Guan i sar., 2014) i semena (Duan i sar., 2014; López-Bucio i sar., 2014).

### 1.2.2. *Nicotiana* protein-kinaza 1 (NPK1)

Gen za *Nicotiana* protein-kinazu 1 (*NPK1*), originalno pronađen u biljkama duvana, kodira jednog od članova MAPKKK familije proteina. Katalitički domen *NPK1* specifično aktivira transdukciju signala kod kvasaca, ukazujući da je katalitička fukcija



*NPK1* konzervirana između različitih organizama (Banno i sar., 1993). Na ulogu *NPK1* u deobi ćelija je ukazala činjenica da se *NPK1* kod duvana eksprimira u ćelijama koje se dele, ali ne i u zreom tkivu (Nakashima i sar., 1998). Takođe ekspresija *NPK1* je najveća tokom mitotičke faze ćelijskog ciklusa kada je nivo fosforilisanog, aktivnog *NPK1* proteina najveći (Machida i sar., 1998; Nishihama i sar., 2001).

MAPK kaskada, koja se sastoji od  $NPK1 \rightarrow NQK1 \rightarrow NRK1$  ima ključnu ulogu u citokinezi *Nicotiana tabacum* (Nishihama i sar., 2001; Jin i sar., 2002; Soyano i sar., 2003). *NPK1* se aktivira od strane *NACK1/NACK2*, dva kinezinuslična proteina izolovana iz kvasca, koji ne samo što aktiviraju *NPK1* u ćelijama kvasca već pokazuju i slični transkripcioni obrazac u ćelijama duvana kao i *NPK1*. *NACK1/NACK2* i *NPK1* su lokalizovani u centralnom regionu mitotičkog vretena, što ukazuje na njihovu ulogu u formiranju ćelijske (mitotičke) ploče (Machida i sar., 1998; Nishihama i sar., 2002)

Pokazano je da povećana ekspresija kinaznog domena *NPK1* duvana (konstitutivno aktivna *NPK1* – *caNPK1*) doprinosi toleranciji prema različitim stresnim uslovima sredine (Kovtun i sar., 2000). Kovtun i sar. (2000) su pokazali da transformisane biljke duvana u kojima se eksprimira *caNPK1* preživljavaju povišenu temperaturu (48°C) koja izaziva 100% smrtnost netransformisanih biljaka, da se oporavljaju i rastu brže nakon izlaganja niskim temperaturama (mrazu) i da imaju veću stopu preživljavanja nakon prenošenja na podloge sa povećanim sadržajem soli (300 mM NaCl). Interesantno je da *caNPK1* kod kukuruza može oponašati dejstvo  $H_2O_2$  i indukovati *GST6* i *HSP18.2* promotore i u odsustvu stresa (Kovtun i sar., 1998). *GTS* i *HSP* kodiraju konjugujuće enzime i molekule šaperona koji imaju značajnu ulogu u detoksikaciji i stabilizaciji oštećenih proteina i na taj način učestvuju u oporavku ćelije od stresa (Schöffl i sar., 1998; Marrs, 1996; Morimoto i Santoro, 1998). Ove transformisane biljke su takođe pokazale i povećanu toleranciju prema suši, što može ukazati na povezanost sa potencijalnim zaštitnim mehanizmima za očuvanje fotosintetskog aparata od dehidratacije (Shou i sar., 2004b). Kovtun i sar. (2000) su ispitivanjem nekoliko transgenih linija duvana, koje eksprimiraju različit nivo *caNPK1*, pokazali da je stepen tolerancije prema stresu proporcionalan nivou ekspresije.

U skladu s tim, nizak nivo konstitutivne ekspresije *NPK1* kod kukuruza doveo je do povećane tolerancije transformisanih biljaka prema izmrzavanju (Shou i sar., 2004a). Dodatno, kukuruz u kome se eksprimira *caNPK1*, nakon izlaganja niskim

temperaturama (-5°C) preživljavao je i do 3 sata duže u odnosu na netransformisane biljke i bio je sposoban da izdrži temperature ispod tačke mržnjenja za 1-2 stepena niže nego netransformisane u graduiranom testu mržnjenja (Shou i sar., 2004a). U odsustvu stresa transformisane biljke pokazivale su povećanu ekspresiju stres povezanih gena, sličnu kao u uslovima kratkotrajnog izlaganja niskim temperaturama (Shou i sar., 2004a). *caNPK1* transformisane biljke nakon izlaganja temperaturi od 4°C u trajanju od 48h pokazivale su viši nivo *DREB1*, *EREBP*, *GPX2*, *HSP101*, *Jasmonic acid-inducibile* proteina, *P5CS*, *piruvat dekarboksilaze*, *CCR4*-pridruženog faktora, *GST1*, *HSP83* i *prolin transporter* gena u poređenju sa njihovim null segregantima. Zanimljivo je da je nivo *GST*, *HSP17.8* i *PRI* iRNK bio značajno uvećan u odnosu na nivo u netransformisanim biljkama u odsustvu stresa (Shou i sar., 2004a).

Takođe je pokazana i pozitivna korelacija između tolerancije prema niskim temperaturama i sadržaja solubilnih šećera (glukoze, fruktoze) (Gilmour i sar., 2000; Pontis, 1989), koji funkcionišu kao osmoliti i štite ćeliju od dehidracije izazvane niskom temperaturom (Xin i Browse, 2000).

Mada *caNPK1* inhibira transkripciju nekoliko auksin inducibilnih gena, to ne utiče na razvoj vegetativnih organa kod transgenih biljaka duvana (Kovtun i sar., 2000). U vegetativnoj fazi razvija se kod transgenih biljaka postiže nivo ekspresije isuviše nizak da bi izazvao abnormalni fenotip vegetativnih tkiva. Ipak prekomerna ekspresija *NPK1* kinaznog domena (*caNPK1*) kod duvana vodi linijama koje mogu proizvesti semena sa malom klijavošću usled defekta u embrionalnom razviću i razvoju endosperma, potencijalno zbog smanjene auksin senzitivne ekspresije (Kovtun i sar., 1998). Čini se da ektopična ekspresija *NPK1* može dovesti do akumulacije različitih nivoa *NPK1* proteina i imati različite efekte u zavisnosti od tipa ćelije i stupnja razvika. Odsustvo negativnih efekata na rast u postembrionalnom razvoju ukazuje da se kod *NPK1* transgenih biljaka postiže nivo ekspresije koji je više koristan nego štetan u vegetativnom tkivu. Ovo je velika prednost u odnosu na pojačanu ekspresiju gena za transkripcione faktore ili gena koji kodiraju antioksidativne enzime. a koja utiče na normalan rast i razvoj biljke (Jaglo-Ottosen i sar., 1998; Liu i sar., 1998).

### 1.3. GENETIČKA TRANSFORMACIJA U CILJU POVEĆANJA TOLERANCIJE BILJAKA NA ABIOTIČKI STRES

Za rešavanje problema slanih zemljišta postoje dva pristupa: tehnološki (desalinizacija) i biološki (proizvodnja tolerantih biljaka). S obzirom da su procesi desalinizacije skupi i da dovode do narušavanja životne sredine, mnogi istraživački programi su orjentisani ka biološkim pristupima. Uzimajući u obzir širok spektar pokretača i fizioloških odgovora MAPK kaskade se smatraju značajnim regulatorima genske ekspresije, odbrambenih odgovora, ćelijske deobe i razvića. Stoga su, kako supstrati ovih kaskada (npr. transkripcioni faktori), tako i same komponente kaskada značajni targeti (ciljni molekuli) za biotehnoške pristupe.

Mnoge transformisane biljke sa povećanom tolerancijom prema stresu dobijene su inkorporacijom komponenti MAPK kaskada. Ektopična ekspresija protein-kinaze duvana (MAPKKK/*NPKI*) kod kukuruza vodi aktivaciji oksidativnog signala povećavajući toleranciju prema povišenom salinitetu, visokim i niskim temperaturama (Shou i sar., 2004a). MAPKK kukuruza, *ZmMKK4*, kada je pojačano ekspremirana kod *Arabidopsis*-a doprinosi toleranciji prema povećanom salinitetu i suši (Kong i sar., 2011a). Zhang i sar. (2011) su pokazali da je MAPK pamuka *GhMPK2* indukovana povišenim salinitetom, abscisinskom kiselinom (ABA) i sušom. Njegova pojačana ekspresija kod duvana vodi toleranciji prema povećanom salinitetu i suši.

Znanje o aktivacionim mehanizmima protein-kinaza je ključno za strategiju korišćenja ovih gena u metodama genetičkog inženjerstva. Povećana ekspresija MKK2, koja može uticati i na MPK4 i na MPK6, nema značajnijeg efekta na toleranciju prema stresu, dok ekspresija konstitutivno aktivne forme MKK2, dobijene delecijom regulatornog domena koji se normalno fosforiliše od strane uzvodnog regulatora MEKK1, rezultira ekspresijom nekoliko stres inducibilnih gena i takve transformisane biljke pokazuju povećanu toleranciju prema niskim temperaturama i salinitetu (Teige i sar., 2004).

Konstitutivno aktivan ANP1 (caANP1) indukuje aktivnost AtMPK3 i AtMPK6 koje učestvuju u transdukciji signala kod odgovora na stres i patogene (Machida i sar., 1997; Mizoguchi i sar., 1997; Zhang i Klessig, 1997; Jonak i sar, 1999). Kovtun i sar. (2000) su pokazali da nekoliko različitih vrsta stresa aktivira AtMPK3, a da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> takođe aktivira i AtMPK6. Međutim kada se ektopično eksprimira ceo ANP1 protein,

jedino H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može naknadno da pojača aktivnost AtMPK3, specifično indukujući aktivnost celog ANP1 proteina do nivoa konstitutivno aktivnog ANP1. Indukcija AtMPK3 drugim stimulusima se verovatno dešava putem koji ne podrazumeva ANP1 (Kovtun i sar., 2000).

#### 1.4. POVRTARSKÉ KUPUSNJAČÉ (*Brassica oleracea* L.)

Vrsta *Brassica oleracea* pripada familiji *Brassicaceae* i obuhvata niz gajenih povrtarskih kultura kao što su kupus, karfiol, kelj, brokoli, keleraba.

<b>Klasifikacija:</b> Carstvo	<i>Plantae</i>
Razdeo	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa	<i>Magnoliopsida</i>
Podklasa	<i>Dilleniidae</i>
Red	<i>Capparales</i>
Familija	<i>Brassicaceae</i>
Rod	<i>Brassica</i> L.
Vrsta	<i>Brassica oleracea</i> L.

Zbog povoljnih nutritivnih karakteristika i benefita po ljudsko zdravlje povrtarske kupusnjače se sve intenzivnije gaje u svetu. Po površinama na kojima se gaji povrće u Srbiji, kupusnom povrću koje zauzima površinu od oko 27000 ha godišnje pripada jedno od prvih mesta.

Vrsta *Brassica oleracea* L. odlikuje se raznovrsnošću varijeteta:

1. *Brassica oleracea* L. var. *capitata* forma *alba* i *rubra* – glavičasti kupus beli i crveni
2. *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* – karfiol
3. *Brassica oleracea* L. var. *sabauda* – kelj
4. *Brassica oleracea* L. var. *italica* – brokoli
5. *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* DC. – kelj pupčar
6. *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* – keleraba
7. *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. – lisnati kupus, raštan

Kupusnjače (lisnati kelj, glavičasti kupus, kelj, karfiol, brokoli, kelj pupčar) potiču iz oblasti Mediterana i vode poreklo od divljeg kupusa *Brassica silvestris*, s brojnim sekundarnim centrima porekla po celoj Evropi. Tercijalni centar porekla obuhvata delove Azije (Kinu, Japan i Koreju) odakle potiču tropski tipovi kupusa (pekinški i kineski kupus).

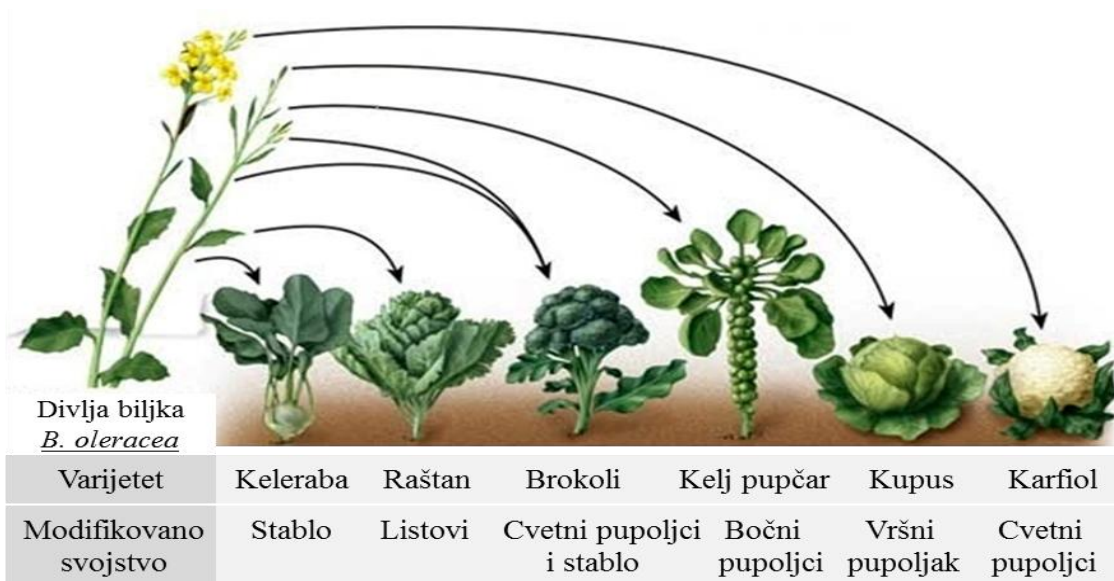
Divlji rodočelnici kupusnjača se i danas mogu sresti na obalama Sredozemnog, Jadranskog i Egejskog mora, kao i na Atlantskoj obali Francuske, jugozapadne Engleske, Irske i na obalama Severnog mora.

Zajedničko za sve kupusnjače jeste da spadaju u dvogodišnje kulture kod kojih se u prvoj godini formira lisna rozeta ili glavica, a u drugoj cvetonosno stablo koje donosi plod i seme (Kružilin i Švedskaja, 1966).

Kupusnjače spadaju među najstarije korišćeno povrće. Zapisi o kupusu su veoma stari. Smatra se da je u ishrani još od perioda između 2000-2500 god. pre nove ere (Chiang i sar., 1993). Na Britanskim ostrvima prvu korišćenu formu kupusnjača raširili su Kelti oko četvrtog veka p.n.e. Stari Kelti su kupus zvali Bresic, pa se smatra da otuda potiče i ime roda *Brassica*, kao i ime familije *Brassicaceae* (Basset, 1986).

Dolaskom na Balkansko poluostrvo u 6. i 7. veku, južni Sloveni su zatekli pojedine forme kupusnjača na novim teritorijama, prihvatili su ih i nastavili da gaje, pa samim tim i dalje oplemenjivali. Francuski istraživač Žak Kartije je 1541. godine u Kanadi prvi posejao seme kupusa doneto iz Evrope. Tokom kolonizacije Severne Amerike, kolonisti iz Severne Evrope, gde je kupus bio uobičajeno povrće, preneli su ga i nastavili da ga gaje. Kupus su prihvatili i Indijanci i počeli da ga gaje u 18. veku. (Basset, 1986).

Ljudi su tokom hiljada godina birali i gajili biljke koje su imale najpoželjnije osobine i tako su se izdiferencirali različiti varijeteti unutar jedne vrste (*Brassica oleracea* L.) (Slika 1.9). Najstarije forme nisu imale glavicu i po izgledu podsećale su na današnje raštane (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC). Diferencijacijom oblika stabla i listova nastao je prvo lisnati kupus (kelj), a daljom diferencijacijom (tokom stotina generacija) i ostale kupusnjače (Slika 1.9).



**Slika 1.9.** Diferencijacija različitih varijeteta unutar vrste *B. oleracea* L. (Slika preuzeta sa sajta <https://sites.google.com/site/selectivebreedingofplants/>).

U ishrani se koriste različiti delovi biljke, list kod kupusa, zadebljalo stablo kod kelerabe, nerazvijena cvast kod karfiola i brokolija. Kupusnjače se odlikuju visokom hranljivom vrednošću i lekovitim svojstvima. Sve kupusnjače imaju malu kalorijsku/energetsku vrednost i visok sadržaj vitamina (C, A, B, PP, K), mineralnih materija (kalijum, sumpor, fosfor, kalcijum, gvožđe, jod, magnezijum), proteina, ugljenih hidrata i masti (Lorenz i Maynard, 1988; Rubatzky i Yamaguchi, 1997). „Vitamin U“ (S-metilmetionin), koji se naziva još i brasicin, a koji je prvi put identifikovan kod kupusa (Cheney, 1950), sprečava pojavu čira na želucu. Proteini kupusa su lako svarljivi i veoma kvalitetni. Bogati su esencijalnim amino kiselinama kao što su arginin, histidin, metioin, triptofan, lizin i dr. Lipotropni faktori kupusa – metionin, holin i betain pomažu rad jetre izvlačeći iz nje masti, pomažući ujedno njihovu razgradnju i korišćenje. Eterična ulja imaju blago baktericidno dejstvo. *Brassica* povrće ima antiinflamatorna i antioksidativna svojstva (Singh i sar., 2006), a usled prisustva određenih fitohemikalija koje pojačavaju dejstvo antioksidativnih enzima imaju i ulogu u sprečavanju formiranja tumora (Keck i Finley, 2004; Sarikamis i sar., 2009). Postoje jasni pokazatelji da glufosinolati kupusnjača blokiraju nastanak tumora i zaustavljaju njegov rast apoptozom (Mithen i sar., 2000). Singh i sar. (2006) su pronašli niz različitih antioksidativnih jedinjenja kod 18 varijeteta kupusa (askorbinska kiselina, lutein,  $\beta$ -karoten, tokoferol).

#### **1.4.1. Karfiol (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)**

Kod karfiola jestivi delovi su cvasti tzv. ruže. Ružu čine cvetne grane čije su drške skraćene i međusobno zbijene. Faza cvetanja započinje time što tkivo ruže razrasta, cvetne grane se izdužuju i formiraju se cvetovi (MacGillivray, 1961). Najčešće je bele boje, ali može biti i narandžaste, zelene i ljubičaste boje. Narandžasti karfiol sadrži 25% više vitamina A u odnosu na beli, dok je ljubičasti bogat antocijaninima.

Od svih kupusnjača najteže je proizvesti karfiol, koji je kao biljka vlažnog, umerenog klimatskog područja osetljiva na faktore izazvane promenom klime. Optimalna temperatura za dobijanje kvalitetnih ruža karfiola je između 14-18°C, dok je optimalna relativna vlažnost vazduha oko 85%. Karfiol je osetljiv prema suši u svim fazama razvoja, tako da su rast i prinos ove kulture znatno umanjeni u uslovima vodnog deficita (Jaleel i sar., 2009). Stoga je, za uspešan razvoj i rast karfiola neophodno obezbediti stalno prisustvo vlage u zemljištu, jer im je korenov sistem plitak i razgranat u površinskom sloju. Intenzivni režim navodnjavanja pri proizvodnji karfiola za logičnu posledicu ima značajno povećanje saliniteta (zaslanjenosti) zemljišta. O njegovoj toleranciji prema povećanom salinitetu nema puno podataka u literaturi, izuzev jednog ranog rada prema kome on spada u grupu umereno tolerantnih kupusnjača (Bernstein, 1959).

Jedan od faktora biotičkog stresa, koji utiče na uspešan rast biljaka i na smanjenje prinosa kod brojnih kultura, pa i kupusnjača, jesu korovi. Između gajenih biljaka i korova se javlja kompeticija za vodu, svetlost, prostor i hranjive materije. Kod karfiola kontrola korova je posebno bitna u prve 3-4 nedelje po iznošenju na polje (Weaver, 1984), dok su starije biljke uspešnije u kompeticiji s korovima, a dodatno, svojim listovima osenčavaju zemljište čime sprečavaju isključavanje semena korova (Dimson, 2001). Nekontrolisani korov, u početnom periodu rasta zasada karfiola, može kasnije redukovati prinose od 37-59% (Govindra i sar., 1983), a ukoliko se kontrola korova ne vrši tokom čitave sezone rasta može doći do smanjenja prinosa ove kulture i do 76% (Qasem, 2007).

Preko 22 miliona tona karfiola i brokolija je proizvedeno u svetu tokom 2013. godine (FAOSTAT, 2015). Vodeći proizvođači su zemlje Azije koje proizvode 81,1% ukupne svetske proizvodnje, a nakon njih su zemlje Evrope sa učešćem u proizvodnji od 11,7%.

## 1.5. OPLEMENJIVANJE VRSTE *B. oleracea* L.

### 1.5.1. Klasične metode oplemenjivanja

Poboljšanje agronomskih i hranljivih osobina postojećih genotipova kupusnjača uglavnom se postizalo metodama klasičnog oplemenjivanja. Ovaj proces je otežan zbog dvogodišnjeg ciklusa biljaka, sporofitne inkompatibilnosti i potrebom za prostornom izolacijom.

*Brassica* vrste su ksenogamne, entomofilne vrste. Mehanizmi stranooplodnje ksenogamije kod kupusa baziraju se na razvijenoj sporofitnoj inkompatibilnosti, koja je pod kontrolom jednog lokusa označenog kao *S* gen. Do sada je determinisano preko 50 alela *S* gena ( $S_1, S_2, S_3, \dots, S_{50}$ ...) koji determinišu inkompatibilnost kod kupusnjača. Ukoliko polen i *stigma* imaju iste gene inkompatibilnosti specifični enzimi ne dozvoljavaju klijanje polenove cevi kroz *stilus*, već se prosto polen odbacuje i uništava. Zbog ksenogamnosti vrste, biljke su najčešće heterozigoti za *S* gen ( $S_1S_3, S_2S_3, S_3S_5$ ). Heterozigotni genotipovi komplikuju proces inkompatibilnosti, jer je proces inkompatibilnosti polena više određen u sporofitnoj nego u gametofitnoj generaciji. U gametofitnoj generaciji, u procesu mejoze kod heterozigota  $S_1S_2$ , formiraju se polenova zrna sa  $S_1$  ili  $S_2$  alelom u proporciji 1:1 i u zavisnosti od toga da li ženski cvet sadrži ili ne ove alele ukrštanje će biti kompatibilno i obratno (Allard, 1999). Za razliku od gametofitne, koja uzima u obzir samo gamete, sporofitna generacija sagledava roditelje kao heterozigote. Ukoliko roditelji imaju zajedničke alele gena inkompatibilnosti polinacija može biti i kompatibilna i inkompatibilna (Chiang i sar., 1993), u zavisnosti od interakcije samih alela (dominantna, kodominantna) što dodatno komplikuje proces oplemenjivanja.

U procesu stvaranja novih sorti i hibrida kupusnjača potrebno je u ukrštanjima, sa jedne strane prevazići probleme autoinkompatibilnosti pri stvaranju inbred linija (potrebno je najmanje sedam generacija inbridinga da bi se dobila homozigotna linija) i sa druge strane iskoristiti prednosti dobijenih linija, homozigotnih za *S* alele. Primenom konvencionalnog oplemenjivanja kod *Brassica* potrebno je od 8 do 10 generacija za dobijanje nove sorte (Dickson i Wallace, 1986).



### **1.5.2. Moderne metode oplemenjivanja**

U pokušaju da se prevaziđu ograničenja u procesu oplemenjivanja kupusnjača, mnogi istraživači kombinuju klasične pristupe sa biotehnološkim. Preduslov za efikasnu primenu i iskorišćenje mnogih biotehnoloških metoda jeste uspostavljanje efikasnog sistema za regeneraciju *in vitro*. Razvoj *in vitro* sistema za regeneraciju omogućava selekciju linija otpornih/tolerantnih prema različitim stresovima, proizvodnju veštačkog semena i genetičku transformaciju.

Kvantitativno i kvalitativno poboljšanje karfiola je postignuto kako klasičnim, tako i biotehnološkim metodama (Bhalla i Smith, 1998; Newell i Burke, 2000; Chrispeels i Sadava, 2003). Kultura biljnih tkiva predstavlja noviji pristup za poboljšanje tolerancije genotipova prema suši, povećanom salinitetu i ekstremnoj temperaturi i omogućava maksimalno iskorišćenje genetičkih potencijala postignutih procesom klasičnog oplemenjivanja (Krasensky i Jonak, 2012). Poboljšana tolerancija prema povišenom salinitetu je postignuta izazivanjem mutacija kod biljaka karfiola *in vitro*, ali je naslednost ovako stečene osobine bila mala (Fuller i sar., 2006). Za stabilnu integraciju i naslednost gena za razvijanje željenih karakteristika i tolerantnost na faktore abiotičkog i biotičkog stresa bolji pristup predstavlja proces genetičke transformacije.

#### **1.5.2.1. Regeneracija biljaka roda *Brassica* putem organogeneze i somatske embriogeneze**

Kultura *in vitro* je tehnika gajenja ćelija, tkiva ili organa, u kontrolisanim i sterilnim uslovima na veštačkoj hranljivoj podlozi definisanog sastava. Prednosti kulture biljnih tkiva i organa kao eksperimentalnog model sistema u odnosu na gajenje biljaka *ex vitro*, je mogućnost gajenja biljaka u kontrolisanim uslovima, eliminaciju patogena, morfološku, fiziološku i genetičku uniformnost biljnog materijala, brzo umnožavanje biljaka tokom cele godine kao i uvođenje novih genetičkih svojstava. Prema dosadašnjim saznanjima, regeneracija biljaka *in vitro* odvija se na tri načina: mikropropagacijom (razmnožavanjem aksilarnih izdanaka), organogenezom (*de novo* formiranje adventivnih organa) 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).

Organogeneza je *de novo* formiranje adventivnih organa. Po načinu postanka organogeneza može biti direktna i indirektna. Kod direktne organogeneze začeci novih organa obrazuju se od ćelija trajnih tkiva koje se dediferenciraju i organizuju kao meristemi. Kod indirektno organogeneze, dediferencirane ćelije se prvo dele obrazujući kalus, a zatim lokalizovani meristemski centri stiču strukturu apikalnog meristema. Regulatori rasteња koji utiču na organogenezu su auksini i citokinini u određenom odnosu.

Protokoli za regeneraciju putem organogeneze razvijeni su kod brojnih vrsta roda *Brassica* (Cardoza i Stewart, 2004). Intenzivnije proučavanje regeneracije pupoljaka i formiranje kulture izdanaka kod *Brassica* datira još od sredine sedamdesetih godina (Bajaj i Nietsch, 1975; Anderson i Carsten, 1977; Kuo i Tsay, 1977). Na regeneraciju pupoljaka utiču tip eksplantata, genotip i sastav hranljive podloge (Khehra i Mathias, 1992; Ovesná i sar., 1993).

Regenerativni potencijal *Brassica* je fenomen prevashodno zavisao od genotipa što je po prvi put zapaženo od strane Murata i Orton (1987). Sparrow i sar. (2004b) su prilikom izučavanja genetičke kontrole regeneracije pupoljaka iz kotiledonih peteljki koristeći dialelno ukrštanje kod *B. napus* i *B. oleracea* zaključili da je regeneracija pupoljaka pod jakom genetičkom kontrolom i da je povezana sa dominantnim i aditivnim genskim efektima odgovornim za većinu varijacija. QTL (eng. *Quantitative Trait Loci*) povezani sa efikasnošću regeneracije pupoljaka kod *Arabidopsis-a* su identifikovani (Lall i sar., 2004), dok je regulacija genske ekspresije tokom razvoja pupoljaka i dalje tema brojnih istraživanja.

U zavisnosti od genotipa, za istu kombinaciju regulatora rasteња i tip eksplantata, efikasnost regeneracije kod različitih *Brassica* može varirati od 0% do 95% (Ono i sar., 1994; Zhang i sar., 1998). S druge strane, neki genotipovi su jednostavno "netolerantni" prema *in vitro* uslovima i nesposobni da regenerišu pupoljke. Netolerantnost prema *in vitro* uslovima je uočena kod nekih pripadnika *B. oleracea* i *B. napus* (Sparrow i sar., 2004a,b, 2006) kod kojih je pokazano da je reč o dominantno naslednoj osobini.

Za regeneraciju *B. oleracea* putem organogeneze kao eksplantati su najčešće korišćeni segmenati klijanaca: kotiledoni (Sparrow, 2004b; Munshi i sar., 2007; Ravanfar i sar., 2009, 2014;), hipokotili (Metz i sar., 1995a; Puddephat i sar., 2001;

Sasaki, 2002; Munshi i sar., 2007; Ravanfar i sar., 2009; Siong i sar., 2012; Qamar i sar., 2014; Gerszberg i sar., 2015) i korenovi (Xu i sar., 1982; Lazzeri i Dunwell, 1986; Yussof i sar., 2012). Kultura izdanaka je pokrenuta i iz drugih eksplantata kao što su segmenti peteljke (Christey i Earle, 1991; Bhalla i de Weerd, 1999; Yussof i sar., 2012), listovi (Bhalla i de Weerd, 1999; Cao i Earle, 2003; Chikkala i sar., 2009; Farzinebrahimi i sar., 2012; Javed i sar., 2012), protoplasti (Vatsya i Bhaskaran, 1982; Delpierre i Boccon-Gibod, 1992; Kik i Zaal, 1993; Kirti i sar., 2001; Kaur i sar., 2006; Chikkala i sar., 2009; Sheng i sar., 2011; Kielkowska i Adamus, 2012). Ipak, delovi kljanaca (kotiledoni i hipokotili) su najčešće korišćeni eksplantati za regeneraciju pupoljaka prilikom genetičke transformacije većine vrsta *Brassica* (Metz i sar., 1995a; Puddephat i sar., 2001).

Somatska embriogeneza je oblik aseksualne reprodukcije iz somatskih ćelija ili mikrospora (Zimmerman, 1993) u kojoj se ove ćelije pod odgovarajućim eksperimentalnim uslovima indukuju da formiraju somatske embrione *in vitro*. Može biti direktna, kada se embrioni razvijaju direktno iz ćelije eksplantata i indirektna kod koje nastajanju embriona prethodi rediferencijacija, intenzivna proliferacija ćelija i formiranje embriogenog kalusa (Williams i Maheswaran, 1986). Ovo ukazuje na to da su u slučaju direktne somatske embriogeneze proembriogeno kompetentne ćelije već prisutne u eksplantatu i ekspresija embriogenog programa zavisi od uslova sredine i minimalnog genskog reprogramiranja, dok je kod indirektno neophodno veliko genetsko reprogramiranje kako bi se stekao embriogeni status (Willemsen i Scheres, 2004).

Potencijal biljne ćelije za somatsku embriogenezu je na prvom mestu određen genotipom (Bowley i sar., 1993; Moltrasio i sar., 2004) i obično je ograničen na određena biljna tkiva u okviru datog genotipa. Embriogeni potencijal je veći u tkivima koja su embriogenog porekla kao što su nezreli embrioni, semena kao i osnove lista monokotila, a opada ka hipokotilu, listovima i korenu (Neumann, 2000). Embriogene ćelije se razvijaju u somatske embrione spontano bez spoljašnjih stimulusa ili uz malu koncentraciju auksina, za razliku od ćelija koje su tu sposobnost izgubile i koje moraju biti indukovane da bi ušle u proces somatske embriogeneze (Sharp i sar., 1980). Proces sticanja embriogene sposobnosti podrazumeva reprogramiranje genske ekspresije u somatskoj ćeliji, kao i promene u morfologiji, fiziologiji i metabolizmu.

Prednosti somatske embriogeneze kao vida *in vitro* regeneracije biljaka u odnosu na organogenezu su: nizak nivo somaklonalnih varijacija, mogućnost dobijanja velikog broja regeneranata, niska frekvencija himeričnih događaja prilikom procesa transformacije (Ahloowalia, 1991; Henry i sar., 1998). Somatska embriogeneza predstavlja i potencijalni model sistema za proučavanje regulacije genske ekspresije, razumevanje fizioloških, biohemijskih i molekularnih bioloških događaja koji se dešavaju tokom razvoja biljnog embriona (Zimmerman, 1993), kao i mehanizama koji vode tranziciji somatske ćelije u embrion (Mordhorst i sar., 2002; Su i sar., 2009).

Somatska embriogeneza može biti održavana dug vremenski period kroz cikluse sekundarne embriogeneze – repetitivna somatska embriogeneza (Raemakers i sar., 1995). Propagacija biljaka kroz proces repetitivne somatske embriogeneze ima praktični značaj jer predstavlja koristan sistem za umnožavanje klonova sa poželjnim karakteristikama, proizvodnju veštačkih semena i genetičku transformaciju (Merkle i sar., 1995). U nekim slučajevima somatski embrioni mogu biti i sačuvani putem krioprezervacije, što daje mogućnost formiranja banaka gena (Sharma, 2005).

Prva saopštenja o somatskoj embriogenezi odnosila su se na rezultate dobijene istraživanjima na šargarepi (*Daucus carota*) (Steward i sar., 1958; Reinert, 1958), dok se tokom poslednjih 50-60 godina indukcija somatske embriogeneze pokazala uspešnom kod mnogih biljnih vrsta (Bajaj, 1995). Kod vrsta roda *Brassica*, a posebno kod *B. oleracea* ovaj, umnogome poželjniji i brži vid regeneracije u odnosu na organogenezu često nije uspostavljen.

Uspešnost somatske embriogeneze umnogome zavisi od izbora eksplantata (Brown i sar., 1995). Najčešći izbor eksplantata za indukciju somatske embriogeneze kod *Brassica* vrsta su bile mikrospore ili antere (Lichter, 1989; Sato i sar., 1989; Aslam i sar., 1990; Baillie i sar., 1992), mada postoje podaci o korišćenju i drugih eksplantata. Kod karfiola su somatski embrioni produkovani iz antera (Phippen i Ockendon, 1990; Yang, 1992), mikrospora (Klíma i sar., 2004; Gu i sar., 2014), indirektno iz kalusa indukovanog na segmentima klijanaca (Deane i sar., 1997; Leroy i sar., 2000; Siong i sar., 2011) i direktno iz hipokotila klijanaca (Siong i sar., 2011). Kod brokolija, *B. oleracea* var. *italica*, embrioni su dobijeni direktno iz korenčića klijanaca (Yang i sar., 2010) i indirektno iz kalusa formiranog na kotiledonima i hipokotilima (Qin i sar., 2007). Kod kupusa somatska embriogeneza je indukovana iz mikrospora (Cristea,

2013). Kod *B. napus* somatski embrioni su regenerisani iz hipokotila (Kohlenbach i sar., 1982), protoplasta (Kranz, 1988), nezrelih kotiledona (Turgut i sar., 1998) i zigotskih embriona (Burbulis i sar., 2007). Takođe su objavljeni podaci o indukciji somatskih embriona iz hipokotila brzo-cikličnog *B. napus-a* na MS podlozi niske pH vrednosti (3,5-5) (Koh i Loh, 2000).

Kao i kod organogeneze, i u slučaju somatske embriogeneze genotip je ključni faktor koji utiče na embriogeni/regenerativni potencijal. Značaj genotipa je pokazan kod *B. rapa* (Baillie i sar., 1992), *B. carinata* (Barro i Martin, 1999) i *B. napus* (Chuong i sar., 1988). Usled toga, regeneracija različitih varijeteta *B. oleracea* ne predstavlja rutinu već obično zahteva dodatnu optimizaciju u smislu izbora tipa polaznog eksplantata, vrste, kombinacije i koncentracije regulatora rastenja.

#### **1.5.2.2. Genetičke transformacije biljne vrste *B. oleracea* L.**

Metode genetičke transformacije omogućavaju prevazilaženje ograničenja klasičnih metoda oplemenjivanja i kreiranje biljaka sa željenim osobinama, pritom, ne menjajući ostale korisne osobine polaznih varijeteta. Za razliku od tradicionalnih metoda selekcije, koje omogućavaju da odabirom roditeljskih linija kod potomstva postizemo postepen napredak kroz generacije u osobinama kao što su prinos i otpornost na nepovoljne uticaje spoljne sredine i patogene, genetičko inženjerstvo omogućava uvođenje korisnih osobina, pod kontrolom jednog ili više gena, u komercijalne biljne vrste na brži i ekonomski isplativiji način. Takođe, u poređenju sa konvencionalnim oplemenjivanjem, genetičko inženjerstvo omogućava kvalitativni iskorak – odabirom gena iz nesrodne vrste i njegovom integracijom u genom biljke možemo dobiti genetičku liniju sa osobinama koje su potpuno nove za datu biljnu vrstu (Hansen i Wright, 1999).

Od kada je pre 30 godina izvršena prva uspešna transformacija biljnih ćelija (Bevan i sar., 1983; Fraley i sar., 1983; Herrera-Estrella i sar., 1983) ova tehnologija je značajno napredovala i danas je u širokoj upotrebi, kako eksperimentalnoj tako i radi dobijanja transgenih biljaka sa komercijalno poželjnim osobinama. Genetičkom manipulacijom povećan je prinos useva usled porasta otpornosti transgenih linija na abiotički stres, štetočine i patogene, a manipulacijom metaboličkih puteva postignuto je povećanje nutritivne ili industrijske vrednosti transgenih biljaka.

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

1. Tehnikama direktnog transfera gena (mikrobombardovanje, mikroinjektiranje, elektroporacija, PEG (polietilen glikol) metoda, itd.)

2. Tehnikama transfera gena posredstvom bioloških vektora - bakterije *Agrobacterium rhizogenes* i *Agrobacterium tumefaciens*.

Metode direktnog transfera DNK su skupe, zahtevaju specijalizovanu opremu i dovode do insercije velikog broja kopija transgena, što za posledicu može imati utišavanje gena (Bhalla i Sing, 2008). U poređenju sa metodama direktnog DNK transfera, transformacija pomoću *A. tumefaciens* je jednostavnija, jeftinija i obično dovodi do insercije jedne ili malog broja kopija transgena (Hiei i sar., 1997) što umanjuje verovatnoću utišavanja gena.

Da bi sistem genetičke transformacije bio efikasan nije dovoljan samo podesan metod za transfer heterologne DNK, već je neophodno razviti i brz i efikasan protokol za regeneraciju biljaka (Zhang i Bhalla, 2004). Sistem za efikasnu transformaciju zahteva tkivo koje je kompetentno za proliferaciju i regeneraciju u biljke *in vitro*. Kulture embriona su posebno pogodne za efikasnu transformaciju jer poseduju veliki broj meristemskih citoplazmom bogatih ćelija koje se aktivno dele i koje obezbeđuju visoku frekvencu integracije transgena (Mahn i sar., 1995). Pored toga, smatra se da ove ćelije lakše prevazilaze stres indukovani transformacijom (Santos i sar., 2002). Embriogene kulture su najčešće korišćene za dobijanje nehimeričnih biljaka (Taylor i Fauquet, 2002; Deo i sar., 2009). Transformisane biljke dobijene u kulturi tkiva mogu pokazivati somaklonalne varijacije usled mutacija indukovanih u toku *in vitro* gajenja, insercijom transgena, plejotropnim efektom transgena ili kombinacijom ovih fenomena (Wilson i sar., 2006). Stoga je potrebno proizvesti veliki broj transgenih linija, koje sadrže isti transgen, od kojih se selektuje nekoliko sa visokom i stabilnom ekspresijom transgena, ali koje su zadržale i superiorna svojstva roditeljske biljke. Efikasni embriogeni sistemi olakšavaju proizvodnju velikog broja transgenih linija, a verovatnoća dobijanja himeričnih biljaka kroz somatsku embriogenezu je izrazito niska.

Transformacija *B. oleracea* je postignuta korišćenjem različitih metoda. Karfiol je transformisan direktnim unošenjem DNK u protoplaste (Mukhopadhyay i sar., 1991; Eimert i Siegemund, 1992; Radchuk i sar., 2002; Nugent i sar., 2006). Transformacija plastida karfiola postignuta je korišćenjem PEG metode (Nugent i sar., 2006).

Transformacija kupusa postignuta je direktnim transferom gena u hloroplaste (Liu i sar., 2008) i plastide (Tseng, 2014).

Najčešće korišćena metoda kod *Brassica* vrsta je transformacija pomoću *Agrobacterium*-a. Za dobijanje transformisanih biljaka korišćeni su i *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* (Puddephat i sar., 1996; Christey i sar., 1997; Pius i Achar, 2000). Istraživanja transformacije *B. oleracea* pomoću *A. rhizogenes* (David i Tempé, 1988; Metz i sar., 1995a; Christey i Sinclair, 1992; Christey i sar., 1997; Henzi i sar., 2000; Cogan i sar., 2001; Puddephat i sar., 2001; Sretenović-Rajičić i sar., 2006) su pokazala da se primenom ovog vektora najčešće dobijaju transformisane biljke izmenjenog fenotipa usled introdukcije i ekspresije *rol* lokusa (Tepfer, 1989), kao i biljke smanjene fertilitnosti (Puddephat i sar., 2001).

Transformacija pomoću *A. tumefaciens* omogućila je dobijanje vijabilnih transgenih biljaka kod mnogih *B. oleracea* varijeteta (Srivastava i sar. 1988; Balla i Smith., 1998; De Block i sar., 1989; Cai sar., 2000; Jin i sar., 2000; Chen i sar., 2001; Cao i Earle, 2003; Rafat i sar, 2010; Yu i sar., 2010; Metwali i sar., 2012; Ting i sar., 2014).

Istraživanja genetičkih faktora koji kontrolišu osetljivost *B. oleracea* prema *A. tumefaciens* tokom *in vitro* regeneracije pupoljaka potvrđuju da potencijal za transformaciju genotipova *B. oleracea* zavisi i od regenerativne sposobnosti i od stepena osetljivosti prema *A. tumefaciens* (Sparrow i sar., 2004b,c). Glavni ograničavajući faktor prilikom transformacije komercijalnih vrsta pomoću *A. tumefaciens* jeste mala efikasnost transformacije. Ne postoji opšti protokol transfera gena u biljni genom. Svaka biljna vrsta i tip biljnog tkiva zahteva optimizaciju niza faktora kako bi se postigla što veća efikasnost transformacije i ekspresije transgena (Opabode, 2006).

Od svih *B. oleracea* varijeteta karfiol (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), koji pokazuje visok kapacitet za regeneraciju *in vitro*, se pokazao kao nepodesan materijal za genetičku transformaciju (Passelegue i Kerlan, 1996; Puddephat i sar., 1996; Metwali, 2006). Mogući razlog je preosetljivost tkiva karfiola prema infekcijama agrobakterijom (Yu i sar., 2010). Istraživanja uslova kulture *in vitro* koji utiču na transfer gena - tip eksplantata, pretretmani, gustina bakterijskih suspenzija, dužina potapanja eksplanta u bakterijske suspenzije, uslovi i trajanje kokultivacije i izbor regulatora rastenja u hranjivim podlogama za regeneraciju - dovela su do razvijanja različitih protokola za

transformaciju karfiola (David i Tempé, 1988; Eimert i Siegemund, 1992; Bhalla i Smith, 1998; Radchuk i sar., 2002; Yu i sar., 2010).

Strategija biotehnologije biljaka je dobijanje biljaka sa povećanom tolerancijom prema abiotičkim i biotičkim stresovima, što posledično rezultira poboljšanim kvalitetom i povećanim prinosom gajenih vrsta. Genetičkom transformacijom *B. oleracea* introdukovano je nekoliko agronomski značajnih osobina kao što su otpornost prema insektima, abiotičkom stresu, herbicidu, odloženo sazrevanje i uvenuće formiranih cvetova/plodova (Tabela 1.1).

Insekti mogu izazvati nepopravljive štete i znatno smanjiti prinos useva karfiola i ostalih kupusnjača. Kloniranje insekticidnih gena vrste *Bacillus thuringiensis* (*Bt cry* geni), njihov transfer i ekspresija u biljkama koja rezultira produkcijom endotoksičnog kristalnog proteina je opšte prihvaćena strategija razvijanja otpornosti prema ciljnom insektu. Ekspresijom nekoliko različitih *Bt cry* gena postignuta je otpornost prema kupusnom moljcu (*Plutella xylostella*). Ovaj gen je uveden u genotipove karfiola (Christey i sar., 1997; Cai i sar., 2000; Chakrabarty i sar., 2002). Otpornost prema leptiru kupusaru (*Piers rapae*) je postignuta introdukcijom i ekspresijom gena *CpTI* kod karfiola (Lingling i sar., 2005). Pored pozitivnog efekta na prinos, razvoj otpornosti prema insektima smanjuje i upotrebu štetnih insekticida.

Tolerancija prema abiotičkom stresu kod karfiola postignuta je uvođenjem gena koji kodiraju antioksidativne enzime (AOX i SOD) (Metwali i sar., 2012).

Značajna osobina je i otpornost prema herbicidima. Između gajenih kultura i korova se javlja kompeticija za vodu, svetlost, prostor i hranljive materije, tako da je držanje pod kontrolom ovog biotičkog stresa značajno za ostvarivanje dobrog prinosa. Kontrola korova u usevima karfiola je posebno bitna u prvih 3-4 nedelje po iznošenju na polje (Weaver, 1984). Primer otpornosti prema herbicidu je otpornost prema fosfinotricinu (PPT) kod karfiola (De Block i sar., 1989) koja je postignuta ekspresijom *bar* gena (eng. *bialaphos resistance gene*) iz *Streptomyces hygroscopicus*-a.



**Tabela 1.1.** Genetičke transformacije varijeteta vrste *B. oleracea* introdukcijom gena za agronomski značajne osobine.

Varijetet	Osobina	Gen	Referenca
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Odloženo sazrevanje	Antisense <i>ACC</i>	David i Tempé (1988) Srivastava i sar. (1988)
	Otpornost prema herbicidu (fosfinotricinu)	<i>bar</i>	De Block i sar. (1989)
	Otpornost prema insektima ( <i>Plutella xylostella</i> )	<i>Bt cryIA(c)</i>	Christey i sar. (1997) Cai i sar. (2000)
		<i>Bt cry</i>	Chakrabarty i sar. (2002) Ray i sar. (2012)
	Otpornost prema insektima ( <i>Pieris rapae</i> )	<i>CpTI</i>	Lingling i sar. (2005)
Tolerancija prema abiotičkom stresu	<i>APX</i> i <i>SOD</i>	Metwali i sar. (2012)	
<i>B. oleracea</i> var. <i>italic</i>	Otpornost prema insektima ( <i>Plutella xylostella</i> )	<i>Bt cryIA(c)</i>	Hosoki i sar. (1991) Metz i sar. (1995a,b) Christey i sar. (1997) Cao i Tang (1999) Cao i Earle (2003)
		<i>Bt cryIC</i>	Zhao i sar. (2000)
	Odloženo sazrevanje	Antisense <i>ACC</i>	Henzi i sar. (1998,1999)
	Odloženo uvenuće cvasti	<i>Ipt</i>	Chen i sar. (2001) Chan i sar. (2009) Ting i sar. (2014)
	Otpornost prema herbicidu (fosfinotricinu)	<i>bar</i>	Waterer i sar. (2000)
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Otpornost prema insektima ( <i>Plutella xylostella</i> )	<i>Bt cryIA(c)</i>	Bai i sar. (1993) Metz i sar. (1995a) Christey i sar. (1997)
		<i>Bt cryIA(b)</i>	Bhattacharya i sar. (2002)
	Otpornost prema insektima ( <i>Plutella xylostella</i> )	<i>Bt Cry1Ba3</i>	Jin i sar. (2000) Yi i sar. (2011)
		<i>cry1B-cry1Ab</i>	Anderson i sar. (2005)
		<i>Bt cry1Ab</i>	Liu i sar. (2008)
Otpornost prema insektima ( <i>Pieris rapae</i> )	<i>CpTI</i>	Fang i sar. (1997)	
Tolerancija prema stresu	<i>betA</i>	Bhattacharya i sar. (2004)	
Tolerancija prema stresu	<i>AtHSP101</i>	Rafat i sar. (2010)	
Otpornost prema herbicidu (fosfinotricinu)	<i>bar</i>	Sretenović-Rajičić i sar. (2006)	
<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	Otpornost prema herbicidu (fosfinotricinu)	<i>bar</i>	Sretenović-Rajičić i sar. (2004; 2006)

## 2. CILJEVI RADA

Naučni cilj ove doktorske disertacije je bio inkorporacija *NPKI* gena u genom biljaka karfiola pomoću *A. tumefaciens* EHA101(pSHX004) i regeneracija transformisanih biljaka u cilju dobijanja linija sa razvijenom tolerancijom na povišene koncentracije NaCl i totalni herbicid BASTA<sup>®</sup>.

U skladu sa tim postavljeno je nekoliko ciljeva:

- Uspostavljanje efikasnog sistema za *in vitro* regeneraciju karfiola i još tri varijeteta *B. oleracea* (kupusa, kelja i brokolija) putem organogeneze i somatske embriogeneze
- Genetička transformacija biljaka karfiola pomoću *A. tumefaciens* EHA101(pSHX004) koji nosi *NPKI* gen duvana (za razvijanje tolerancije na stres) i *bar* gen (za otpornost na totalni herbicid BASTA<sup>®</sup>). Dokazivanje integracije i ekspresije transgena kod transformisanih linija.
- Praćenje morfoloških i biohemijskih parametara transformisanih linija karfiola u uslovima povišenih koncentracija NaCl *in vitro*.
- Ispitivanje uticaja herbicida BASTA<sup>®</sup> na rast i rziće transfrmisanih linija karfiola *in vitro* i *ex vitro*.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. USPOSTAVLJANJE PROTOKOLA ZA REGENERACIJU VIŠE VARIJETETA VRSTE *B. oleracea* PUTEM ORGANOGENEZE**

##### **3.1.1. Biljni materijal korišćen za organogenezu**

Četiri varijeteta *B. oleracea* su korišćena za uspostavljanje *in vitro* kulture putem organogeneze iz segmenta klijanaca kupusnog povrća: kupus - crveni i beli (*B. oleracea* var. *capitata* subvar. *rubra* cv. Rubin i *B. oleracea* var. *capitata* subvar. *alba* (linija K7-L), karfiol (*B. oleracea* var. *botrytis*, cv. Raša), kelj (*B. oleracea* var. *sabauda*, cv. Vertus) i brokoli (*B. oleracea* var. *italica*, cv. Korvet). Kupusi – sorta Rubin i linija K7-L, kao i sorta karfiola Raša su selekcionisani u Institutu za povrtarstvo u Smederevskoj Palanci, dok su u slučaju kelja i brokolija korišćene slobodne sorte Vertus i Korvet.

##### **3.1.2. Hranljiva podloga za indukciju organogeneze**

Bazalna hranljiva podloga (MS podloga) je sadržala mineralni rastvor i vitamine po Murashige i Skoog-u (1962) čiji je sastav prikazan u Tabeli 3.1. Pored MS mineralnog rastvora i vitamina, MS podloge su sadržale i 0,01% inozitol (w/v), 2% saharozu (w/v) i 0,7% (w/v) agar (Instiut za virusologiju, Torlak, Beograd) (Tabela 3.1). pH podloge je pomoću 1N NaOH podešavan na 5,8 pre autoklaviranja na 117°C u trajanju od 25 minuta.

##### **3.1.3. Uslovi gajenja kultura *in vitro***

Sve kulture su gajene u komori za rast biljaka na temperaturi od  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  i pri svetlosnom režimu dugog dana (16h dan, 8h noć). Kao izvor svetlosti su korišćene fluorescentne sijalice bele svetlosti (Philips, SAD). Gustina svetlosnog fluksa je iznosila  $\approx 45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Temperatura je održavana uz pomoć klima uređaja (Galanz).

**Tabela 3.1.** Sastav MS hranljive podloge (Murashige i Skoog, 1962).

<b>Makro elementi</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>	<b>Vitamini</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	B1	0,1
KNO <sub>3</sub>	1900	B6	0,5
CaCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	440	Nikotinska kiselina	0,5
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370	Glicin	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	<b>Kompleks gvožđa</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>
<b>Mikro elementi</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>	NaEDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,2
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,60	<b>Organske komponente</b>	<b>g l<sup>-1</sup></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	Inozitol	0,1
KJ	0,83	Saharoza	20,0
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	Agar	7,0
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025		
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025		
		<b>pH 5.8</b>	

### 3.1.4. Sterilno isključivanje semena

Semena kupusnjača su prvo isprana mućkanjem 1 min u 70% etanolu kome je dodata kap deterdženta (Fairy, Procter & Gamble) nakon čega su ispirana česmenskom vodom, a zatim površinski sterilisana 20 min u 20% rastvoru varikine (komercijani izbeljivač koji sadrži 4% NaOCl) u laminarnoj komori uz povremeno mućkanje. Nakon sterilizacije semena su ispirana 5 puta sterilnom destilovanom vodom, osušena na sterilnom filter papiru i postavljena u plastične sterilne Petri kutije prečnika 90 mm u koje je razlivano po 20 ml MS podloge.

### 3.1.5. Regeneracija pupoljaka

Kao eksplantati korišćeni su segmenti kotiledona, hipokotila i korenova 7 dana starih klijanaca, koji su postavljeni na regenerativnu MS podlogu koja je sadržala N<sup>6</sup>-benziladenin (BA) ili 6-furfurilaminopurin (kinetin, KIN) u koncentraciji 0,5 i 1 mg l<sup>-1</sup> u kombinaciji sa 0, 0,1 i 0,2 mg l<sup>-1</sup> indol-3-buterne kiseline (IBA).

Nakon četiri nedelje gajenja na regenerativnoj podlozi kod različitih varijeteta *B. oleracea* ispitivan je uticaj tipa eksplantata i regulatora rastjenja na: frekvencu regeneracije (RF = broj eksplantata sa regeneracijom nakon 4 nedelje

kultivisanja/ukupan broj eksplantata), srednji broj pupoljaka po eksplantatu ( $SBP =$  ukupan broj regenerisanih pupoljaka/broj eksplantata sa regeneracijom), kao i na indeks kapaciteta za regeneraciju ( $IR = RF \times SBP/100$ ) koji objedinjuje RF i SBP. Za svaki tretman su postavljene po 2 Petri kutije sa po 11 kotiledona ( $n=22$ ), 15 hipokotila ( $n=30$ ) ili 18 segmenata korenova ( $n= 36$ ).

### **3.1.6. Umnožavanje pupoljaka**

Regenerisani pupoljci su radi umnožavanja prebacivani u Erlenmajer boce od 100 ml sa 40 ml MS podlogu za umnožavanje koja je sadržala BA ili KIN u koncentraciji od 0 i 1 mg l<sup>-1</sup>, samostalno ili u kombinaciji sa 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA. Nakon četiri nedelje gajenja na svakoj od podloga za umnožavanje utvrđivan je broj novoformiranih pupoljaka i izračunavan indeks multiplikacije (IM) = broj novoformiranih pupoljaka/početni broj eksplantata. Za svaki tretman su postavljene 3 boce sa po 10 pupoljaka ( $n=30$ ).

Pasažiranja na sveže podloge su vršena u intervalima od četiri nedelje radi dobijanja dovoljne količine materijala za dalja istraživanja.

### **3.1.7. Ožiljavanje i aklimatizacija *in vitro* regenerisanih biljaka**

Radi ožiljavanja, pojedinačno izolovani *in vitro* izdanci visine oko 3 cm su prenošeni na bazalnu MS podlogu ili na MS podlogu sa dodatkom IBA u koncentraciji 1, 2 ili 4 mg l<sup>-1</sup> i gajeni 3 nedelje. U spomenutim podlogama ispitivan je uticaj koncentracije saharoze (2 i 4%) na proces ožiljavanja. Ogledi ožiljavanja su vršeni u epruvetama dijametra 25 mm sa 20 ml podloge. Za svaki tretman su postavljena 2 ponavljanja sa po 10 izdanaka ( $n=20$ ).

Ožiljene *in vitro* biljke dužine oko 5 cm, sa 3-5 razvijenih listova, su izvađene iz podloge, ispirane česmenskom vodom i prebacivane u saksije sa sterilnim supstratom (*Floradur B Pot Medium-Coarse*, Floragard) koji je sadržao: 70% nemačkog belog treseta, 30% nemačkog crnog treseta, kreč, makro i mikro elemente (Mg, B, Cu, Mn, Mo, Fe i Zn) i okvašivač, radi aklimatizacije. Biljke su uzgajane u fitokomori na temperaturi od 21±2°C i na režimu dugog dana (16h dan, 8h noć) u trajanju od 4-6 nedelja. Vlažnost je održavana pokrivanjem zasađenih biljaka prozirnom plastičnom

folijom. Nakon 4 nedelje aklimatizovane biljke su prebacivane u staklenik gde su zasađene u zemljište na rastojanju 50 x 60 cm i gajene do tehnološke zrelosti.

### **3.2. SOMATSKA EMBRIOGENEZA IZ NEZRELIH ZIGOTSKIH EMBRIONA**

#### **3.2.1. Biljni materijal korišćen za uspostavljanje somatske embriogeneze**

Kao polazni materijal za indukciju somatske embriogeneze korišćena su semena dva varijeteta *B. oleracea*: belog kupusa (*B. oleracea* var. *capitata*, linija K7-L) i karfiola (*B. oleracea* var. *botrytis* cv. Raša) koji su selekcionisani u Institutu za povrtarstvo u Smederevskoj Palanci.

Semena kupusa su posejana u leje plastenika sredinom juna 2009. godine u cilju dobijanja materinskih biljaka čija će se nezrela semena koristiti kao eksplantati za indukciju SE. Nakon mesec dana rasad je presađen na otvoreno polje gde su se formirale glavice. U drugoj polovini oktobra kompletne glavice kupusa su prebačene u plastenik radi vernalizacije gde su i procvetale početkom aprila 2010. godine.

Sejanje semena karfiola je izvršeno u septembru 2009. godine u kontejnere koji su držani u plasteniku. U drugoj polovini oktobra rasad je presađen u zemljišno polje plastenika radi vernalizacije biljaka.

Sve procvetale biljke su držane pod platnenim izolatorima radi sprečavanja međusobnog oprašivanja, a ukrštanja između dve procvetale biljke istog varijeteta su vršena ručno krajem aprila i početkom maja 2010. godine.

Nezrele ljuske sa nezrelim semenima su uzimane sa biljaka tokom maja 2010. godine. One su površinski sterilisane 20 minuta u 20% varikini (komercijalni izbeljivač koji sadrži 4% NaClO), nakon čega su tri puta ispirane sterilnom destilovanom vodom i držane na 4°C u frižideru najmanje 12 h. Ljuske su otvarane u sterilnim uslovima laminarne komore i nezreli zigotski embrioni su izolovani iz semena pod binokularnim stereomikroskopom. Zigotski embrioni koji su na osnovu veličine podeljeni u tri grupe: rane kotiledonarne (RK) dužine 1,5 mm, kotiledonarne (K) dužin 1,8 mm i kasne kotiledonarne (KK) dužine 3,0 mm, korišćeni su za indukciju somatske embriogeneze.

### 3.2.2. Hranljive podloge za indukciju somatske embriogeneze

Hranljiva podloga za indukciju somatske embriogeneze je sadržala B5 mineralni rastvor i vitamine (Gamborg i sar., 1968), 0,01% (w/v) inozitol, 2% (w/v) saharozu i 0,3% (w/v) Gerlit<sup>®</sup> gela (Sigma) (Tabela 3.2). Ova podloga je bila bez regulatora rastenja (B5-0) ili je sadržala 2,4-dihlorfenoksisirćetnu kiselinu (2,4-D) u koncentraciji od 1,0 mg l<sup>-1</sup> (B5-D). pH podloge je pomoću 1N NaOH podešavana na 5,8 pre autoklaviranja na 117°C u trajanju od 25 minuta.

**Tabela 3.2.** Komponente osnovne B5 hranljive podloge (Gamborg i sar., 1968).

<b>Makro elementi</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>	<b>Vitamini</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>
KNO <sub>3</sub>	2500	B1	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	B6	1,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	246	Nikotinska kiselina	1,0
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	150		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	170		
		<b>Kompleks gvožđa</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>
<b>Mikro elementi</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>	NaEDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,2
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	<b>Organske komponente</b>	<b>g l<sup>-1</sup></b>
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,0	Inozitol	0,1
KJ	0,75	Saharoza	20,0
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	Gerlit <sup>®</sup> gel	3,0
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025		
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025		
		<b>pH 5,8</b>	

#### 3.2.2.1. Hranljiva odloga za indukciju sekundarne somatske embriogeneze

Za indukciju sekundarne somatske embriogeneze korišćena je modifikovana MS hranljiva podloga čiji je sastav dat u poglavlju 3.1.2, koja umesto agara sada sadrži 0,3% (w/v) Gerlite<sup>®</sup> gel (Sigma). Podloga je bila bez regulatora rastenja (MS-0). pH podloge je pomoću 1N NaOH podešavan na 5,8, pre autoklaviranja na 117°C u trajanju od 25 minuta.

### **3.2.3. Uspostavljanje somatske embriogeneze**

Izolovani zigotski embrioni su postavljani u Petri kutije prečnika 90 mm sa 25 ml B5-0 ili B5-D podloge. Petri kutije su držane u komori za gajenje *in vitro* kultura pod uslovima opisanim u poglavlju 3.1.3. Za svaki tretman su postavljene 3 Petri kutije sa po 10 nezrelih zigotskih embriona (n=30).

Nakon četiri nedelje gajenja na podlogama za indukciju somatske embriogeneze ispitivan je uticaj stadijuma razvića zigotskog embriona i prisustva 2,4-D u podlozi na: frekvencu somatske embriogeneze (FSE = broj eksplantata sa somatskim embrionima/ukupan broj eksplantata x 100), srednji broj somatskih embriona (SE) po eksplantatu (BSE = ukupan broj regenerisanih somatskih embriona/broj eksplantata sa regeneracijom), kao i na indeks kapaciteta za formiranje somatskih embriona (KFE): (KFE = FSE x BSE/100) koji objedinjuje FSE i BSE.

### **3.2.4. Uspostavljanje sekundarne i repetitivne somatske embriogeneze**

U cilju postizanja sekundarne i uspostavljanja repetitivna embriogeneze, somatski embrioni u kotiledonom stadijumu razvića su odvajani sa zigotskih embriona i stavljeni horizontalno na MS-0 podlogu. Novoformirani somatski embrioni su pasažirani na istu podlogu u intervalima od četiri nedelje, tokom perioda od 10 meseci (10 subkultura). Nakon svake subkulture beležen je broj eksplantata sa regeneracijom, kao i broj somatskih embriona po eksplantatu. Postavljene su 3 Petri kutije sa po 10 somatskih embriona (n=30).

### **3.2.5. Regeneracija i aklimatizacija *in vitro* biljaka**

Sekundarni somatski embrioni (SSE) kotiledonarnog stupnja razvića su prebacivani u Erlenmajer boce sa 40 ml podloge: MS-0 ili MS + 1 mg l<sup>-1</sup> BA ili MS + 1 mg l<sup>-1</sup> KIN. SSE su postavljani vertikalno, sa korenovim polom uronjenim u medijum. Po tretmanu su postavljene četiri boce sa po pet izolovanih SSE (n=20). Izdanci dužine 4-5 cm sa dobro razvijenim listovima i korenom su izvađeni iz podloge, ispirani česmenskom vodom, zasađivani u sterilni supstrat i gajeni u fitokomori na temperaturi od 21±2°C, na režimu dugog dana (16h dan, 8h noć) tokom 6 nedelja. Vlažnost je održavana pokrivanjem zasađenih biljaka prozirnrom plastičnom folijom.



Aklimatizovane biljke su prenete i održavane u stakleniku tokom zimskog perioda, gde su vernalizovane, cvetale i bile ručno oprašene.

### **3.2.6. Histološka analiza**

Eksplantati sa somatskim embrionima su fiksirani u FAA fiksativu (5 ml 40% formaldehida : 5 ml sirćetne kiseline : 90 ml 70% ethanola). Nakon dehidracije alkoholom (60 min u 70%, 15 min u 95%, 30 min u 95% i 15 min u 100% etanolu) i prosvetljavanje ksilolom i vršena je ipregnacija materijala parafinom na 58°C. Korišćenjem mikrotoma (Reichert, Vienna, Austria), pravljene su presece debljine 8-10 µm. Deparafinizacija preseka vršena je ksilolom, a rehidracija serijom alkohola (do 50%). Preparati su zatim bojani Delafield hematoksilinom, dehidratisani (serijom alkohola i ksilolom) i utapani u Canada balzam. Posmatranje i snimanje je vršeno na svetlosnom foto-mikroskopom (Leitz DMRB, Leica, Wetzlar, Nemačka) sa objektivima 10x, 20x i 40x, okularima 10x i faktorom uvećanja na fotoaparatu 2,4 i 3,2. Uvećanje od negativa ka pozitivu bilo je oko 3,5x.

### **3.2.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)**

Skenirajuća elektronska mikroskopija je korišćena za morfološku opservaciju sekundarnih somatskih embriona. Uzorci su ubacivani direktno u mikroskop (JOEL-JSM-6390LV, Tokyo, Japan) bez prethodnog tretiranja zlatnim česticama i snimani na 15 kV.

### **3.2.8. Analiza genetičke stabilnosti biljaka regenerisanih iz somatskih embriona RAPD-PCR metodom**

#### **3.2.8.1. Izolacija genomske DNK**

Izolacija DNK iz listova materinske biljke karfiola i kupusa i deset slučajno izabranih biljaka regenerisanih iz sekundarnih somatskih embriona, vršena je modifikovanom CTAB metodom (Zhou i sar., 1994).

Oko 250 mg lista je homogenizovano u tečnom azotu u sterilnom avanu. Dobijeni prah je resuspendovan u 600 µl CTAB ekstrakcionog pufera (2% (w/v) CTAB

(cetil-trimetil-amonijum bromid); 1,4 mM NaCl; 20 mM EDTA pH=8,0; 100 mM Tris/HCl pH= 8,0; 1% (w/v) PVP-40 (polivinilpirolidon, Mr 40); 0,5% (v/v) merkaptoetanol) i prenet u mikrotube volumena 1,5 ml. Mikrotube su inkubirane u vodenom kupatilu 20 min na 56°C uz povremeno mućkanje invertovanjem. Po završetku inkubiranja mikrotube su prohlađene na sobnoj temperaturi nakon čega je u svaku mikrotubu dodato po 600 µl smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1). Sadržaj je izmešan na vorteksu kako bi se stvorila emulzija, pa je centrifugiran 10 min na 13400 rpm na sobnoj temperaturi. Tokom centrifugiranja dolazilo je do razdvajanja rastvora na gornju - vodenu i donju - organsku fazu. Pipetom je pažljivo prenet gornja vodena faza u kojoj se nalaze DNK i RNK u nove mikrotube i ponovljen je korak ekstrakcije sa rastvorom hloroform:izoamil alkohol (24:1). Nakon prebacivanja vodene faze u nove mikrotube, u svaku je dodato po 250 µl 4M NaCl i sadržaj je blago izmešan invertovanjem tube. Dodato je 750 µl hladnog izopropanola, blago izmešano i stavljeno na -20°C najmanje 30 min radi precipitacije DNK. Sadržaj je centrifugiran 5 min na 10900 rpm, a zatim je pažljivo odbačen supernatant. Talog DNK je ispran hladnim 70% etanolom, centrifugiran 5 min na 10900 rpm, odbačen je supernatant, a talog prosušen na sobnoj temperaturi. Osušeni talog DNK je resuspendovan u 200 µl TE pufera (10 mM Tris/HCl, pH=8,0; 1 mM EDTA) i tube su ostavljene na 4°C preko noći. Radi uklanjanja RNK u svaku tubu je narednog dana dodato po 0,5 µl RNaze A (10 mg ml<sup>-1</sup>), a zatim su tube inkubirane 45 min na 37°C. Nakon delovanja RNaze u svaku tubu je dodato po 200 µl smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1), smeša je blago izmešana invertovanjem tubica i centrifugirana 10 min na 13400 rpm. Dobijeni supernatant je DNK izolat.

Kvantitet i kvalitet izolovane DNK su određivani spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu. Absorbanca izolovane DNK je merena na spektrofotometru (Agilent 8453, Santa Clara, CA, SAD) i na osnovu nje izračunata je koncentracija DNK u uzorku prema formuli:

$$c (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = (A_{260} \times R \times 50 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1})/1000$$

$A_{260}$  = absorbanca izmerena na talasnoj dužini od 260nm

R = faktor razblaženja (100),

50 µg µl<sup>-1</sup> – koncentracija dvolančane DNK pri  $A_{260}=1$

Kontaminacija uzoraka DNK je moguća i uglavnom potiče od proteina ili polisaharida. Odnos  $A_{260}/A_{230}$  pokazuje nivo kontaminacije polisaharidima i poželjno je da se ovaj koeficijent kreće u granicama 2,2-2,5. U cilju određivanja stepena kontaminacije DNK proteinima vrše se i dodatna merenja na 280 nm ( $\lambda_{max}$  za proteine) i računa odnos  $A_{260}/A_{280}$  koji je za čiste izolate DNK u opsegu 1,8-2,0.

Integritet DNK je određen elektroforetskim razdvajanjem uzorka DNK na 1% (w/v) agaroznom gelu (*PeqGold Universal* agaroz). Elektroforeza se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu (Pharmacia Biotech, Švedska) i tekla je oko 3 sata u  $1\times$ TBE puferu, pri naponu od 80V. Signali na gelu su vizuelizovani pod UV svetlom transiluminatora talasne dužine od 266 nm (Vilber Lourmat, Nemačka).

### 3.2.8.2. Komponente i uslovi za RAPD - PCR

Genetička stabilnost biljaka dobijenih iz sekundarnih somatskih embriona ispitana je RAPD - PCR (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction*) metodom (Qin i sar., 2007). Reakcija se odvijala u 20  $\mu$ l reakcione smeše koja je sadržala komponente prikazane u Tabeli 3.3.

**Tabela 3.3.** Sastav reakcione smeše RAPD-PCR reakcije.

Komponentne RAPD smeše	Volumen ( $\mu$ l)
PCR pufer, 10X	2,0
Nukleotidi, dNTP 10 mM	2,5
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	0,625
RAPD prajmer, 10 $\mu$ M	2,5
Taq polimeraza 5 U $\mu$ l <sup>-1</sup>	0,3
DNK, 100 ng $\mu$ l <sup>-1</sup>	0,25
dH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11,825
Ukupno	20,0

Za amplifikaciju genomske DNK inicijalno je testirano 10 RAPD prajmera. Utvrđeno je da 5 prajmera, čije su sekvence prikazane u Tabeli 3.4, daju ponovljivi amplifikacioni profil i oni su iskorišćeni za dalje analize.

**Tabela 3.4.** Sekvence prajmera korišćenih za RAPD-PCR.

Naziv prajmera	Sekvenca 5` → 3`
B01	GTTTCGCTCC
B03	GGGCCACTCA
B05	AGGTCGGCGT
C01	GTGCCCCGATC
C05	CAGGCCCTTC

Sve PCR reakcije sa navedenim RAPD prajmerima urađene su pomoću DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas, Litvanija) i odvijale su se u PCR mašini (Mastercycler ep., Eppendorf) pod sledećim uslovima:

- 5 min 94°C,
- 40 ciklusa: 1 min 94°C, 1 min 36°C, 2 min 72°C
- 10 min 72°C

Svaka PCR reakcija je ponovljena dva puta za svaki prajmer radi potvrđivanja ponovljivosti rezultata.

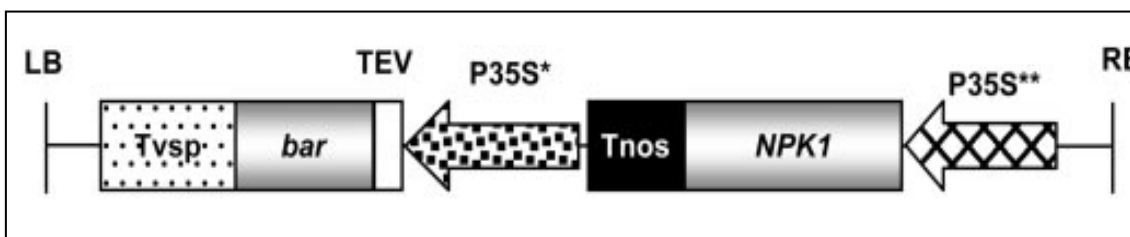
Dobijeni RAPD PCR produkti su razdvajani elektroforezom na 2% agaroznom gelu (*PeqGold Universal* agarozna). Elektroforeza se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu (Pharmacia Biotech, Švedska) i tekla je 2 h u 1×TBE puferu, pri naponu od 100V. Gel je analiziran pod UV svetlošću transiluminatora talasne dužine od 266 nm (Vilber Lourmat, Nemačka). Za određivanje dužine fragmenata korišćen je 100 bp DNK marker (*GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Ready-to-Use*, Fermentas, Litvanija).

### **3.3. GENETIČKA TRANSFORMACIJA KARFIOLA POMOĆU *Agrobacterium tumefaciens***

#### **3.3.1. Konstrukt korišćen za genetičku transformaciju**

Za transformaciju karfiola korišćen je *Agrobacterium tumefaciens* soj EHA101 (Hood i sar., 1986) koji nosi binarni pSHX004 plazmid (Shou i sar., 2004b), dobijen od Iowa State University, Department of Agronomy, Plant Transformation Facility (USA).

Plazmid sadrži dve ekspresione kasete: transgenu kasetu P35S\*\**-NPK1*-Tnos u kojoj modifikovani 35S promotor (35SC4PPDK) kontroliše ekspresiju 800 bp dugog DNK fragmenta koji kodira kinazni domen *Nicotiana* protein-kinaze (NPK1) dug 268 amino kiselina i selektivnu marker kasetu P35S\**-TEV*-*bar*-Tvsp sa *bar* genom iz *Streptomyces hygroscopicus*, koji je pod kontrolom 2x35S promotora (P35S\*) (Slika 3.1). Zahvaljujući aktivnosti enzima fosfinotricin acetil transferaze, koji kodira *bar* gen, samo transformisane ćelije mogu da prežive na selektivnim podlogama sa fosfinotricinom (PPT).



**Slika 3.1.** Šematski prikaz T-DNK (eng. *transferred DNA*) fragmenta plazmida pSHX004 (Shou i sar., 2004b). LB (eng. *left border*) - leva granična sekvenca; RB (eng. *right border*) – desna granična sekvenca; *bar* – gen iz *Streptomyces hygroscopicus* koji kodira fosfinotricin acetil transferazu (Thompson i sar., 1987); *NPK1* – segment gena koji kodira kinazni domen *Nicotiana* protein-kinaze; P35S\* - 2x CaMV 35S promotor (Odell i sar., 1985); P35S\*\* - modifikovani 35S promotor (35SC4PPDK; Sheen, 1993); TEV – 5' netranslirajući region etch virusa duvana (Carrington i Freed, 1990); Tnos – nopalini sintezni terminator (Depicker i sar., 1982); Tvsp – terminator sojinog rezervnog proteina (soybean vegetative storage protein terminator) (Mason i sar., 1993).

### 3.3.2. Hranljiva podloga za rast bakterija i priprema bakterijske suspenzije za transformaciju biljnog tkiva

*Agrobacterium tumefaciens* EHA101(pSHX004) gajen je na YEP podlozi (Garfinkel i sar., 1981) čiji je sastav prikazan u Tabeli 3.5.

**Tabela 3.5.** Komponente YEP podloge za rast bakterija.

Komponente	Količina (g l <sup>-1</sup> )
Ekstrakt kvasca	10,0
Pepton	10,0
NaCl	5,0
Agar	15,0
	pH 6,8

Bakterije su rasle u Petri kutijama sa po 25 ml YEP medijuma u koji su dodati antibiotici: spektinomycin 100 mg l<sup>-1</sup> i kanamicin 50 mg l<sup>-1</sup>. Rastvori antibiotika (Duchefa, Holandija) su sterilisani filtriranjem kroz celulozno nitratne membranske filtere sa porama veličine 0,45 µm (Millipore, SAD) nakon čega su dodavani u sterilisanu i prohlađenu (oko 40°C) podlogu pod aseptičnim uslovima. Kulture su inkubirane u termostatu na temperaturi od 28°C do pojave kolonija (24–48 h). Petri kutije sa izraslim bakterijama čuvane su na 4°C. Bakterije su jednom mesečno prenošene na svežu podlogu.

Za inokulaciju biljnog materijala bakterijom *A. tumefaciens* korišćene su bakterijske suspenzije koje su dobijene zasejavanjem jedne bakterijske kolonije sa čvrste hranljive podloge u 5 ml tečne YEP podloge. Posle inkubacije na 28°C u termostatu u trajanju od 24h dobijena je bakterijska suspenzija.

### **3.3.3. Određivanje selektivne koncentracije fosfinotricina (PPT)**

Za određivanje selektivne koncentracije fosfinotricina urađen je test osetljivosti prema fosfinotricinu. Segmenti hipokotila i somatski embrioni, nakon deset dana gajenja na podlogama za regeneraciju MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BA + 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA i MS-0, respektivno, prebacivani su na MS podlogu istog sastava u koju je dodavan PPT u koncentracijama od 0, 1, 2, 3, 4 i 5 mg l<sup>-1</sup>. Rastvor PPT-a (Duchefa, Holandija) je sterilisan filtriranjem kroz celulozno nitratne membranske filtere sa porama veličine 0,45 µm (Millipore, SAD) nakon čega je pre razlivanja dodavan u sterilisanu i prohlađenu (oko 40°C) podlogu pod aseptičnim uslovima. Za svaki tretman su postavljene po 3 Petri kutije sa po 10 eksplantata (n=30). Eksplantati su gajeni četiri nedelje u uslovima komore za gajenje kultura (poglavlje 3.1.3), nakon čega je beležen broj eksplantata sa regeneracijom kao i broj regenerisanih pupoljaka, odnosno SE po eksplantatu. Na osnovu dobijenih rezultata određena je potrebna količina PPT-a koja inibira regeneraciju iz netransformisanog tkiva i koja je nakon transformacije korišćena kao selektivna koncentracija za odvajanje potencijalno transformisanog tkiva od netransformisanog.

### 3.3.4. Inokulacija eksplantata sa *A. tumefaciens* i regeneracija pupoljaka

Kao materijal za inokulaciju korišćeni susegmenti hipokotila klijanca karfiola starih osam dana, kao i somatski embrioni dobijeni u toku procesa repetitivna somatske embriogeneze. Pre inokulacije sa EHA101(pSHX004) segmenti hipokotila su gajeni 4 dana na MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BA + 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA, dok su somatski embrioni gajeni na MS-0 podlozi. Nakon ovog pretretmana, eksplantati su prvo blago povređivani bockanjem uz pomoć tanke igle, a zatim potapani 5 min u prethodno pripremljenu bakterijsku suspenziju (poglavlje 3.3.2) kojoj je dodato 0 ili 100 µM acetosiringona (AS). Eksplantati koji su korišćeni kao kontrola potapani su u tečnu YEP hranljivu podlogu bez bakterija. Inokulisani, eksplantati su kokultivisani na podlogama koje su bile istog sastava kao one za pretretman i sa istom koncentracijom AS koja je korišćena prilikom inokulacije. Kokultivacioni tretman je trajao 72 h za hipokotile i 48 h za SE, a zatim su eksplantati su ispirani u rastvoru antibiotika cefotaksima (Tolycar®, Jugoremedija, Zrenjanin) u koncentraciji od 500 mg l<sup>-1</sup>, osušeni na sterilnom filter papiru i postavljeni na podloge za regeneraciju sa dodatkom cefotaksima na kojima su gajeni osam dana radi uklanjanja preostalih bakterija. Potencijalno „čisti“ eksplantati su prebačeni na selektivne regenerativne podloge sa 5 mg l<sup>-1</sup> PPT-a u slučaju hipokotila, odnosno 3 mg l<sup>-1</sup> u slučaju somatskih embriona (selektivna koncentracija PPT-a je utvrđena testom osetljivosti netransformisanih eksplantata prema fosfinotricinu, poglavlje 3.3.3) i gajeni 4 nedelje. Pupoljci regenerisani na transformisanim eksplantatima (i hipokotilima i SE) gajeni su još dva ciklusa u trajanju od po četiri nedelje na MS-0 podlozi sa 5 mg l<sup>-1</sup> PPT i 300 mg l<sup>-1</sup> cefotaksima, radi potpune eliminacije netransformisanih pupoljaka i eventualno zaostalih bakterija. Pupoljci koji su preživeli ova dva ciklusa kultivacije na selektivnom medijumu obeleženi i izdvojeni su kao zasebne transformisane linije koje su održavane i umnožavane pasažiranjem svake 4 nedelje na MS podlozi bez PPT-a. Za gajenje transformisanih linija pored podloge bez regulatora rastenja korišćene su i podloge sa BA ili KIN u koncentraciji od 1 mg l<sup>-1</sup>, samostalno ili u kombinaciji u kombinaciji sa 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA.

Pupoljci regenerisani na kontrolnim, netransformisanim eksplantatima prenošeni su na selektivne regenerativne podloge kao i na regenerativne podloge bez fosfinotricina na kojima su gajeni 4 nedelje. Nakon toga pupoljci su prenošeni na podloge za umnožavanje.

Svi eksperimenti vršeni su pod istim, standardnim, uslovima temperature i svetlosnog fluksa (poglavlje 3.1.3).

U eksperimentima transformacije praćeni su sledeći parametri:

- broj eksplantata sa regeneracijom,
- broj regenerisanih pupoljaka po eksplantatu.

Kod regenerisanih pupoljaka praćeni su i beleženi:

- kapacitet umnožavanja (indeks multiplikacije),
- parametri rasta *in vitro* (visina pupoljka i broj listova),
- parametri ožiljavanja (% ožiljavanja, broj korenova po ožiljenom izdanku i dužina najdužeg korena),
- procenat aklimatizacije biljaka
- fenotipske karakteristike u stadijumu tehnološke zrelosti.

### **3.3.5. Hlorofenol-crveno test**

Inicijalna provera transformacije kod regenerisanih pupoljaka izvršen je hlorofenol-creveno reakcijom. Hlorofenol-crveno reakcija (HFC) (Kramer i sar., 1993) je izvršena u mikrotitar pločici sa 96 bunarića. U svaki bunarić je stavljano po 500  $\mu$ l MS tečne podloge pH 6.0 sa 50 mg l<sup>-1</sup> hlorofenol-crveno pH indikatora, koji je tamno crvene boje na spomenutoj pH vredosti. U cilju identifikacije *bar* transformisanih linija u podlogu je dodavan i PPT u koncentraciji od 5 mg l<sup>-1</sup>. Segmenti lista transformisanih linija i kontrolnih netransformisanih biljaka dužine 1 cm i širine 3 - 4 mm su stavljani u bunariće. Procena promene boje podloge iz crvene u žutu, kao pokazatelj uspešne transformacije, je vršena nakon 4 dana inkubacije u fitokomori na temperaturi od 22±2°C.



### 3.3.6. Molekularna analiza transformisanih biljaka (PCR, RT-PCR i qPCR)

#### 3.3.6.1. PCR analiza

Integracija *NPk1* i *bar* gena u genomsku DNK karfiola verifikovana je PCR analizom uz korišćenje specifičnih prajmera (Assem i sar., 2009). Radi eliminacije mogućnosti kotaminacije analiziranih linija agrobakterijom urađena je amplifikacija segmenta *virG* gena koji se nalazi u virulentnom regionu Ti plazmida agrobakterije.

DNK je izolovana iz listova svake od dobijenih transformisanih linija (NT) kao i iz netransformisane kontrolne biljke opisanom CTAB metodom (poglavlje 3.2.8.1).

PCR reakcija se odvijala u 25 µl reakcione smeše koja je sadržala komponente prikazane u Tabeli 3.6.

**Tabela 3.6.** Sastav reakcione smeše PCR reakcije.

Komponente RT smeše	Volumen (µl)
PCR pufer, 10X	2,5
Nukleotidi, dNTP 2 mM	2,5
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	1,0
Prajmer F, 10 µM	0,5
Prajmer R, 10 µM	0,5
Taq polimeraza 5 U µl <sup>-1</sup>	0,3
DNK, 100 ng µl <sup>-1</sup>	1,0
dH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16,7
Ukupno	25,0

Sekvence prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju fragmenta *NPk1*, *bar* i *VirG* gena su date u Tabeli 3.7.

**Tabela 3.7.** Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju segmenata *NPkI*, *bar* i *VirG* gena.

Gen	Sekvenca 5` → 3`	Amplikon (bp)
<i>NPkI</i>	F: GGC TGC AGG AAT TCT CAC ATG T R: GCT CCC GAA GTC ATT CTG CA	646
<i>bar</i>	F: TAC ATC GAG ACA AGC ACG GTC AAC T R: ACG TCA TGC CAG TCC CGT G	484
<i>Vir G</i>	F: GCC GAC AGC ACC CAG TTC AC R: CCT GCC GTA AGT TTC ACC TCA CC	390

\* F – eng. *forward*; R- eng. *reverse*

Sve PCR reakcije sa specifičnim prajmerima urađene su pomoću *DreamTaq Green DNA Polymerase* (Fermentas, Lithvanija) i odvijale su se u PCR mašini (Mastercycler ep., Eppendorf).

Uslovi PCR reakcije (*NPkI* i *bar* gen):

- 3 min 94°C
- 30 ciklusa: 1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C
- 10 min 72°C

Uslovi PCR reakcije (*VirG* gen):

- 5 min 95°C
- 35 ciklusa: 1 min 95°C, 1 min 60°C, 2 min 72°C
- 10 min 72°C

Dobijeni PCR produkti su razdvajani elektroforezom na 2% (w/v) agaroznom gelu.

### 3.3.6.2 RT-PCR analiza

Nivo ekspresije *NPkI* i *bar* transgena određen je reakcijama reverzne transkripcije i lančanog umnožavanja (eng. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* – RT-PCR).

### 3.3.6.2.1. Izolacija RNK

RNK iz transformisanog i netransformisanog biljnog materijala je izolovana po modifikovanom protokolu Gasic i sar. (2004).

Oko 200 mg biljnog tkiva je samleveno u avanu u tečnom azotu. U samlevene uzorke je dodavano po 650  $\mu$ l ekstrakcionog pufera (2% (w/v) CTAB; 2% (w/v) PVP; 25 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCl pH=8,0; 2M NaCl; 0,5 g l<sup>-1</sup> spermidina) i 15  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptetoetanol. Nakon 20 s vorteksovanja uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu 15 min na 60°C. Po inkubiranju, u svaki uzorak je dodato 650  $\mu$ l smeše hloroform : izoamil alkohol (24:1) i mućkano je na vorteksu 20 s. Centrifugiranjem 10 min na 10000 rpm na 4°C razdvojile su se gornja vodena i donja organska faza nakon čega je supernatant sa RNK koji se odvajao u vidu gornje faze prebačen u nove tubice. Postupak ekstrakcije hloroform : izoamil alkoholom i centrifugiranje su ponovljeni. U 500  $\mu$ l supernatanta je dodato 166  $\mu$ l 7,5M LiCl i uzorci su radi precipitacije inkubirani na 4°C preko noći.

Narednog dana, uzorci su centrifugirani 45 min na 10020 rpm na 4°C. Supernatant je odbačen, pelet je ispran sa 1 ml hladnog 70% etanola. Uzorci su centrifugirani 10 min na 10020 rpm na 4°C nakon čega je supernatant odbačen i pelet osušen tokom 5 min u laminarnoj komori. Pelet je zatim rastvoren u 100  $\mu$ l vode i dodato je 10  $\mu$ l Na-acetata (pH 5,5) i 275  $\mu$ l 70% etanola. Uzorci su inkubirani minimum jedan sat na -70°C, a zatim su centrifugirani 45 min na 10020 rpm na 4°C. Supernatant je odbačen i pelet ispran etanolom, kao što je prethodno opisano. Nakon sušenja uzoraka u laminarnoj komori (ne duže od 10 min), RNK je rastvorena u 50  $\mu$ l DEPC-vode i do upotrebe čuvana na -70 °C.

Kvantitet i kvalitet izolovane RNK su određivani spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu. Kvantitet je određivan na spektrofotometru Agilent 8453 i izračuvan po formuli:

$$c (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = A_{260} \times 40 \times R$$

$A_{260}$  – apsorbanca uzoraka RNK na 260nm,

40  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  – koncentracija jednolančane RNK pri  $A_{260} = 1$  i

R – faktor razblaženja (100).

Čistoća RNK je procenjena na osnovu odnosa  $A_{260}/A_{280}$  koji se za čiste izolate RNK kreće u intervalu 1,8-2,2.

Integritet izolovane RNK je proveren elektroforetskim razdvajanjem 1  $\mu\text{g}$  uzorka RNK na 1% (w/v) agaroznom gelu pre izvođenja PCR postupka. Agarozni gel je pripreman na isti način kao i agarozni gel za proveru kvaliteta genomske DNK (poglavlje 3.2.8.1), s tom razlikom što su kadica, kalup i češljici tretirani 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Uklanjanje genomske DNK iz uzoraka RNK vršeno je tako što je po 1  $\mu\text{g}$  totalne RNK iz svakog uzorka tretiran DNK-azom (Thermo Scientific). Ovaj tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine 10  $\mu\text{l}$  (Tabela 3.8). Tretman je trajao 30 min na  $37^\circ\text{C}$ . Stopiranje DNK-aze je izvršeno dodavanjem 1  $\mu\text{l}$  EDTA (ThermoScientific) u svaki uzorak i inkubiranjem 10 min na  $65^\circ\text{C}$ .

**Tabela 3.8.** Sastav reakcione smeše za eliminaciju DNK u uzorcima RNK.

Komponentne	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
$\text{H}_2\text{O}$	$7,75 - V_{\text{RNK}}$
DNaza pufer, 10X	1
DNaza, 5 U $\mu\text{l}^{-1}$	1
RNaza inhibitor, 40 U $\mu\text{l}^{-1}$	0,25
RNK	zapremina koja odgovara 1 $\mu\text{g}$ (max 6,75)
Ukupno	10 $\mu\text{l}$

#### 3.3.6.2.2. Reakcija reverzne transkripcije (RT) i PCR amplifikacija cDNA

Nakon prečišćavanja uzoraka od zaostalih molekula genomske DNK, izolovana RNK je reverzno transkribovana u jednolančane molekule DNK (cDNK). Za reakciju reverzne transkripcije (RT) je korišćen *GeneAmp<sup>®</sup> Gold RNA PCR Core Kit* (Applied Biosystems). RT reakcija se odvijala u 20  $\mu\text{l}$  reakcione smeše čije su komponente prikazane u Tabeli 3.9. Uslovi RT reakcije su bili: 10 min na  $25^\circ\text{C}$ , 12 min na  $42^\circ\text{C}$ .

**Tabela 3.9.** Sastav reakcione smeše RT reakcije.

Komponentne RT smeše	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	4,7
RT-PCR pufer, 5X	4,0
dNTP, 10 mM	2,0
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2,0
DDT, 10 mM	2,0
Oligo - dT	0,5
RNaza inhibitor, 20 U $\mu\text{l}^{-1}$	0,5
MultiScribe® transkriptaza	0,3
RNK, 0,1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	4,0
Ukupno	20,0

Nakon reverzne transkripcije dobijena cDNK je umnožena PCR reakcijom, korišćenjem gen specifičnih prajmera. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju *NP1* i *bar* cDNK dizajnirani su 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/>). Sekvence prajmera korišćenih za *NP1* i *bar* RT-PCR amplifikaciju su date u Tabeli 3.10.

**Tabela 3.10.** Sekvence prajmera korišćenih za *NP1* i *bar* RT-PCR amplifikaciju.

Gen	Sekvenca 5' → 3'	Amplikon (bp)
<i>NP1</i>	F: TTT GGG AAC TGC AAG AGA GG	76
	R: AAG TGA CGA GAT TGA GCC AC	
<i>bar</i>	F: AGA CAA GCA CGG TCA ACT TC	250
	R: GAC TTC AGC AGG TGG GTG TA	

\* F – eng. *forward*; R- eng. *reverse*

PCR reakcija se odvijala u 25  $\mu\text{l}$  reakcione smeše koja je sadržala komponente prikazane u Tabeli 3.11.

**Tabela 3.11.** Sastav reakcione smeše PCR reakcije.

Komponentne PCR smeše	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	9,00
PCR pufer, 10X	1,50
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	0,75
dNTP, 10 mM	1,00
Prajmer F, 5 $\mu\text{M}$	1,25
Prajmer R, 5 $\mu\text{M}$	1,25
Taq polimeraza, 5 U $\mu\text{l}^{-1}$	0,25
cDNK	10,00
Ukupno	25 $\mu\text{l}$

Uslovi PCR reakcije (*NPKI* i *bar* gen):

- 5 min 95°C
- 36 ciklusa: 1 min 95°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C
- 10 min 72°C

Za reakciju reverzne transkripcije (RT) je korišćen GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems), a za PCR AmpliTaq Gold®PCR Kit (Applied Biosystems). Obe reakcije, RT i PCR amplifikacija cDNK, su se odvijale u PCR mašini (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf).

### 3.3.6.3. Kvantitativno određivanje nivoa ekspresije gena (qPCR)

Nivo ekspresije *NPKI* i *bar* transgena je određen metodom kvantitativnog RT-PCR (qPCR) koji se odvijao u dva koraka. RT reakcija je izvršena po već opisanom protokolu (poglavlje 3.3.7.2) i na taj način dobijena cDNK je korišćena u qPCR reakciji koja se odvijala u smeši zapremine 25  $\mu\text{l}$  i čije su komponente prikazane u Tabeli 3.12.

**Tabela 3.12.** Sastav reakcione smeše qPCR reakcije.

Komponentne qPCR smeše	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	7,0
SYBR Master Mix	12,5
Prajmer F (5 $\mu$ M)	1,5
Prajmer R (5 $\mu$ M)	1,5
cDNK/standard (40 ng/ $\mu$ l)	2,5
Ukupno	25

Za qPCR korišćeni su isri prajmeri kao i za RT-PCR čije su sekvence prikazane u Tabeli 3.10. Radi provere ujednačenosti količine ukupne cDNK u svim uzorcima paralelno sa amplifikacijom oba transgena, amplifikovan je i referentni gen za aktin krompira (*PoAc58*). Prajmeri korišćeni za amplifikaciju aktinskog gena prikazani su u Tabeli 3.13.

**Tabela 3.13.** Set prajmera korišćenih za umnožavanje fragmenta referentnog gena za aktin.

Gen	Sekvenca prajmera (5'→3')	Amplikon
<i>PoAc58</i>	F: TGT TGG ACT CTG GTG ATG GTG R: AGT AAC CAC GCT CAG TGA GGA	141 bp

\* F – eng. *forward*; R- eng. *reverse*

Sve qPCR reakcije su urađene u tri ponavljanja u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Co, Foster City, SAD), pomoću SYBR Green I kita (*Maxima™ SYBER Green/Rox qPCR Master Mix*, Thermo Scientific).

Uslovi qPCR reakcije (*NPKI* i *bar* gen):

- 5 min 95°C
- 40 ciklusa: 30 s 95°C, 30 s 58°C, 1 min 72°C

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

Za svaki prajmer postavljena je kontrola koja je umesto cDNK sadržala 2,5 µl H<sub>2</sub>O (eng. *Non Template Control* - NTC). Za potrebe pravljenja standardnih krivih korišćena je serija razblaženja cDNK (10<sup>7</sup>–10 kopija/µl) prečišćena izolacijom sa 1,2 % agaroznog gela uz pomoć kita (*GeneJet Gel Extraction Kit*, Thermo Scientific). Broj kopija je određen uz pomoć programa <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>. U reakcionu smešu je nanošeno 2,5 µl odgovarajućeg razblaženja.

Ct (*threshold cycle*) vrednost, tj. broj ciklusa u kojima je fluorescencija uzoraka dostizala prag (*threshold*) iznad “fluorescentnog šuma”, koji je poticao od nespecifične fluorescencije, određivana je automatski programom *7000 System SDS Software* i po potrebi doterivana manuelno. Standardne krive, koje pokazuju zavisnost Ct vrednosti od logaritamskog broja kopija matrice u standardnim razblaženjima, na početku qPCR reakcije, korišćene su za izračunavanje broja kopija transkripata, odnosno cDNK, u nepoznatim uzorcima. Analizirane su i krive topljenja amplikona. Tačke topljenja amplikona (T<sub>m</sub>) se definišu kao temperature na kojima je prelaz iz dvolančane u jednolančanu formu najbrži. Svi uzorci su nanošeni na ploču u triplikatima. Rađena je apsolutna kvantifikacija.

### **3.4. TEST TOLERANCIJE TRANSFORMISANIH BILJAKA PREMA POVEĆANOJ KONCENTRACIJI NaCl**

#### **3.4.1. Određivanje kritične koncentracije NaCl za preživljavanje biljaka *in vitro***

Nakon potvrđivanja integracije i ekspresije *NPK1* i *bar* gena preliminarnim testovima sa listovima i celim izdancima procenjivan je uticaj različitih koncentracija NaCl na netransformisane (NT) i transformisane biljke *in vitro*, radi određivanja kritične koncentracije NaCl koju netransformisane biljke ne preživljavaju, a transformisane linije preživljavaju. Listovi su izolovani sa 10 dana starih *in vitro* biljaka i postavljeni na čvrstu osnovnu MS podlogu sa rastućim koncentracijama NaCl (0, 100, 200, 300 i 400 mM). Na iste podloge su postavljane i celi *in vitro* izdanci stari 10 dana. Procene oštećenja u vidu hloroza i nekroza su vršene nakon 7 dana gajenja na podlogama sa NaCl.



### **3.4.2. Ispitivanje efekata NaCl na rast i morfološke osobine biljaka *in vitro***

Radi procene tolerantnosti transformisanih pupoljaka (generacije T<sub>0</sub>) na povećanu koncentraciju NaCl, pupoljci karfiola linija T<sub>0</sub>-L2, L11, L12 i L14 gajeni su *in vitro* na bazalnoj MS podlozi sa različitim koncentracijama NaCl (0, 100 i 200 mM) pod već opisanom režimu (poglavlje 3.1.7). Kontrolni, netransformisani pupoljci su gajeni na istim podlogama i pod istim uslovima. Pre postavljanja na podloge mereni su sveža masa i visina pupoljaka. Za svaki tretman su postavljene 3 boce sa po 10 pupoljaka (n=30).

Nakon 7 dana gajenja na MS podlozi bez i sa povećanom koncentracijom NaCl ponovo su mereni sveža masa i visina pupoljaka i procenjivan prinos (porast sveže mase) i prirast visine u odnosu na početak tretmana. Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl.

Takođe su beležena i vidljiva oštećenja na listovima izdanaka, izazvana povećanom koncentracijom NaCl u podlozi, koja su označavana vrednostima od 0 - 3: 0 – bez oštećenja, 1 – hloroza (žute ivice) listova, 2 – nekroza delova listova i 3 – hloroza i nekroza celih listova. Stepen oštećenja je izračunavan na osnovu formule  $SI = \sum (ni \times i)/N$ , gde je ni broj pupoljka (n) sa oštećenjem stepena i (od 0–3), a N – ukupni broj pupoljaka (Diaz-Vivanco i sar., 2013).

Radi ispitivanja uticaja NaCl na ožiljavanje netransformisanih i transformisanih izdanaka, izdanci su postavljani pojedinačno u epruvete sa 25 ml MS podloge sa 1 mg l<sup>-1</sup> IBA u koje su dodate različite koncentracije NaCl (0, 100 i 200 mM). Na svakom tretmanu su postavljena 2 ponavljanja sa po 5 pupoljaka od svake linije (n=10).

Nakon 4 nedelje gajenja, mereni su parametri ožiljavanja pupoljaka (broj korenova po pupoljku i dužina najdužeg korena). Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl.

### **3.4.3. Ispitivanje efekata NaCl na fiziološke osobine biljaka *in vitro***

Kod netransformisanih i transformisanih pupoljaka T<sub>0</sub> linije koji su bili izloženi povećanoj koncentraciji NaCl analizirani su: sadržaj hlorofila, karotenoida, šećera, prolina kao i aktivnost antioksidativnih enzima. Dobijeni rezultati su poredjeni sa rezultatima analiziranih parametara kod netransformisanih biljaka koje su bile podvrgnute istom tretmanu.

### 3.4.3.1. Određivanje sadržaja hlorofila i karotenoida

Izolacija hlorofila je izvršena po metodi Brouers i Michel-Wolwertz (1983). Oko 200 mg biljnog materijala je homogenizovano u 80% etanolu (3,0 ml) u koji je dodato oko 100 mg CaCO<sub>3</sub> kako bi se neutralisale biljne kiseline i sprečilo formiranje feotina a. Ekstrakt sa hlorofilom i totalnim karotenoidima je prebačen u epruvete za centrifugiranje. Talog je ispran sa 1,5 ml 80% acetona, ekstrakt je prebačen u epruvetu i volumen je dopunjen do 5 ml. Ekstrakt je centrifugiran 5 min na 3500 rpm na 4°C. Pre merenja koncentracija supernatanti su razblaženi 10 puta.

Sadržaj hlorofila i karotenoida određivan je spektrofotometrijski (Agilent 8453, Santa Clara, CA, SAD), vrednost absorbance (A) je merena na četiri talasne dužine: 470 nm (max apsorpcije za karotenoide), 645 nm (max apsorpcije za hlorofil b), 652 nm (max apsorpcije za ukupne hlorofile) i 663 nm (max apsorpcije za hlorofil a). Ukupan sadržaj hlorofila i karotenoida izračunavan je prema formulama po Lichtenthaler (1987) i izražavan u mg g<sup>-1</sup> sveže mase:

$$\text{Sadržaj hlorofila: } C(a+b) = (22,2A_{645} + 8,2A_{663}) / m$$

$$\text{Sadržaj karotenoida: } C = (1000A_{470} - 1,9xChlA - 63,14xChlB) / (214 x m)$$

m – masa uzorka, izražena u gramima.

Merenje je tri puta ponavljeno za svaki tretman. Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl odnosno vrednosti dobijene na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1).

### 3.4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih šećera

Ukupni šećeri su određivani po fenol - sumporno kiselinskoj metodi (Dubois i sar, 1956; Krishnaveni i sar., 1984). Oko 100 mg biljnog tkiva je hidrolizovano inkubiranjem 3h na 100°C u 5 ml 2,5N HCl. Nakon hlađena na sobnoj temperaturi reakciona smeša je neutralizovana sa NaCO<sub>3</sub> i volumen dopunjen do 100 ml sa dH<sub>2</sub>O. Po 0,1 ml od svakog uzorka je prebačen u epruvete i volumen je dopunuen do 1 ml sa dH<sub>2</sub>O, zatim je dodato 1 ml 5% fenola i 5 ml 96% sumporne kiseline. Smeša je snažno izmešana i inkubirana 20 min na 30°C. Apsorbanca ekstrakta je merena na 490 nm. Koncentracija ukupnih šećera je određena uz pomoć kalibracione krive konstruisane korišćenjem rastvora poznatih koncentracija glukoze (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 mg ml<sup>-1</sup>).

Eksperiment je urađen u tri ponavljanja za svaki tretman. Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl odnosno vrednosti dobijene na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1).

### 3.4.3.3. Određivanje sadržaja prolina

Izolacija prolina je izvršena po Bates i sar. (1973). Oko 200 mg zamrznutog biljnog tkiva je homogenizovano u tečnom azotu nakon čega je dodavana 3% sulfosalicilna kiselina (0,5 ml / 0,01g tkiva). Ekstrakt je centrifugiran 10 min na 10 080 rpm. U 1 ml supernatanta dodato je 1 ml acid-ninhidrina (1,25 g ninhidrina se zagreva sa 30 ml glacijalne sirćetne kiseline i 20 ml 6M fosforne kiseline uz mešanje) i 1 ml glacijalne sirćetne kiseline nakon čega je reakciona smeša inkubirana 1 h na 100°C. Reakcija je prekinuta prenošenjem epruveta na led. U reakcionu smešu je dodato 2 ml toluena (faza ekstrakcije), snažno je izmešana i ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi se razdvojile dve faze – vodena i toluenska. Od gornje, toluenske faze je uzet po 1 ml i korišćen za merenje apsorbance na 520 nm koristeći toluen kao blank.

Koncentracija prolina je određena uz pomoć kalibracione krive konstruisane korišćenjem rastvora poznatih koncentracija prolina (10, 20, 40 i 80  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Po 1 ml rastvora prolina poznate koncentracije je promešan sa 5 ml 3% sulfosalicilne kiseline, 1 ml acid-ninhidrina i 1 ml glacijalne kiseline. Reakciona smeša je inkubirana 1 h na 100°C zajedno sa uzorcima nakon čega je reakcija prekidana prenošenjem tuba na led. U svaku epruvetu je dodavano po 2 ml toluena radi ekstrakcije i nakon razdvajanja faza merena je apsorbance gornje toluenske faze. Sadržaj prolina je izražen u  $\mu\text{g g}^{-1}$  sveže mase (FW).

Eksperiment je urađen u tri ponavljanja za svaki tretman. Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl. Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl odnosno vrednosti dobijene na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1).

### 3.4.3.4. Analiza antioksidativnih enzima

#### 3.4.3.4.1. Izolacija i kvantifikacija ukupnih proteina

Ukupni rastvorljivi proteini izolovani su iz zamrznutog biljnog tkiva mase oko 600 mg koje je homogenizovano u avanu sa tečnim azotom. U tako samlevene uzorke je dodat ekstrakcioni pufer (50 mM TRIS-HCl pH=7,6; 10 mM EDTA pH=8,0; 10% (v/v) glicerol; 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF); 1 mM ditriotreitol (DTT) i 5% (w/v) PVP) u odnosu 2:1. Ekstrakt je zatim centrifugiran 10 min na 13000 rpm. Dobijeni supernatant je čuvan na -70°C i korišćen za kvantifikaciju ukupnih proteina i enzimske testove.

Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu određivana je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 595 nm (Bradford, 1976), uz korišćenje BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) kao proteinskog standarda.

#### 3.4.3.4.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza (POD) praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance na 430 nm. Reakciona smeša je sadržala 1,38 ml 0.05 M kalijum-fosfatnog pufera, pH 6,5, 50 µl 0,6 M pirogalola kao supstrata za enzim i 20 µl uzorka, uz dodatak 50 µl 0,6 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivnost peroksidaza je merena tokom 3 min, na svakih 20 s i izražavana je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina. Peroksidaza katalizuje polimerizaciju i oksidaciju pirogalola u prisustvu vodonik peroksida i nastajanje purpurogalina koji je crvenkaste boje i ima max apsorpcije na 430 nm. Aktivnost enzima izražavana je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U mg<sup>-1</sup> proteina):

$$A_{\text{POD}} = (V_{\text{T}} \times \Delta A \times 1000) / (V_{\text{U}} \times 2,47 \times W_{\text{up}})$$

$\Delta A$  – promena apsorbance na 430 nm u minuti,

$V_{\text{T}}$  – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml),

$V_{\text{U}}$  – zapremina uzorka u kivetu (ml),

$W_{\text{up}}$  – koncentracija ukupnih proteina dobijena na osnovu Bradfordove krive (mg)

2,47 =  $\epsilon$  – milimolarni ekstinkcioni koeficijent purpurogalina na 430 nm (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl odnosno vrednosti dobijene na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1).

#### 3.4.3.4.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza

Aktivnost katalaza (CAT) određivana je spektrofotometrijskim praćenjem kinetike nestajanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prema metodi Aebi (1984). Jedinica (U) aktivnosti katalaza se definiše kao količina enzima koja razgradi 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 1 min (μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>). Aktivnost katalaza je merena u toku 3 min, na svakih 20 s, na talasnoj dužini od 240 nm i izražavana je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U mg<sup>-1</sup> proteina):

$$A_{\text{CAT}} = (V_{\text{T}} \times \Delta A \times 1000) / (V_{\text{U}} \times 0,0436 \times W_{\text{up}})$$

ΔA – promena apsorbance na 430 nm u minuti,

V<sub>T</sub> – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml),

V<sub>U</sub> – zapremina uzorka u kivetu (ml),

W<sub>up</sub> – koncentracija ukupnih proteina dobijena na osnovu Bradfordove krive (mg)

0,0436 = ε – milimolarni ekstinkcioni koeficijent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl odnosno vrednosti dobijene na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1).

#### 3.4.3.4.4. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određivana je po modifikovanoj metodi Beyer i Fridovich (1987). Reakciona smeša (1 ml) sadržala je 100 mM kalijum-fosfatnog pufera, pH=7,8 (K-P pufer), 2 mM EDTA, 260 mM metionin, 1,5 mM nitroblu tetrazolium hlorid (NBT), 0,04 mM riboflavin.

Za svaki uzorak pripremljeno je 6 razblaženja koja su naneta na mikrotitar ploču, koja je nakon toga osvetljavana 30 min–1 h. Merenje apsorbance je vršeno na 540 nm. Jedinica (U) aktivnosti SOD se definiše kao količina enzima uzorka potrebna za redukciju 50% supstrata (NBT) i izražavana je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U mg<sup>-1</sup> proteina).

Dobijeni rezultati su izraženi kao relativne vrednosti = vrednosti na tretmanu / vrednosti na podlozi bez NaCl odnosno vrednosti dobijene na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1).

#### **3.4.4. Test otpornosti transformisanih biljaka prema herbicidu fosfinotricinu (PPT) *in vitro* i *ex vitro***

Otpornost transformisanih biljaka na PPT ispitivana je u *in vitro* uslovima gajenjem transformisanih pupoljaka (T0 linije) na MS podlogama sa različitom koncentracijom PPT (0-5 mg l<sup>-1</sup>). Netransformisani pupoljci su takođe bili podvrgnuti tretmanu sa PPT i služili su kao kontrola. U toku 10 dana gajenja na podlozi sa PPT-om procenjivana je pojava oštećenja u vidu hloroza i nekroza na gajenim biljkama (n=3).

Otpornost aklimatizovanih biljaka prema PPT-u ispitivana je u stakleniku tretiranjem transformisanih i netransformisanih biljaka rastvorom herbicida BASTA<sup>®</sup> (Bayer CropScience), koji kao aktivnu supstansu sadrži PPT (200 g l<sup>-1</sup> PPT). Pojedinačni listovi mesec dana starih aklimatizovanih biljaka (kontrole i transformisane linije T<sub>0</sub>-L9) natopljeni su rastvorima herbicida BASTA<sup>®</sup> (300 i 600 mg l<sup>-1</sup> PPT). Oba tretmana su izvođena u isto vreme i na istoj biljci. Takođe smo ispitivali i uticaj prskanja 3 meseca starih aklimatizovanih biljaka rastvorom BASTA<sup>®</sup> koji je sadržao 600 mg l<sup>-1</sup> PPT. Nakon prskanja svakodnevno su procenjivana oštećenja u vidu hloroza i nekroza sve do potpunog propadanja kontrolnih biljaka (n=3).

### **3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Svi podaci statistički su obrađeni u programu StatSoft Inc. STATISTICA, verzija 8.0 (2007) i prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška. Statistička obrada podataka podrazumevala je analizu varijanse jednofaktorijalnog i dvofaktorijalnog eksperimenta (ANOVA) i poređenje srednjih vrednosti Fišerovim LSD testom (LSD engl. *least significant difference*) na nivou značajnosti  $P \leq 0,05$ . Kada je vršeno poređenje različitih parametara pojedinačnih transformisanih linija u odnosu na netransformisanu liniju srednje vrednosti su razdvajane na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ). Podaci izraženi u procentima su angularno transformisani u cilju statističke obrade. Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel.

U tabelama i na graficima su prikazani i rezultati analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti i to slovima ili zvezdicom. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ili \* ukazuju na statistički značajne razlike. U slučaju da su u istoj tabeli ili na istom grafiku prikazane dve grupe podataka koje su zasebno statistički analizirane, jedna grupa podataka je obeležena velikim, a druga malim slovima. Na graficima na kojima je prikazano više od dve grupe zasebno statistički analiziranih podataka, statistički značajne razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolnu vrednost označene su zvezdicom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. *In vitro* PROPAGACIJA KOD RAZLIČITIH VARIJETETA *B. oleracea*

#### 4.1.1. Uspostavljanje kulture *in vitro* organogenezom *de novo*

Prvi i neophodan preduslov za dobijanje transgenih biljaka je uspostavljanje regenerativnih kultura *in vitro*. Kao početni materijal za uspostavljanje regenerativnog sistema putem organogeneze korišćeni su različiti eksplantati (kotiledoni, hipokotili, koren) koji su bili izolovani sa 7 dana starih klijanaca karfiola, kelja, brokolija i kupusa (crveni i beli kupus).

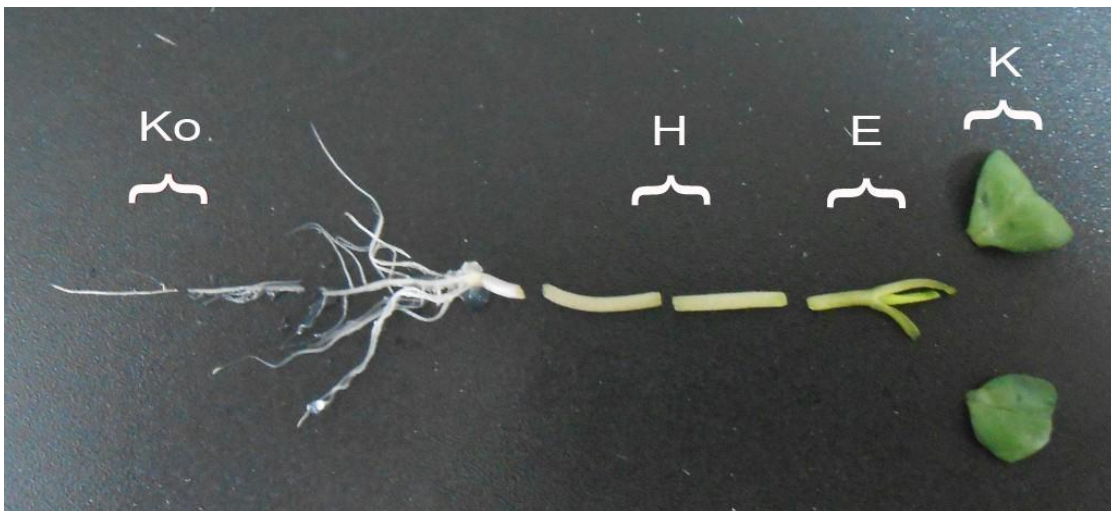
Nakon površinske sterilizacije 20% varikinom zaraženost semena, koja su isključavana na MS podlozi, je bila na relativno niskom nivou i varirala je od 0,66% kod brokolija do 3,90 % kod crvenog kupusa. Klijavost je kod svih varijeteta bila zadovoljavajuća i iznad donje granice klijavosti koja kod kupusnjača iznosi 75% (Tabela 4.1). Posebno visoku klijavost je imalo seme brokolija (97,37%) i belog kupusa (96,17%).

**Tabela 4.1.** Klijavost semena četiri varijeteta *B.oleracea*.

Varijetet	Broj semena	% proklijalih semena	% zaraženih semena
Karfiol	575	484 (84,17)	2,09
Brokoli	152	148 (97,37)	0,66
Kelj	215	190 (88,37)	1,86
Crveni kupus	282	229 (81,21)	3,90
Beli kupus	261	251 (96,17)	1,15

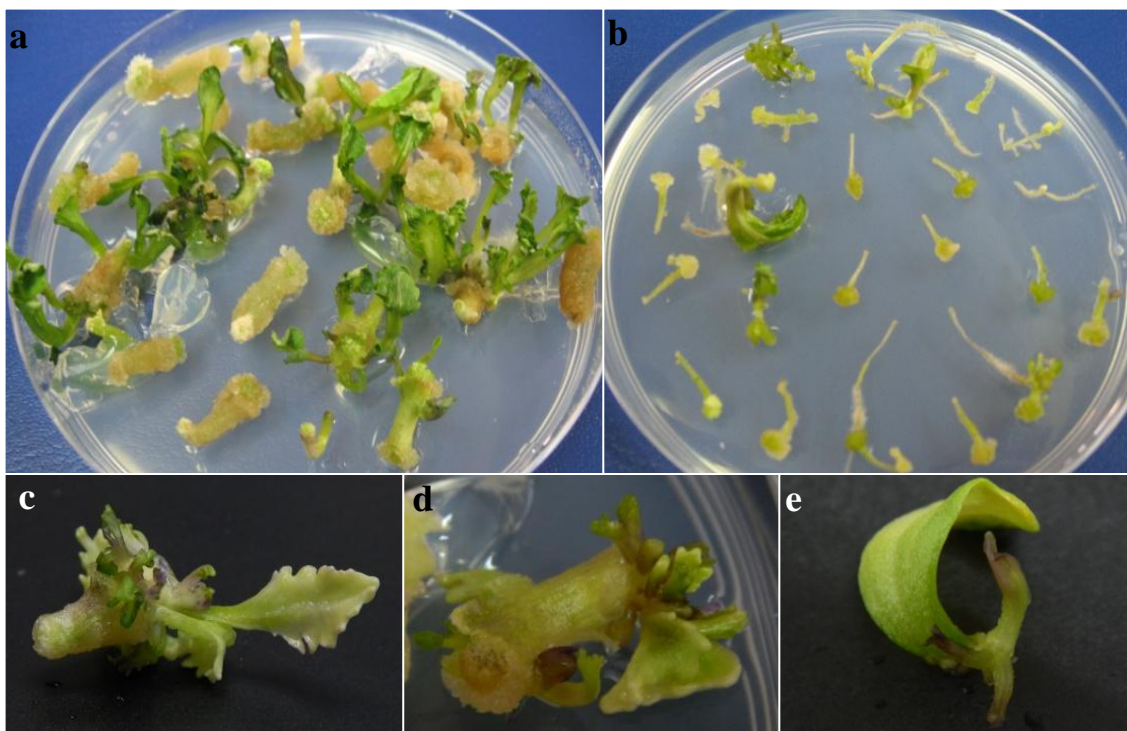
Nakon 7 dana gajenja na MS podlozi klijanci su dostizali dužinu od oko 4 cm. Segmenti ovako razvijenih klijanaca (kotiledoni, hipokotili i koren) (Slika 4.1) su radi iniciranja regeneracije postavljeni na MS podloge koje su sadržale BA ili KIN u koncentraciji 0,5 i 1 mg l<sup>-1</sup> u kombinaciji sa 0, 0,1 i 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA.





**Slika 4.1.** *In vitro* gajen klijanac karfiola: koren (Ko), hipokotil (H), kotiledon (K) i epikotil (E). Kao eksplantati su korišćeni koren (Ko), hipokotil (H) i kotiledon (K).

Ubrzo nakon postavljanja na MS podloge za regeneraciju eksplantati su počeli da rastu, a prva pojava kalusa na krajevima hipokotila i korenova je uočena nakon 7-10 dana gajenja. Nakon 14-16 dana primećeni su začeci prvih adventivnih pupoljaka, koji su se tokom daljeg gajenja na istoj podlozi razvijali u izdanke. Zapažena su dva različita načina regeneracije pupoljaka: direktna i indirektna, posredstvom kalusa. Direktna regeneracija je bila dominantna kod eksplantata kotiledona svih varijeteta izuzev brokolija. U slučaju hipokotila preovladavala je indirektna regeneracija, koja je činila 90% ukupne regeneracije kod kelja i belog kupusa, oko 80% kod karfiola i crvenog kupusa i 100% kod brokolija. Regeneracija iz segmenata korena svih varijeteta je takođe bila indirektna. Do formiranja kalusa je dolazilo na 70% korenskih eksplantata kelja do 90% kod karfiola i brokolija. Kalusi i pupoljci su se razvijali na krajevima i/ili na središnjem delu eksplantata hipokotila i korenova (slika 4.2 a,b,c), a povremeno i na obe strane eksplantata (slika 4.2 d). Kod eksplantata kotiledona, do direktne regeneracije dolazilo je na proksimalnoj (petiola) strani kotiledona (slika 4.2 e).



**Slika 4.2.** Regeneracija pupoljaka iz različitih segmenata klijanaca karfiola (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). Regeneracija iz segmenata hipokotila (a, c i d), regeneracija iz segmenata korenova (b) i regeneracija iz segmenta kotiledona (e).

ANOVA analiza je pokazala da su tip eksplantata i sastav regenerativne podloge faktori koji značajno utiču na frekvencu regeneracije (RF) i srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP).

Generalno, kod svih ispitivanih varijeteta, izuzev karfiola, hipokotili su regenerisali pupoljke sa najvećom frekvencom od 74,19% kod crvenog kupusa do 91,67% kod kelja. Kod kelja su hipokotili regenerisali pupoljke 4 puta više u odnosu na kotiledone (85,71% prema 21,74%) (Tabela 4.3), dok su kod kupusa regenerisali 1,5-2,5 puta većom frekvencom u odnosu na kotiledone u zavisnosti od genotipa (Tabela 4.5 i 4.6). Najizraženije razlike su ostvarene kod brokolija, čiji su hipokotili regenerisali pupoljke sa frekvencom 2-20 puta većom u odnosu na kotiledone i koren na istoj podlozi (Tabela 4.4).

Regenerativni odgovor kotiledona je varirao od 0-85% u zavisnosti od varijeteta i podloge. Karfiol je jedini varijetet kod koga je postignuta značajno veća frekvencu regeneracije (RF) iz kotiledona u odnosu na hipokotile (85% prema 51,52%) (Tabela 4.2). Najmanji kapacitet za regeneraciju je postignut na segmentima korena, posebno

kod brokolija i crvenog kupusa, dok je kod karfiola i kelja na podlogama sa BA postignuta zadovoljavajuća regeneracija (oko 50%).

Regenerativni potencijal je poređen i na osnovu srednjeg broja pupoljka (SBP) regenerisanih po eksplantatu. Kod karfiola najveći SBP je postignut na kotiledonima i podlozi sa KIN, dok su kod svih ostalih varijeteta hipokotili regenerisali veći broj pupoljaka u odnosu na kotiledone i korenove i to na podlozi sa BA (Tabele 4.2 - 4.6)

Postojale su značajne razlike u regeneraciji jednog tipa eksplantata u zavisnosti od kombinacije regulatora rastjenja. Podloga koja je sadržala BA je bila optimalna za regeneraciju kod svih varijeteta, izuzev karfiola kod koga je najbolji odgovor na kotiledonima postignut na podlozi sa KIN. Značajno veća RF sva tri tipa eksplantata je postignuta na podlozi sa  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  BA u odnosu na podlogu sa  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  KIN. Bilo je značajne razlike u frekvenci regeneracije ukoliko se BA primenjivao sam ili u kombinaciji sa IBA. Dodavanje IBA u koncentraciji od  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  ili  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  je u mnogim slučajevima uticalo na povećanje frekvence regeneracije, dok je primena samo BA davala zadovoljavajuće rezultate u pogledu srednjeg broja pupoljaka po eksplantatu. Najveći broj pupoljaka po eksplantatu ( $7,4 \pm 0,3$ ) je postignut kod brokolija na eksplantatima hipokotila gajenim na podlozi sa  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  BA (Tabela 4.4).

Indeks regeneracije (IR) koji kombinuje frekvencu regeneracije (RF) i srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP) je takođe pokazao da je najbolji rezultat kod svih varijeteta postignut na hipokotilima i podlozi sa BA, izuzev karfiola kod koga su najbolje odreagovali kotiledoni na podlozi sa KIN.

**Tabela 4.2.** Uticaj regulatora rasteња i tipa eksplantata na regeneraciju adventivnih pupoljaka kod karfiola (cv. Raša).

Eksplantat	Regulatori rasteња (mg l <sup>-1</sup> )			Frekvencija regeneracije (RF, %)	Srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP)*	Indeks regeneracije (IR)
	BA	KIN	IBA			
Kotiledon	1	-	0	73,68 <sup>de</sup>	3,36 ± 0,54 <sup>h</sup>	<b>2,48</b>
	1	-	0,1	72,22 <sup>e</sup>	4,18 ± 0,54 <sup>de</sup>	<b>3,02</b>
	1	-	0,2	47,22 <sup>lm</sup>	3,35 ± 0,23 <sup>h</sup>	<b>1,58</b>
	0,5	-	0,1	65,00 <sup>f</sup>	4,23 ± 0,63 <sup>cd</sup>	<b>2,75</b>
	0,5	-	0,2	80,00 <sup>b</sup>	4,06 ± 0,63 <sup>e</sup>	<b>3,25</b>
	-	1	0	85,00 <sup>a</sup>	5,47 ± 0,89 <sup>a</sup>	<b>4,65</b>
	-	1	0,1	54,55 <sup>ij</sup>	3,15 ± 0,46 <sup>i</sup>	<b>1,72</b>
	-	1	0,2	75,00 <sup>cd</sup>	2,26 ± 0,27 <sup>no</sup>	<b>1,70</b>
	-	0,5	0,1	34,62 <sup>o</sup>	2,22 ± 0,38 <sup>nop</sup>	<b>0,77</b>
	-	0,5	0,2	31,58 <sup>p</sup>	2,33 ± 0,38 <sup>n</sup>	<b>0,74</b>
Hipokotil	1	-	0	59,09 <sup>g</sup>	3,54 ± 0,69 <sup>g</sup>	<b>2,09</b>
	1	-	0,1	72,73 <sup>de</sup>	2,13 ± 0,38 <sup>opq</sup>	<b>1,55</b>
	1	-	0,2	76,67 <sup>c</sup>	3,09 ± 0,37 <sup>ij</sup>	<b>2,37</b>
	0,5	-	0,1	41,67 <sup>n</sup>	2,10 ± 0,56 <sup>pq</sup>	<b>0,88</b>
	0,5	-	0,2	48,39 <sup>l</sup>	3,00 ± 0,58 <sup>jk</sup>	<b>1,45</b>
	-	1	0	51,52 <sup>k</sup>	2,12 ± 0,34 <sup>pq</sup>	<b>1,09</b>
	-	1	0,1	53,57 <sup>jk</sup>	2,87 ± 0,48 <sup>kl</sup>	<b>1,54</b>
	-	1	0,2	56,25 <sup>hi</sup>	2,17 ± 0,35 <sup>op</sup>	<b>1,22</b>
	-	0,5	0,1	58,06 <sup>gh</sup>	1,78 ± 0,23 <sup>r</sup>	<b>1,03</b>
	-	0,5	0,2	34,62 <sup>o</sup>	2,56 ± 0,46 <sup>m</sup>	<b>0,89</b>
Koren	1	-	0	21,74 <sup>q</sup>	5,20 ± 0,91 <sup>b</sup>	<b>1,13</b>
	1	-	0,1	42,11 <sup>n</sup>	4,33 ± 0,76 <sup>c</sup>	<b>1,82</b>
	1	-	0,2	57,14 <sup>gh</sup>	2,00 ± 0,59 <sup>q</sup>	<b>1,14</b>
	0,5	-	0,1	45,45 <sup>m</sup>	2,80 ± 0,82 <sup>l</sup>	<b>1,27</b>
	0,5	-	0,2	40,00 <sup>n</sup>	3,83 ± 0,44 <sup>f</sup>	<b>1,53</b>
	-	1	0	0 <sup>s</sup>	0 <sup>s</sup>	<b>0</b>
	-	1	0,1	0 <sup>s</sup>	0 <sup>s</sup>	<b>0</b>
	-	1	0,2	14,81 <sup>r</sup>	2,50 ± 0,43 <sup>m</sup>	<b>0,37</b>
	-	0,5	0,1	0 <sup>s</sup>	0 <sup>s</sup>	<b>0</b>
	-	0,5	0,2	0 <sup>s</sup>	0 <sup>s</sup>	<b>0</b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=22-36. Vrednosti označene različitim slovima u okviru iste kolone su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05)

**Tabela 4.3.** Uticaj regulatora rasteња i tipa eksplantata na regeneraciju adventivnih pupoljaka kod kelja (cv. Vertus).

Eksplantat	Regulatori rasteња (mg l <sup>-1</sup> )			Frekvencija regeneracije (RF, %)	Srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP)*	Indeks regeneracije (IR)
	BA	KIN	IBA			
Kotiledon	1	-	0	63,64 <sup>e</sup>	5,38 ± 0,78 <sup>c</sup>	<b>3,42</b>
	1	-	0,1	68,42 <sup>d</sup>	2,60 ± 0,61 <sup>k</sup>	<b>1,78</b>
	1	-	0,2	21,74 <sup>p</sup>	3,54 ± 0,40 <sup>gh</sup>	<b>0,77</b>
	0,5	-	0,1	60,87 <sup>f</sup>	1,86 ± 0,22 <sup>n</sup>	<b>1,13</b>
	0,5	-	0,2	48,15 <sup>hi</sup>	5,59 ± 0,89 <sup>b</sup>	<b>2,69</b>
	-	1	0	43,48 <sup>kl</sup>	2,13 ± 0,33 <sup>m</sup>	<b>0,93</b>
	-	1	0,1	24,24 <sup>o</sup>	3,50 ± 0,88 <sup>h</sup>	<b>0,85</b>
	-	1	0,2	30,77 <sup>n</sup>	1,29 ± 0,16 <sup>p</sup>	<b>0,40</b>
	-	0,5	0,1	44,00 <sup>jk</sup>	2,09 ± 0,33 <sup>m</sup>	<b>0,92</b>
	-	0,5	0,2	50,00 <sup>h</sup>	2,11 ± 0,40 <sup>m</sup>	<b>1,06</b>
Hipokotil	1	-	0	71,43 <sup>c</sup>	5,17 ± 0,48 <sup>d</sup>	<b>3,69</b>
	1	-	0,1	91,67 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,55 <sup>e</sup>	<b>4,54</b>
	1	-	0,2	85,71 <sup>b</sup>	4,79 ± 0,57 <sup>f</sup>	<b>4,11</b>
	0,5	-	0,1	44,44 <sup>jk</sup>	1,88 ± 0,60 <sup>n</sup>	<b>0,84</b>
	0,5	-	0,2	87,50 <sup>b</sup>	6,14 ± 0,71 <sup>a</sup>	<b>5,37</b>
	-	1	0	46,15 <sup>ij</sup>	1,83 ± 0,20 <sup>n</sup>	<b>0,84</b>
	-	1	0,1	62,86 <sup>ef</sup>	3,16 ± 0,48 <sup>i</sup>	<b>1,99</b>
	-	1	0,2	71,43 <sup>c</sup>	1,95 ± 0,19 <sup>n</sup>	<b>1,39</b>
	-	0,5	0,1	50,00 <sup>h</sup>	1,60 ± 0,28 <sup>o</sup>	<b>0,80</b>
	-	0,5	0,2	52,94 <sup>g</sup>	1,67 ± 0,27 <sup>o</sup>	<b>0,88</b>
Koren	1	-	0	37,21 <sup>m</sup>	2,50 ± 0,39 <sup>kl</sup>	<b>0,93</b>
	1	-	0,1	50,00 <sup>h</sup>	2,90 ± 0,68 <sup>j</sup>	<b>1,45</b>
	1	-	0,2	50,00 <sup>h</sup>	3,64 ± 0,55 <sup>g</sup>	<b>1,82</b>
	0,5	-	0,1	41,67 <sup>l</sup>	2,17 ± 0,60 <sup>m</sup>	<b>0,90</b>
	0,5	-	0,2	50,00 <sup>h</sup>	3,00 ± 0,60 <sup>j</sup>	<b>1,50</b>
	-	1	0	29,17 <sup>n</sup>	2,43 ± 0,34 <sup>l</sup>	<b>0,71</b>
	-	1	0,1	21,88 <sup>p</sup>	3,15 ± 0,69 <sup>i</sup>	<b>0,69</b>
	-	1	0,2	54,17 <sup>g</sup>	1,14 ± 0,13 <sup>q</sup>	<b>0,62</b>
	-	0,5	0,1	0 <sup>q</sup>	0 <sup>r</sup>	<b>0</b>
	-	0,5	0,2	0 <sup>q</sup>	0 <sup>r</sup>	<b>0</b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=22-36. Vrednosti označene različitim slovima u okviru iste kolone su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05)

**Tabela 4.4.** Uticaj regulatora rastinja i tipa eksplantata na regeneraciju adventivnih pupoljaka kod brokolija (cv. Korvet).

Eksplantat	Regulatori rastinja (mg l <sup>-1</sup> )			Frekvenca regeneracije (RF, %)	Srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP) *	Indeks regeneracije (IR)
	BA	KIN	IBA			
Kotiledon	1	-	0	10,00 <sup>n</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>k</sup>	<b>0,20</b>
	1	-	0,1	4,76 <sup>o</sup>	1,75 ± 0,41 <sup>l</sup>	<b>0,08</b>
	1	-	0,2	20,00 <sup>k</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>k</sup>	<b>0,40</b>
	0,5	-	0,1	17,65 <sup>l</sup>	3,67 ± 0,76 <sup>f</sup>	<b>0,65</b>
	0,5	-	0,2	25,00 <sup>j</sup>	3,20 ± 0,87 <sup>h</sup>	<b>0,80</b>
	-	1	0	31,82 <sup>h</sup>	1,29 ± 0,26 <sup>n</sup>	<b>0,41</b>
	-	1	0,1	11,54 <sup>m</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>o</sup>	<b>0,12</b>
	-	1	0,2	5,00 <sup>o</sup>	2,00 ± 0,47 <sup>k</sup>	<b>0,10</b>
	-	0,5	0,1	10,00 <sup>n</sup>	1,50 ± 0,35 <sup>m</sup>	<b>0,15</b>
	-	0,5	0,2	29,41 <sup>i</sup>	1,40 ± 0,22 <sup>mn</sup>	<b>0,41</b>
Hipokotil	1	-	0	57,14 <sup>d</sup>	7,38 ± 0,76 <sup>a</sup>	<b>4,22</b>
	1	-	0,1	83,87 <sup>a</sup>	5,14 ± 0,62 <sup>c</sup>	<b>4,31</b>
	1	-	0,2	67,74 <sup>b</sup>	6,23 ± 1,00 <sup>b</sup>	<b>4,22</b>
	0,5	-	0,1	43,48 <sup>g</sup>	3,20 ± 0,70 <sup>h</sup>	<b>1,39</b>
	0,5	-	0,2	58,06 <sup>d</sup>	2,72 ± 0,42 <sup>i</sup>	<b>1,58</b>
	-	1	0	48,39 <sup>f</sup>	2,13 ± 0,40 <sup>j</sup>	<b>1,03</b>
	-	1	0,1	61,90 <sup>c</sup>	5,00 ± 0,86 <sup>d</sup>	<b>3,10</b>
	-	1	0,2	50,00 <sup>e</sup>	1,78 ± 0,21 <sup>l</sup>	<b>0,89</b>
	-	0,5	0,1	25,00 <sup>j</sup>	4,43 ± 0,72 <sup>e</sup>	<b>1,11</b>
	-	0,5	0,2	47,83 <sup>f</sup>	2,09 ± 0,27 <sup>jk</sup>	<b>1,00</b>
Koren	1	-	0	0 <sup>p</sup>	0 <sup>p</sup>	<b>0</b>
	1	-	0,1	0 <sup>p</sup>	0 <sup>p</sup>	<b>0</b>
	1	-	0,2	0 <sup>p</sup>	0 <sup>p</sup>	<b>0</b>
	0,5	-	0,1	9,09 <sup>n</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>o</sup>	<b>0,09</b>
	0,5	-	0,2	0 <sup>p</sup>	0 <sup>p</sup>	<b>0</b>
	-	1	0	0 <sup>p</sup>	0 <sup>p</sup>	<b>0</b>
	-	1	0,1	4,55 <sup>o</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>o</sup>	<b>0,05</b>
	-	1	0,2	16,67 <sup>l</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>o</sup>	<b>0,17</b>
	-	0,5	0,1	11,76 <sup>m</sup>	3,5 ± 0,35 <sup>g</sup>	<b>0,41</b>
	-	0,5	0,2	0 <sup>p</sup>	0 <sup>p</sup>	<b>0</b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=22-32. Vrednosti označene različitim slovima u okviru iste kolone su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05)

**Tabela 4.5.** Uticaj regulatora rastinja i tipa eksplantata na regeneraciju adventivnih pupoljaka kod crvenog kupusa (cv. Rubin).

Eksplantat	Regulatori rastinja (mg l <sup>-1</sup> )			Frekvencija regeneracije (RF, %)	Srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP)*	Indeks regeneracije (IR)
	BA	KIN	IBA			
Kotiledon	1	-	0	28,57 <sup>m</sup>	1,50 ± 0,20 <sup>k</sup>	<b>0,46</b>
	1	-	0,1	40,91 <sup>j</sup>	2,00 ± 0,42 <sup>j</sup>	<b>0,82</b>
	1	-	0,2	50,00 <sup>e</sup>	2,10 ± 0,26 <sup>ij</sup>	<b>1,05</b>
	0,5	-	0,1	53,85 <sup>d</sup>	2,71 ± 0,31 <sup>g</sup>	<b>1,46</b>
	0,5	-	0,2	50,00 <sup>e</sup>	2,90 ± 0,56 <sup>f</sup>	<b>1,45</b>
	-	1	0	5,00 <sup>t</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>j</sup>	<b>0,10</b>
	-	1	0,1	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	-	1	0,2	15,00 <sup>r</sup>	1,67 ± 0,54 <sup>k</sup>	<b>0,25</b>
	-	0,5	0,1	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	-	0,5	0,2	18,75 <sup>p</sup>	1,67 ± 0,27 <sup>k</sup>	<b>0,31</b>
Hipokotil	1	-	0	74,19 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,51 <sup>c</sup>	<b>2,84</b>
	1	-	0,1	54,84 <sup>d</sup>	5,24 ± 0,70 <sup>a</sup>	<b>2,87</b>
	1	-	0,2	70,00 <sup>b</sup>	5,00 ± 0,83 <sup>b</sup>	<b>3,50</b>
	0,5	-	0,1	42,86 <sup>i</sup>	3,33 ± 0,57 <sup>d</sup>	<b>1,43</b>
	0,5	-	0,2	48,28 <sup>f</sup>	5,29 ± 0,64 <sup>a</sup>	<b>2,55</b>
	-	1	0	37,93 <sup>k</sup>	2,18 ± 0,53 <sup>i</sup>	<b>0,83</b>
	-	1	0,1	66,67 <sup>c</sup>	3,06 ± 0,21 <sup>e</sup>	<b>2,04</b>
	-	1	0,2	32,14 <sup>l</sup>	2,67 ± 0,67 <sup>g</sup>	<b>0,86</b>
	-	0,5	0,1	44,83 <sup>h</sup>	2,77 ± 0,57 <sup>g</sup>	<b>1,24</b>
	-	0,5	0,2	22,22 <sup>o</sup>	1,25 ± 0,22 <sup>l</sup>	<b>0,26</b>
Koren	1	-	0	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	1	-	0,1	13,64 <sup>r</sup>	2,33 ± 0,27 <sup>h</sup>	<b>0,32</b>
	1	-	0,2	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	0,5	-	0,1	25,00 <sup>n</sup>	3,33 ± 0,27 <sup>d</sup>	<b>0,83</b>
	0,5	-	0,2	16,67 <sup>q</sup>	2,67 ± 0,72 <sup>g</sup>	<b>0,45</b>
	-	1	0	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	-	1	0,1	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	-	1	0,2	46,67 <sup>g</sup>	2,43 ± 0,49 <sup>h</sup>	<b>1,13</b>
	-	0,5	0,1	0 <sup>u</sup>	0 <sup>n</sup>	<b>0</b>
	-	0,5	0,2	9,09 <sup>s</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>m</sup>	<b>0,9</b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=22-32. Vrednosti označene različitim slovima u okviru iste kolone su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05)

**Tabela 4.6.** Uticaj regulatora rasteња i tipa eksplantata na regeneraciju adventivnih pupoljaka kod belog kupusa (linija K7-L).

Eksplantat	Regulatori rasteња (mg l <sup>-1</sup> )			Frekvencija regeneracije (RF, %)	Srednji broj pupoljaka po eksplantatu (SBP)*	Indeks regeneracije (IR)
	BA	KIN	IBA			
Kotiledon	1	-	0	55,00 <sup>f</sup>	3,09 ± 0,37 <sup>f</sup>	<b>1,70</b>
	1	-	0,1	65,00 <sup>bc</sup>	3,77 ± 0,53 <sup>d</sup>	<b>2,45</b>
	1	-	0,2	58,33 <sup>de</sup>	2,36 ± 0,41 <sup>i</sup>	<b>1,38</b>
	0,5	-	0,1	65,00 <sup>bc</sup>	4,08 ± 0,37 <sup>c</sup>	<b>2,65</b>
	0,5	-	0,2	45,00 <sup>h</sup>	4,57 ± 0,79 <sup>b</sup>	<b>2,06</b>
	-	1	0	26,09 <sup>m</sup>	1,67 ± 0,45 <sup>l</sup>	<b>0,44</b>
	-	1	0,1	28,00 <sup>l</sup>	2,00 ± 0,40 <sup>j</sup>	<b>0,56</b>
	-	1	0,2	15,79 <sup>o</sup>	1,33 ± 0,27 <sup>m</sup>	<b>0,21</b>
	-	0,5	0,1	14,29 <sup>op</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>j</sup>	<b>0,29</b>
	-	0,5	0,2	31,25 <sup>k</sup>	1,80 ± 0,72 <sup>k</sup>	<b>0,56</b>
Hipokotil	1	-	0	41,38 <sup>i</sup>	4,00 ± 0,41 <sup>c</sup>	<b>1,66</b>
	1	-	0,1	57,14 <sup>e</sup>	3,38 ± 0,39 <sup>e</sup>	<b>1,93</b>
	1	-	0,2	85,71 <sup>a</sup>	3,79 ± 0,34 <sup>d</sup>	<b>3,25</b>
	0,5	-	0,1	66,67 <sup>b</sup>	4,85 ± 0,62 <sup>a</sup>	<b>3,23</b>
	0,5	-	0,2	64,52 <sup>c</sup>	4,55 ± 0,80 <sup>b</sup>	<b>2,94</b>
	-	1	0	36,36 <sup>j</sup>	2,67 ± 0,60 <sup>g</sup>	<b>0,97</b>
	-	1	0,1	60,00 <sup>d</sup>	4,00 ± 0,80 <sup>c</sup>	<b>2,40</b>
	-	1	0,2	59,09 <sup>d</sup>	2,54 ± 0,49 <sup>h</sup>	<b>1,50</b>
	-	0,5	0,1	45,00 <sup>h</sup>	2,78 ± 0,58 <sup>g</sup>	<b>1,25</b>
	-	0,5	0,2	34,48 <sup>j</sup>	3,10 ± 0,82 <sup>f</sup>	<b>1,07</b>
Koren	1	-	0	10,00 <sup>r</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>j</sup>	<b>0,20</b>
	1	-	0,1	15,79 <sup>o</sup>	2,00 ± 0,82 <sup>j</sup>	<b>0,32</b>
	1	-	0,2	0 <sup>s</sup>	0 <sup>o</sup>	<b>0</b>
	0,5	-	0,1	47,37 <sup>g</sup>	1,56 ± 0,23 <sup>l</sup>	<b>0,74</b>
	0,5	-	0,2	46,15 <sup>gh</sup>	1,67 ± 0,19 <sup>l</sup>	<b>0,77</b>
	-	1	0	11,11 <sup>qr</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>n</sup>	<b>0,11</b>
	-	1	0,1	12,50 <sup>pq</sup>	2,67 ± 0,54 <sup>g</sup>	<b>0,33</b>
	-	1	0,2	0 <sup>s</sup>	0 <sup>o</sup>	<b>0</b>
	-	0,5	0,1	0 <sup>s</sup>	0 <sup>o</sup>	<b>0</b>
	-	0,5	0,2	18,18 <sup>n</sup>	2,50 ± 0,35 <sup>h</sup>	<b>0,45</b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=22-32. Vrednosti označene različitim slovima u okviru iste kolone su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05)



Iako je BA bio najefikasniji citokinin za regeneraciju kod većine varijeteta, s druge strane, prisustvo BA u podlogama uzrokovalo je pojavu vitrifikacije pupoljaka u visokom procentu (preko 50%), posebno kod karfiola i kelja. U cilju smanjenja vitrifikacije pupoljaka segmenti hipokotila sva četiri ispitivana varijeteta *B. oleracea* postavljeni su na MS podloge sa 1,0 mg l<sup>-1</sup> BA i 1,0 mg l<sup>-1</sup> BA + 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA koje su sadržale agar u povišenoj koncentraciji 0,8 %.

**Tabela 4.7.** Uticaj povećanja koncentracije agara u podlozi sa BA na vitrifikaciju kod različitih varijeteta *B. oleracea*.

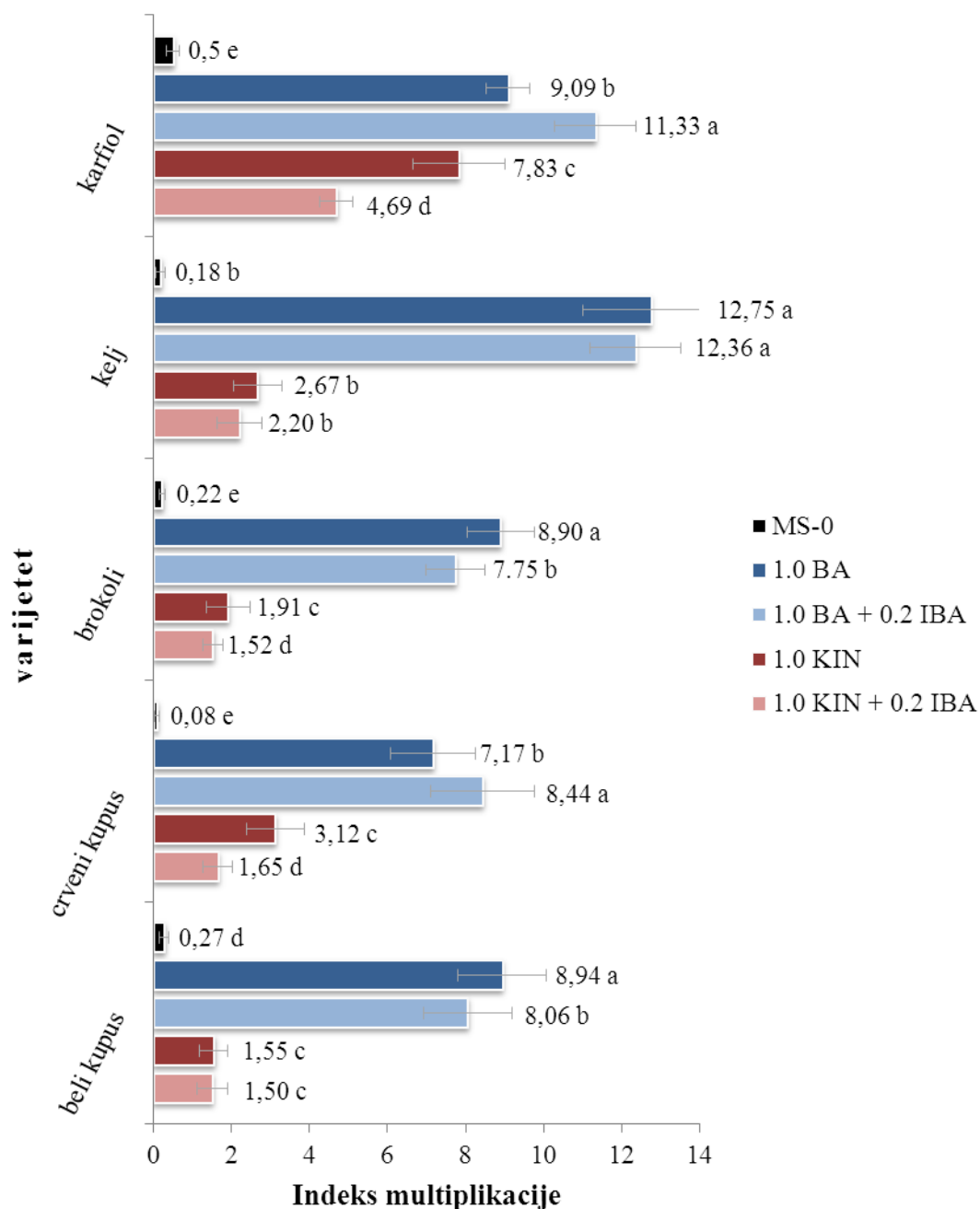
Varijetet	RR (mg l <sup>-1</sup> )		Agar (%)		RF (%)	SBP*	Vitrifikacija (%)
	BA	IBA	0,7	0,8			
<b>Karfiol</b>	1,0	-	+		59,09 <sup>b</sup>	3,54 ± 0,69 <sup>a</sup>	80,43 <sup>a</sup>
				+	78,50 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,21 <sup>b</sup>	<b>45,20<sup>b</sup></b>
	1,0	0,2	+		76,67 <sup>A</sup>	3,09 ± 0,37 <sup>A</sup>	53,52 <sup>A</sup>
				+	67,50 <sup>B</sup>	3,00 ± 0,41 <sup>A</sup>	<b>46,91<sup>B</sup></b>
<b>Kelj</b>	1,0	-	+		71,43 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,48 <sup>a</sup>	75,69 <sup>a</sup>
				+	75,00 <sup>a</sup>	4,17 ± 0,54 <sup>b</sup>	<b>69,33<sup>a</sup></b>
	1,0	0,2	+		85,71 <sup>A</sup>	4,79 ± 0,57 <sup>A</sup>	80,00 <sup>A</sup>
				+	90,00 <sup>A</sup>	4,67 ± 0,76 <sup>A</sup>	<b>51,19<sup>B</sup></b>
<b>Brokoli</b>	1,0	-	+		57,14 <sup>b</sup>	7,38 ± 0,76 <sup>a</sup>	69,49 <sup>a</sup>
				+	65,00 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,27 <sup>b</sup>	<b>0<sup>b</sup></b>
	1,0	0,2	+		67,74 <sup>A</sup>	6,23 ± 1,00 <sup>A</sup>	59,26 <sup>A</sup>
				+	51,16 <sup>B</sup>	2,95 ± 0,42 <sup>B</sup>	<b>0<sup>B</sup></b>
<b>Crveni kupus</b>	1,0	-	+		74,19 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,51 <sup>a</sup>	63,64 <sup>a</sup>
				+	80,00 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,76 <sup>a</sup>	<b>50,80<sup>a</sup></b>
	1,0	0,2	+		70,00 <sup>A</sup>	5,00 ± 0,83 <sup>A</sup>	47,14 <sup>A</sup>
				+	31,25 <sup>B</sup>	2,00 ± 0,59 <sup>B</sup>	<b>30,00<sup>B</sup></b>
<b>Beli kupus</b>	1,0	-	+		41,38 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,41 <sup>a</sup>	41,67 <sup>a</sup>
				+	33,80 <sup>b</sup>	3,60 ± 0,69 <sup>b</sup>	<b>35,20<sup>b</sup></b>
	1,0	0,2	+		85,71 <sup>A</sup>	3,79 ± 0,34 <sup>A</sup>	56,04 <sup>A</sup>
				+	80,00 <sup>A</sup>	2,60 ± 0,23 <sup>B</sup>	<b>48,30<sup>B</sup></b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=30. RR – regulatori rasteža. Vrednosti označene različitim slovima u okviru jednog varijeteta i jedne podloge su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05). Velika slova se odnose na razlike na podlozi sa BA 1,0 mg l<sup>-1</sup>, a mala na podlozi sa BA 1,0 mg l<sup>-1</sup> + IBA 0,2 mg l<sup>-1</sup>.

Kao što se može videti na osnovu podataka iz Tabele 4.7, povećanje koncentracije agara u podlozi dovelo je do smanjenja vitifikacije od 6,4% kod kelja, a kod brokolija je potpuno suzbijena. Međutim, sa druge strane povećanje koncentracije agara dovelo je kod nekih varijeteta do smanjenja frekvence regeneracije, a kod svih i broja pupoljaka regenerisanih po eksplantatu. Najveći pad RF je zabeležen kod crvenog kupusa na podlozi sa 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA, gde je frekvencija regeneracije 80% na podlozi sa 0,7% agara, opala na 31,25% na podlozi sa povećanom koncentracijom agara (Tabela 4.7).

#### **4.1.2. Umnožavanje regenerisanih pupoljaka**

Radi umnožavanja regenerisani pupoljci su prebacivani na MS podlogu koja je sadržala BA ili KIN u koncentraciji 0 i 1 mg l<sup>-1</sup> u kombinaciji sa 0 i 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA. Na podlogama za multiplikaciju pupoljci su gajeni 4 nedelje nakon čega je utvrđivan broj novoformiranih pupoljaka. Na podlozi bez regulatora rastezanja (MS-0) indeks multiplikacije (IM) je bio nizak i iznosio je od 0,08 kod crvenog kupusa do 0,5 kod karfiola (Slika 4.3), što je ukazalo na potrebu upotrebe citokinina radi postizanja boljeg umnožavanja. Na osnovu dobijenih rezultata (Slika 4.3) možemo zaključiti da je i u postupku mikropropagacije primena BA (samostalno ili u kombinaciji sa IBA) imala bolji efekat na umnožavanje od KIN (IM kod svih varijeteta, izuzev karfiola, je bio ispod 4,5). Najveći IM zabeleženi je kod kelja (12,75) na podlozi sa BA. Kod karfiola i crvenog kupusa najbolja podloga za umnožavanje pupoljaka je bila MS+1,0 mg l<sup>-1</sup> BA + 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA, dok su kod kelja, brokolija i belog kupusa najveći IM postignuti na MS podlozi sa 1,0 mg l<sup>-1</sup> BA.



**Slika 4.3.** Indeks multiplikacije regenerisanih pupoljaka različitih varijeteta *B. oleracea*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška; n=30. Vrednosti označene različitim slovima u okviru istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3. Ožiljavanje i aklimatizacija *in vitro* regenerisaih biljaka

Radi ožiljavanja izdanci visine oko 3 cm su prebacivani na MS podlogu sa dodatkom IBA u koncentraciji 0, 1, 2 ili 4 mg l<sup>-1</sup> i gajeni 3 nedelje. Takođe, testiran je i uticaj dve različite koncentracije saharoze (2 i 4%) na proces ožiljavanja. Na MS-0 podlogama ožiljavanje izdanaka je bilo 100% kod svih varijeteta, izuzev kod karfiola na podlozi sa 2% saharoze (75%) i kelja na podlozi sa 4% saharoze (85%) (Tabela 4.8). Dodatak IBA u koncentracijama od 1 i 2 mg l<sup>-1</sup> kod većine varijeteta nije uticao na procenat ožiljenih biljaka, ali je stimulisalo ožiljavanje kod karfiola na podlozi sa 2% saharoze. Dodavanje IBA u koncentraciji od 4 mg l<sup>-1</sup> dovodilo je do smanjenja procenta ožiljavanja kod svih varijeteta. Kod biljaka karfiola i brokolija je IBA dovodila do povećanja broja korenova po biljci, ali je u isto vreme uticala na smanjenje dužine najdužeg korena sem kod karfiola na 2% saharoze i belog kupusa na 4% saharoze (Tabela 4.8, Slika 4.4a,b). Kod svih varijeteta optimalna podloga za ožiljavanje u pogledu broja korenova i dužine korena, je bila ona sa 1 mg l<sup>-1</sup> ili 2 mg l<sup>-1</sup> IBA, zavisno od koncentracije saharoze u podlozi. Povećana koncentracija saharoze od 4% dovodila je do pojave malog kalusa u bazi izdanaka, ali nije zapažen značajan uticaj na procenat ožiljenih biljaka, izuzev kod kelja (Tabela 4.8).



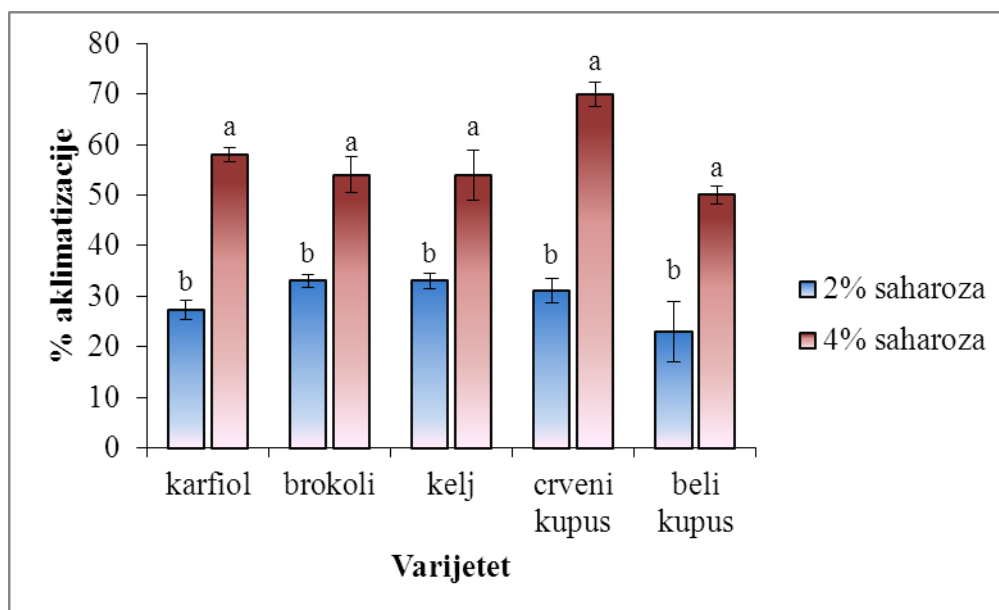
**Slika 4.4.** Ožiljavanje i aklimatizacija *in vitro* regenerisaih biljaka karfiola na MS podlogama sa različitim koncentracijama IBA (0, 1, 2 i 4 mg l<sup>-1</sup>). Ožiljavanje na podlogama sa 2% saharozom (a); ožiljavanje na podlogama sa 4% saharozom (b); aklimatizovane biljke u uslovima fitokomore stare 4 nedelje (c).

**Tabela 4.8.** Uticaj saharoze i IBA na ožiljavanje izdanaka različitih varijeteta *B. oleracea*, nakon 3 nedelje gajenja na podlozi za ožiljavanje.

Varijetet	Saharoza (%)	IBA (mg l <sup>-1</sup> )	Ožiljavanje (%)	Broj korenova po izdanku*	Dužina korena (mm)*
Karfiol	2%	0	75 <sup>b</sup>	18,7 ± 2,3 <sup>d</sup>	35,0 ± 0,8 <sup>b</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	17,0 ± 6,0 <sup>e</sup>	32,0 ± 5,5 <sup>c</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	21,5 ± 1,8 <sup>c</sup>	37,0 ± 5,7 <sup>a</sup>
		4	75 <sup>b</sup>	10,0 ± 2,5 <sup>f</sup>	38,0 ± 7,4 <sup>a</sup>
	4%	0	100 <sup>a</sup>	16,8 ± 1,1 <sup>e</sup>	26,5 ± 3,4 <sup>d</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	34,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	33,5 ± 3,2 <sup>bc</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	33,0 ± 2,8 <sup>b</sup>	24,0 ± 0,7 <sup>e</sup>
		4	60 <sup>c</sup>	33,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	25,0 ± 2,1 <sup>de</sup>
Kelj	2%	0	100 <sup>a</sup>	9,4 ± 2,3 <sup>b</sup>	47,4 ± 7,6 <sup>b</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,9 <sup>e</sup>	38,6 ± 8,2 <sup>d</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	10,0 ± 2,5 <sup>a</sup>	46,0 ± 8,5 <sup>bc</sup>
		4	80 <sup>c</sup>	9,0 ± 2,0 <sup>bc</sup>	30,3 ± 5,9 <sup>e</sup>
	4%	0	85 <sup>b</sup>	8,8 ± 1,7 <sup>c</sup>	57,0 ± 5,2 <sup>a</sup>
		1	60 <sup>d</sup>	8,7 ± 2,9 <sup>c</sup>	46,7 ± 6,9 <sup>b</sup>
		2	85 <sup>b</sup>	7,6 ± 1,6 <sup>d</sup>	44,4 ± 4,5 <sup>c</sup>
		4	80 <sup>c</sup>	8,8 ± 1,9 <sup>c</sup>	29,5 ± 5,0 <sup>e</sup>
Brokoli	2%	0	100 <sup>a</sup>	12,0 ± 2,8 <sup>f</sup>	35,4 ± 1,5 <sup>c</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	17,8 ± 3,2 <sup>d</sup>	34,2 ± 1,8 <sup>cd</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	24,8 ± 3,7 <sup>a</sup>	24,2 ± 1,7 <sup>f</sup>
		4	80 <sup>b</sup>	25,3 ± 5,4 <sup>a</sup>	19,8 ± 3,8 <sup>g</sup>
	4%	0	100 <sup>a</sup>	13,8 ± 2,7 <sup>e</sup>	50,0 ± 5,0 <sup>a</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	17,8 ± 2,8 <sup>d</sup>	32,8 ± 3,9 <sup>d</sup>
		2	80 <sup>b</sup>	19,0 ± 2,1 <sup>c</sup>	39,3 ± 5,0 <sup>b</sup>
		4	100 <sup>a</sup>	21,4 ± 2,9 <sup>b</sup>	26,8 ± 3,7 <sup>e</sup>
Crveni kupus	2%	0	100 <sup>a</sup>	24,0 ± 4,9 <sup>c</sup>	60,5 ± 2,5 <sup>a</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	26,0 ± 1,8 <sup>b</sup>	36,5 ± 4,6 <sup>d</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,7 <sup>e</sup>	24,5 ± 1,8 <sup>f</sup>
		4	50 <sup>b</sup>	16,0 ± 0,7 <sup>d</sup>	19,5 ± 1,8 <sup>g</sup>
	4%	0	100 <sup>a</sup>	28,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	48,5 ± 1,1 <sup>b</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	16,0 ± 0,7 <sup>d</sup>	47,0 ± 4,9 <sup>b</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	9,5 ± 2,5 <sup>f</sup>	32,5 ± 7,4 <sup>e</sup>
		4	50 <sup>b</sup>	28,5 ± 1,8 <sup>a</sup>	41,0 ± 2,1 <sup>c</sup>
Beli kupus	2%	0	100 <sup>a</sup>	7,3 ± 1,4 <sup>h</sup>	32,5 ± 3,0 <sup>a</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	17,0 ± 2,4 <sup>c</sup>	25,0 ± 2,0 <sup>c</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	11,0 ± 1,4 <sup>g</sup>	17,0 ± 2,6 <sup>e</sup>
		4	75 <sup>b</sup>	12,0 ± 1,7 <sup>f</sup>	22,7 ± 1,9 <sup>d</sup>
	4%	0	100 <sup>a</sup>	25,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	31,7 ± 1,7 <sup>a</sup>
		1	100 <sup>a</sup>	14,0 ± 1,4 <sup>e</sup>	31,3 ± 3,1 <sup>ab</sup>
		2	100 <sup>a</sup>	15,5 ± 2,4 <sup>d</sup>	30,3 ± 2,1 <sup>b</sup>
		4	50 <sup>c</sup>	19,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	32,0 ± 1,4 <sup>a</sup>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=20. Vrednosti označene različitim slovima u okviru iste kolone istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ )

Ožiljene biljke su nakon spiranja hranjive podloge zasađene u sterilni supstrat (Slika 4.4 c). Pokazalo se da uspešno ožiljavanje (ako se posmatra broj i dužina korena) nije bilo uvek u korelaciji sa uspešnom aklimatizacijom. Rezultati su pokazali da povećan sadržaja saharoze u podlozi za ožiljavanje ima pozitivan efekat na aklimatizaciju, jer je u proseku preko 50% biljaka ožiljenih na podlozi sa 4% saharoze uspešno aklimatizovano u poređenju sa 30% aklimatizovanih biljaka ožiljenih na podlogama sa 2% saharoze (Slika 4.5).

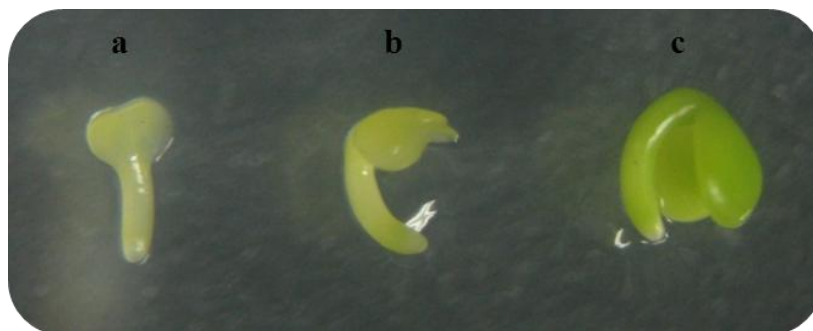


**Slika 4.5.** Procenat aklimatizacije biljaka različitih varijeteta *B. oleracea* ožiljenih na podlogama sa 2% i 4% saharoze. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška; n=12. Vrednosti označene različitim slovima u okviru istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ ).

## 4.2. USPOSTAVLJANJE SOMATSKJE EMBRIOGENEZE IZ NEZRELIH ZIGOTSKIH EMBRIONA

### 4.2.1. *In vitro* indukcija somatske embriogeneze

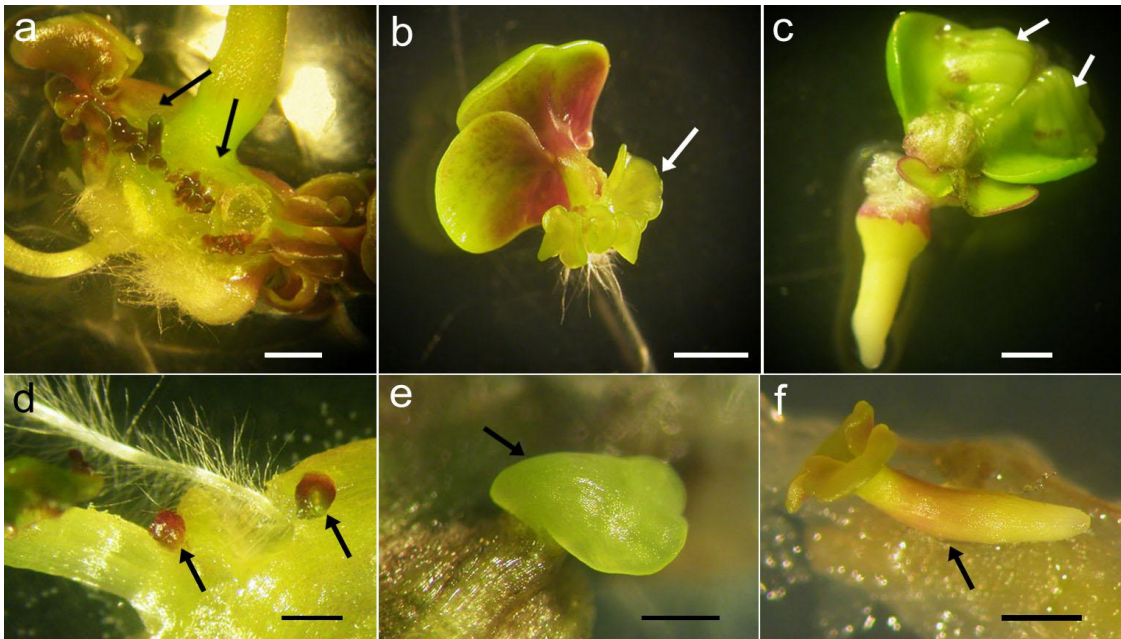
Nezreli zigotski embrioni karfiola (var. Raša) i belog kupusa (linija K7-L) korišćeni su za indukciju somatske embriogeneze. Na osnovu veličine zigotski embrioni su bili podeljeni u tri grupe: rani kotiledonarni (RK) (1,5 mm), kotiledonarni (K) (1,8 mm) i kasni kotiledonarni (KK) (3,0 mm) (Slika 4.6 a,b,c).



**Slika 4.6.** Nezreli zigotski embrioni različitog stadijuma razvića: rani kotiledonarni (a), kotiledonarni (b) i kasni kotiledonarni (c).

Nezreli zigotski embrioni, postavljeni su na B5 podlogu bez regulatora rastjenja (B5-0) ili sa  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D, (B5-D). Na B5-0 podlozi u toku prve tri nedelje gajenja embrioni su rasli formirajući klijance dužine 1,5–3,0 cm, a već nakon 15-20 dana inkubacije na B5-0 primećena je pojava somatskih embriona (SE) direktno na hipokotilu, bez formiranja kalusa. Brojni SE su bili vidljivi uglavnom na donjem delu hipokotila, blizu korena (Slika 4.7 a) ili ređe na sredini hipokotila (Slika 4.7 b). Proces je bio asinhron, pa su se istovremeno na jednom eksplantatu mogli videti somatski embrioni različitih stadijuma razvića (Slika 4.7 d-f). Nakon četiri nedelje gajenja, jasno su bili vidljivi brojni somatski embrioni u kotiledonarnom stadijumu razvića. Oni su nežno odvajani od eksplantata i postavljeni horizontalno na MS-0 podlogu radi inicijacije sekundarne somatske embriogeneze.

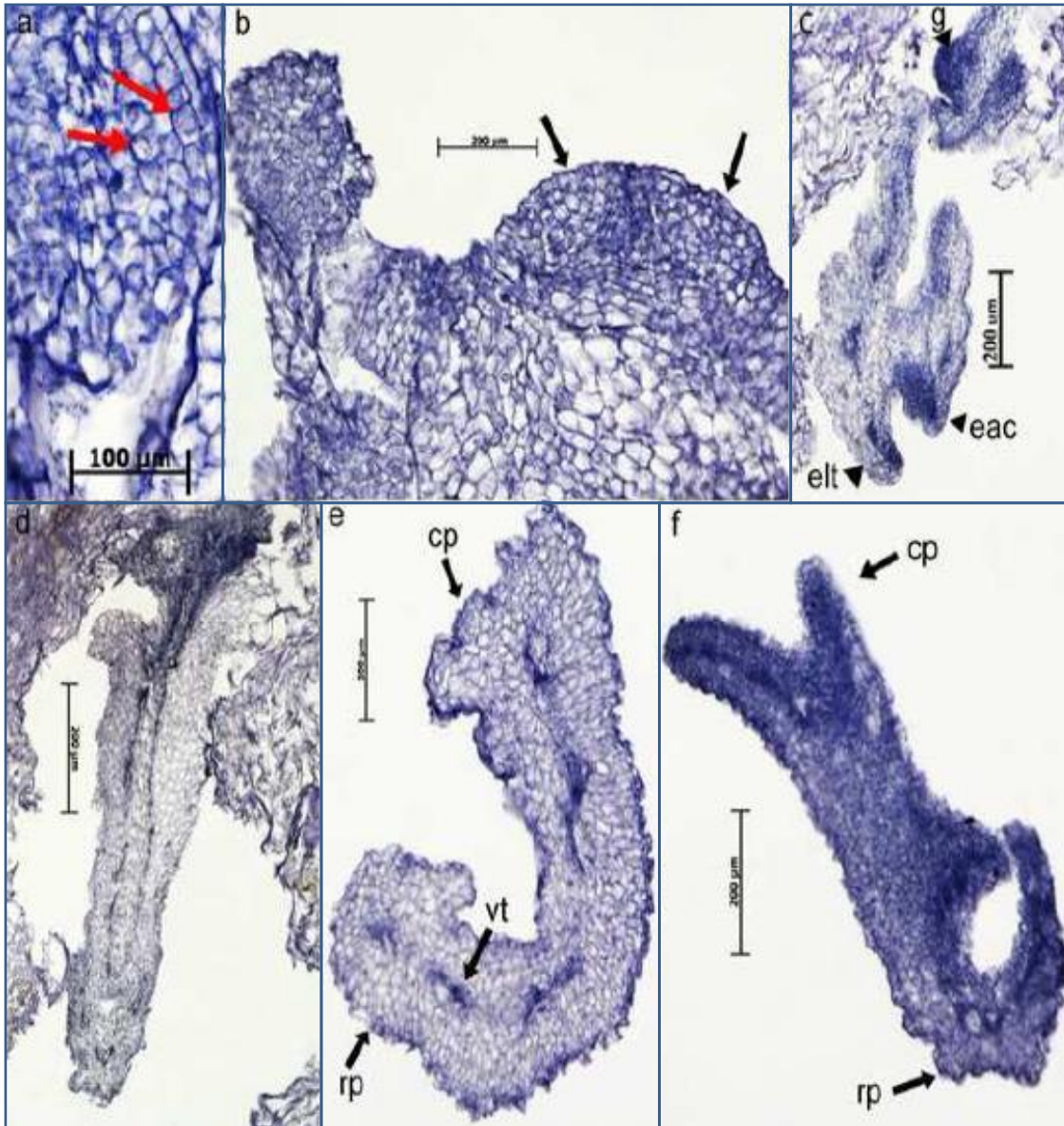
Nezreli zigotski embrioni gajeni na B5-D podlozi, nisu rasli u dužinu već su samo zadebljavali, posebno u regionu hipokotila (Slika 4.7 c). Nakon tri do četiri nedelje gajenja na ovoj podlozi kotiledoni nezrelih embriona su postajali neravni i na njihovoj površini su se javljale protuberance od kojih su neke kasnije okarakterisane kao somatski embrioni (Slika 4.7 c). Ovi SE su često bili međusobno spojeni i bilo ih je jako teško razdvojiti. Nakon prenosa na MS-0 podlogu razvijali su se isto kao i embrioni koji su bili indukovani na B5-0 podlozi.



**Slika 4.7.** Somatska embriogeneza kod karfiola i kupusa. Somatski embrioni (strelice) direktno formirani na donjem delu hipokotila zigotskog embriona kupusa nakon 16 dana gajenja na B5-0 podlozi, bar = 1 mm (a). Somatski embrioni formirani na srednjem delu hipokotila zigotskog embriona karfiola nakon 15 dana gajenja na B5-0 podlozi, bar = 2 mm (b). Grupa somatskih embriona formirana na kotiledonu zigotskog embriona kupusa nakon 21 dana gajenja na B5-D podlozi, bar = 2 mm (c). Somatski embrioni kupusa u različitim stadijumima razvića, globularni (d), srcasti (e), kotiledonarni (f), bar = 1 mm.

Somatski embrioni, koji su se obrazovali na hipokotilima zigotskih embriona gajenim na B5-0 podlozi, formirani su iz ćelija subepidermalnog sloja hipokotila. Ovi regioni mogli su da se prepoznaju po ćelijama sa jasno izraženim jedrom, gustom citoplazmom i intenzivnoj ćelijskoj deobi (Slika 4.8 a). Antiklinalne i periklinalne deobe ćelija su rezultirale formiranje globularnih SE (Slika 4.8 b). Nije dolazilo do formiranja kalusa i globularni embrioni su se formirali direktno iz tkiva hipokotila. Dalja diferencijacija globularnih embriona vodila je pojavi torpedo, srcastog i kotiledonarnog stadijuma razvića (Slika 4.8 c). Pojedini SE indukovani dublje u eksplantatu (materinskom tkivu nezrelog zigotskog embriona) su na površinu izlazili korenom dok su kotiledonima bili vezani za eksplantat (Slika 4.8 d). Nije bilo vaskularne veze između materinskog tkiva i novonastalih SE. U finalnoj fazi diferencijacije kotiledonarni embrioni su imali jasno izraženu polarnost i pokazivali su začetak vaskularizacije (Slika 4.8 e i f).





**Slika 4.8.** Razviće somatskih embriona na B5-0 podlozi kod karfiola i kupusa. Embriogene ćelije sa gustom citoplazmom i istaknutim jedrom u fazi deobe (strelice), bar = 100 µm (a). Početak formiranja globularnih SE (strelice) u meristenskoj zoni, bar = 200 µm (b). Različiti stadijumi razvića somatskih embriona karfiola - globularni (g), izduženi torpedo (elt) i rani kotiledonarni stupanj (eac), bar = 200 µm (c). SE karfiola koji izrasta iz materinskog tkiva korenom, bar = 200 µm (d). SE karfiola (e) i kupusa (f) u fazi klijanja, sa izraženim kotiledonima (cp), primarnim korenom (rp) i začecima vaskularnih elemenata (vt), bar = 200 µm (e-f).

Uspešnost somatske embriogeneze belog kupusa i karfiola iz nezrelih zigotskih embriona prikazana je u Tabeli 4.9.

**Tabela 4.9.** *In vitro* indukcija somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona u različitim stadijumima razvića kod dva varijeteta *B.oleracea*, nakon 4 nedelje gajenja na induktivnoj podlozi.

Varijetet <i>B. oleracea</i>	Tretman				
	Stadijum zigotskog embriona*	Indukciona podloga B5 + 2,4- D (mg l <sup>-1</sup> )	Frekvencija indukcije SE (%)	Srednji broj SE/eksplantatu (SBE)**	Kapacitet za formiranje embriona (KFE)
Karfiol	RK	0	78,57 <sup>B</sup>	9,50 ± 0,92 <sup>C</sup>	7,46
		1	67,85 <sup>C</sup>	3,90 ± 0,49 <sup>D</sup>	2,64
	K	0	88,46 <sup>A</sup>	13,48 ± 2,02 <sup>A</sup>	<b>11,92</b>
		1	60,00 <sup>D</sup>	2,33 ± 0,50 <sup>E</sup>	1,40
	KK	0	57,14 <sup>D</sup>	11,13 ± 2,12 <sup>B</sup>	6,36
		1	48,28 <sup>E</sup>	2,64 ± 0,48 <sup>E</sup>	1,28
Kupus	RK	0	76,00 <sup>b</sup>	13,44 ± 1,36 <sup>a</sup>	10,21
		1	70,00 <sup>b</sup>	8,26 ± 0,76 <sup>c</sup>	5,78
	K	0	89,65 <sup>a</sup>	13,15 ± 1,43 <sup>a</sup>	<b>11,79</b>
		1	69,23 <sup>b</sup>	12,33 ± 1,19 <sup>b</sup>	8,54
	KK	0	56,52 <sup>c</sup>	4,88 ± 0,90 <sup>d</sup>	2,76
		1	53,33 <sup>c</sup>	3,53 ± 0,51 <sup>e</sup>	1,88

\*RK - rani kotiledonarni, K - kotiledonarni, KK - kasni kotiledonarni stadijum razvića

\*\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=30.

Vrednosti označene različitim slovima u okviru svake kolone istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ ), velika slova se odnose na karfiol, a mala na kupus.

Kod karfiola i kupusa frekvencija somatske embriogeneze je bila relativno visoka i varirala je od 48,28% do 88,46% kod karfiola i od 53,33% do 89,60% kod kupusa (Tabela 4.9).

ANOVA analiza je pokazala da su stadijum razvića zigotskih embriona i prisustvo/odsustvo 1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D u indukcionoj podlozi faktori koji značajno utiču na frekvenciju somatske embriogeneze i srednji broj somatskih embriona po eksplantatu. Oba varijeteta imala su sličan odgovor na istim tretmanima što znači da je najviša frekvencija indukcije somatske embriogeneze je postignuta na zigotskim embrionima u K

stadijumu razvića gajenim na B5-0 podlozi (Tabela 4.9), a u kasnijem KK stadijumu razvića je opadala kod oba varijeteta.

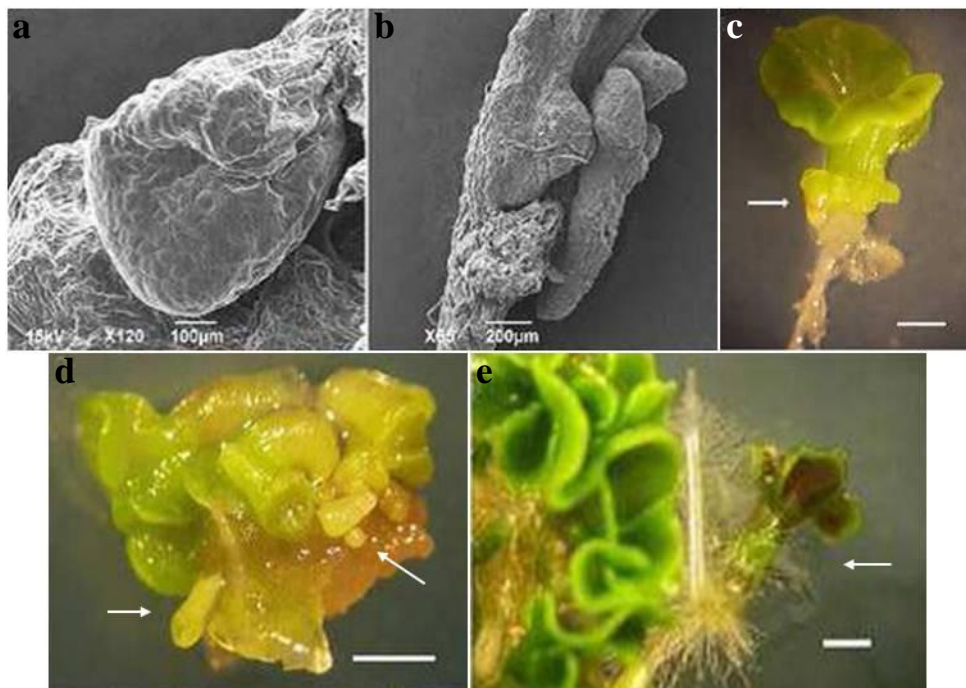
Zigotski embrioni na nižim stupnjevima razvića (RK i K) su proizveli više SE po eksplantatu u odnosu na kasnije KK embrione. Najveći srednji broj SE po eksplantatu je postignut na RK i K embrionima kupusa gajenim na B5-0 podlozi (13,44 odnosno 13,15), dok je kod karfiola najveći broj SE regenerisan na istoj podlozi iz K embriona (13,48) (Tabela 4.9).

Suprotno očekivanju, dodatak 2,4-D u indukcionu B5 podlogu redukovao je kako frekvencu somatske embriogeneze, tako i broj SE po eksplantatu kod oba varijeteta. Negativni uticaj bio je veći kod karfiola kod koga je broj proizvedenih SE po eksplantatu bio za 3-6 puta manji u poređenju sa podlogom bez 2,4-D.

KFE indeks, koji kombinuje frekvencu somatske embriogeneze i srednji broj SE po eksplantatu, ukazuje da je najbolji SE odgovor postignut na K embrionima gajenim na B5-0 podlozi kod oba varijeteta, karfiola (11,95) i kupusa (11,84) (Tabela 4.9). Zigotski embrioni na starijem KK stadijumu razvića u proseku su pokazivali niži KFE bez obzira na indukcionu podlogu. Najmanje vrednosti KFE su ostvarene kada su zigotski embrioni nezavisno od stadijuma razvića gajeni na B5-D podlozi (Tabela 4.9).

#### **4.2.2. *In vitro* indukcija sekundarne somatske embriogeneze**

SE u kotiledonarnom stadijumu razvoja su nežno odvajani od eksplantata i postavljani horizontalno na MS-0 podlogu radi inicijacije sekundarne somatske embriogeneze. Nakon 15 dana gajenja na MS-0 podlozi globularni sekundarni somatski embrioni (SSE) su se formirali direktnom regeneracijom na površini hipokotila SE (Slika 4.9 a) i u naredne dve nedelje diferencirali u naprednije stupnjeve embriogenog razvoja (Slika 4.9 b-d). SSE su bili prislonjeni uz površinu materinskog tkiva (Slika 4.9 d) i često su se spontano odvajali nastavljajući individualno svoj razvoj (sl 4.9 e).



**Slika 4.9.** Sekundarna somatska embriogeneza kod karfiola i kupusa. SEM fotografije prikazuju globularni sekundarni somatski embrion (SSE) karfiola (a) i kotiledonarni SSE kupusa (b) koji su formirani na površini hipokotila somatskog embriona. SSE u različitim stadijimuma razvića formirani asinhrono na hipokotilima somatskih embriona kupusa, bar = 1 mm (c,d). Individualni proklijali SSE kupusa spontano odvojen od materinskog tkiva SE, bar = 1 mm (e).

Prilikom praćenja regeneracije SSE vodilo se računa o poreklu eksplantata (SE) i podlozi na kojoj su dobijeni. Rezultati su pokazali da je na potencijal za sekundarnu somatsku embriogenezu nije uticalo poreklo SE dok se negativan uticaj 2,4-D preneo i na proces sekundarne somatske embriogeneze. Najveći embriogeni potencijal pokazivali su SE indukovani na B5-0 podlogama kod kojih je frekvencija indukcije sekundarne somatske embriogeneze bila iznad 80% kod oba varijeteta. Međutim, srednji broj SSE po eksplantatu bio je veći kod kupusa sa maksimumom od 13,23 nego kod karfiola čiji maksimum iznosi 5,23. (Tabela 4.10).

**Tabela 4.10.** *In vitro* indukcija sekundarne somatske embriogeneze na MS-0 podlozi iz SE karfiola i kupusa indukovanih u različitim tretmanima, nakon 4 nedelje gajenja na MS hranljivoj podlozi.

Varijetet <i>B. oleracea</i>	Indukcioni SE tretman				
	Stadijum zigotskog embriona*	Indukciona podloga B5 + 2,4-D (mg l <sup>-1</sup> )	Frekvencija indukcije SSE** (%)	Srednji broj SSE / eksplantatu***	Kapacitet za formiranje SSE (KFSSE)
Karfiol	RK	0	88,37 <sup>A</sup>	3,11 ± 0,20 <sup>CD</sup>	2,74
		1	60,00 <sup>C</sup>	3,39 ± 0,41 <sup>BC</sup>	2,03
	K	0	87,50 <sup>A</sup>	5,23 ± 0,29 <sup>A</sup>	<b>4,58</b>
		1	31,59 <sup>E</sup>	2,17 ± 0,48 <sup>E</sup>	0,68
	KK	0	81,25 <sup>B</sup>	3,69 ± 0,52 <sup>B</sup>	3,00
		1	41,28 <sup>D</sup>	2,71 ± 0,75 <sup>D</sup>	1,12
Kupus	RK	0	88,33 <sup>a</sup>	5,37 ± 0,48 <sup>c</sup>	4,74
		1	72,72 <sup>b</sup>	5,59 ± 0,80 <sup>c</sup>	4,06
	K	0	89,36 <sup>a</sup>	13,23 ± 0,95 <sup>a</sup>	<b>11,82</b>
		1	72,00 <sup>b</sup>	6,68 ± 0,33 <sup>b</sup>	4,81
	KK	0	-	-	-
		1	-	-	-

\*RK-rani kotiledonarni, K-kotiledonarni, KK-kasni kotiledonarni stadijum razvića nezrelog zigotskog embriona

\*\*SSE-sekundarni somatski embrion

\*\*\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n= 30.

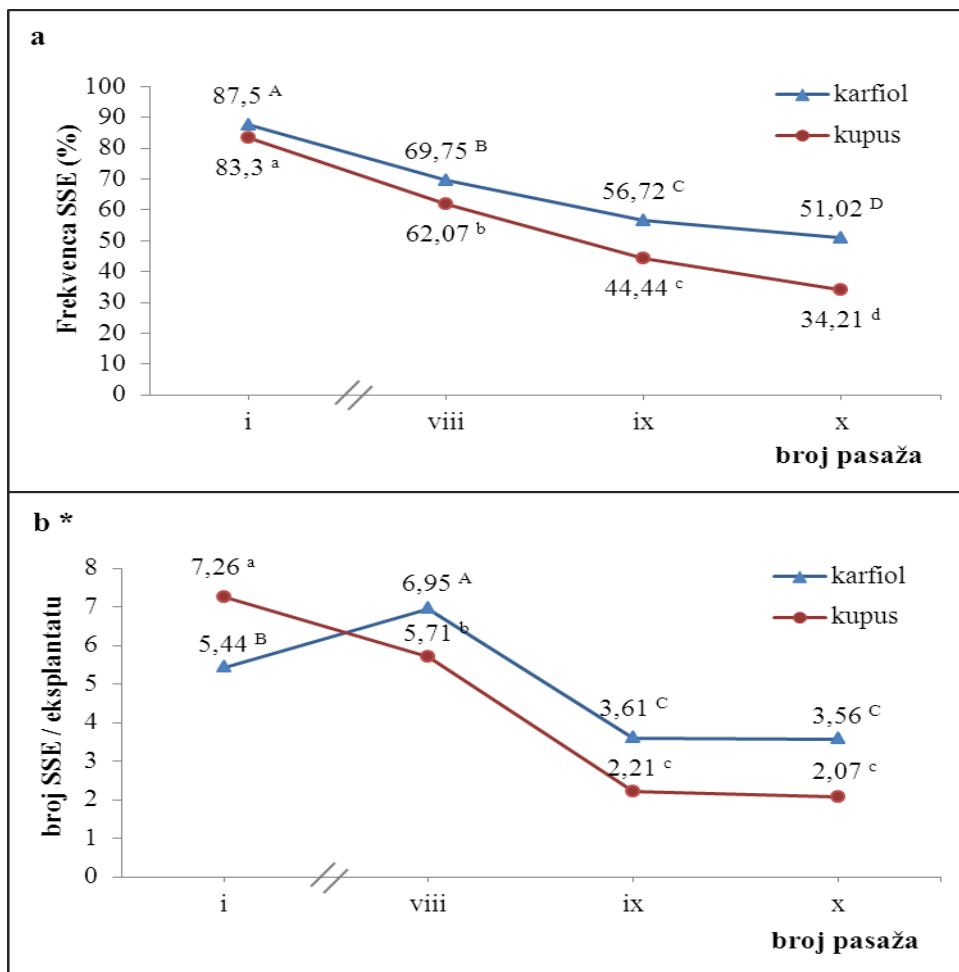
Vrednosti označene različitim slovima u okviru svake kolone istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ ). Velika slova se odnose na karfiol, a mala na kupus.

#### 4.2.3. Uspostavljanje repetitivne somatske embriogeneze

Direktna sekundarna somatska embriogeneza se odvijala ciklično sa novoformiranim somatskim embrionima koji su davali sledeću generaciju SSE. Proces je uspešno održavan 10 ciklusa (oko 10 meseci).

Nakon četiri nedelje gajenja na MS-0 podlozi (prvi ciklus), SSE kupusa i karfiola su pokazivali visok potencijal za sekundarnu somatsku embriogenezu (83,3% i 87,5%) i u ovom ciklusu nije bilo razlike u potencijalu za SSE između dva varijeteta (Slika 4.10 a). Međutim, frekvencija indukcije SSE je opadala sa ciklusima gajenja na istoj podlozi da bi pad posebno bio izražen nakon osmog ciklusa. Nakon 10 ciklusa, potencijal za formiranje SSE je iznosio 51,0% kod karfiola i 34,2% kod kupusa (Slika

4.10 a). Izuzev prvog ciklusa, u sledećim ciklusima bilo je značajnih razlika u frekvenci indukcije SSE između varijeteta; opadanje je bilo izraženije kod kupusa u odnosu na karfiol.

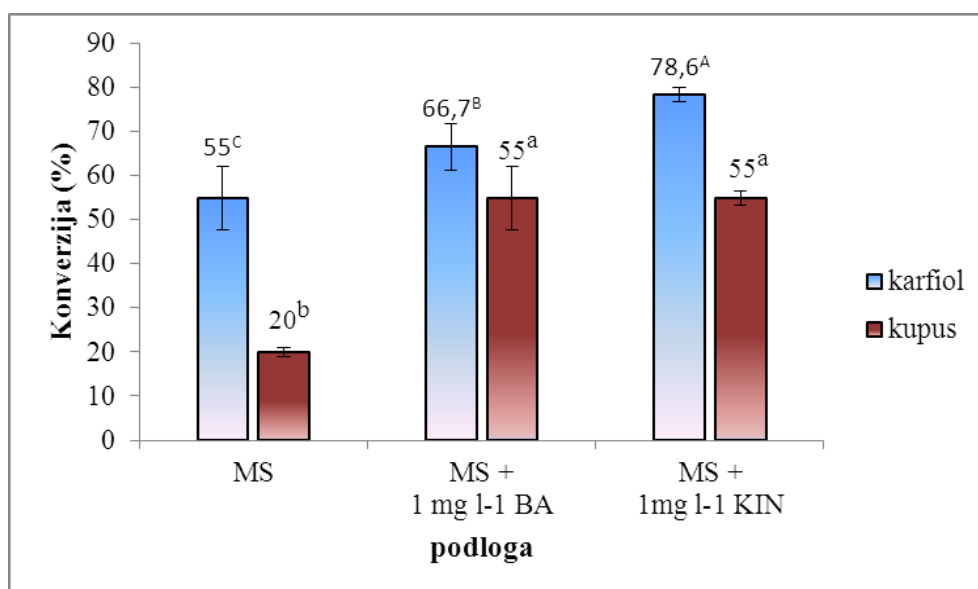


**Slika 4.10.** Repetitivna sekundarna somatska embriogeneza kod karfiola i kupusa. Frekvenca SSE (a); srednji broj sekundarnih embriona po eksplantatu (b). Prenosenje na svežu MS-0 podlogu vršeno je svake 4 nedelje. \*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška;  $n=30$ . Vrednosti označene različitim slovima u okviru istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ ). Velika slova se odnose na karfiol, a mala na kupus.

Srednji broj SSE po eksplantatu pokazuje sličan trend opadanja sa brojem ciklusima sekundarne somatske embriogeneze. Kod kupusa srednji broja SSE po eksplantatu opada sa 7,3 u prvom na 5,7 nakon osmog ciklusa, a na kraju desetog je 2,07 (Slika 4.10 b). Nasuprot tome, kod karfiola je broj produkovanih SSE do osmog ciklusa raste dostižući maksimalnu vrednost od 6,95, a zatim naglo opada i posle 10 ciklusa iznosi 3,6 (Slika 4.10 b).

#### 4.2.4. Rastenje i razviće *in vitro* formiranih somatskih embriona

SSE su se nakon izolacije i vertikalnog postavljanja na MS podlogu bez ili sa BA ili KIN ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) brzo razvijali u mlade biljke. ANOVA je pokazala da je sastav podloge faktor koji je značajno uticao na konverziju SSE u biljke. Nakon prenosa embriona na MS podlogu bez citokinina, 20% SSE kupusa i 55% SSE karfiola se spontano razvilo u mlade zdrave biljke. Prisustvo BA ili KIN u podlozi povećalo je procenat konverzije SSE u biljke na 55,5% kod kupusa i 78,6% kod karfiola (Slika 4.11), kao i kvalitet regenerisanih biljaka, koje su imale 2-3 razvijena lista i razvijen korenov sistem.

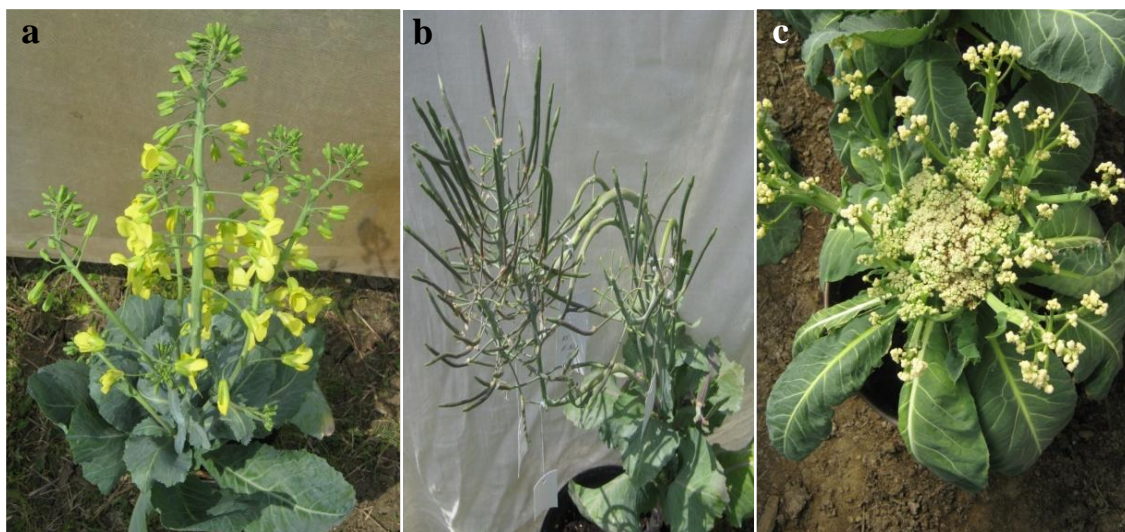


**Slika 4.11.** Konverzija sekundarnih somatskih embriona u biljke na MS podlozi bez ili sa citokinima, nakon 4 nedelje gajenja na hranljivoj podlozi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška;  $n=20$ . Vrednosti označene različitim slovima u okviru istog varijeteta su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa ( $P \leq 0,05$ ). Velika slova se odnose na karfiol, a mala na kupus.

#### 4.2.5. Aklimatizacija biljaka regenerisanih iz somatskih embriona

Biljke dobijene konverzijom sekundarnih somatskih embriona su uspešno aklimatizovane u plasteniku (preko 80%). Aklimatizovane biljke su nastavile da rastu, vernalizovale su tokom zime i procvetale u aprilu naredne godine (Slika 4.12 a i c). Nakon ručnog oprašivanja biljke su razvijale ljske sa semenom (Slika 4.12 b). Biljke su bile zdrave i morfološki identične donorskoj (roditeljskoj) biljci.





**Slika 4.12.** Aklimatizovane biljke dobijene iz sekundarnih somatskih embriona karfiola i kupusa. Biljka kupusa u fazi cvetanja (a) i sa razvijenim ljuskama (b). Procvetala biljka karfiola (c).

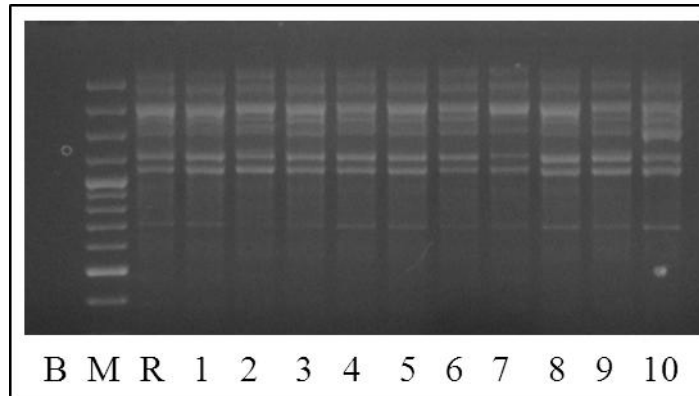
#### 4.2.6. Genetičke stabilnosti biljaka regenerisanih iz sekundarnih somatskih embriona

Genetička stabilnost regeneranata dobijenih sekundarnom somatskom embriogenezom je potvrđena RAPD-PCR tehnikom. Od deset analiziranih RAPD prajmera, pet je davalo ponovljivi profil traka i oni su korišćeni za dalje PCR analize. Svaki prajmer je generisao jedinstvene produkte amplifikacije veličine od 700 bp do 3000 bp, a ukupan broj detektovanih traka je iznosio 21 (Tabela 4.11). Broj traka se kretao od dve (B01) do sedam (B03), sa prosečanim brojem traka po prajmeru od 4.2. Na slici 4.13 je prikazan profil traka roditeljske biljke karfiola i biljaka regeneranata dobijen pomoću B03 prajmera.

**Tabela 4.11.** RAPD analiza genetičke stabilnosti biljaka regenerisanih iz sekundarnih somatskih embriona i broj dobijenih amplikona po prajmeru.

Prajmer	Broj traka	Opseg veličine produkata (bp)
B01	2	1031-3000
B03	7	700-3000
B05	6	900-3000
C01	3	1200-2000
C05	3	1500-3000





**Slika 4.13.** RAPD-PCR profil biljaka karfiola dobijen korišćenjem B03 prajmera. B: blank; M: DNK standard (100 bp Plus DNA ladder, Fermentas); R: roditeljska biljka; 1-10: biljke regenerisane iz sekundarnih somatskih embriona.

### 4.3. GENETIČKA TRANSFORMACIJA POMOĆU *A. tumefaciens*

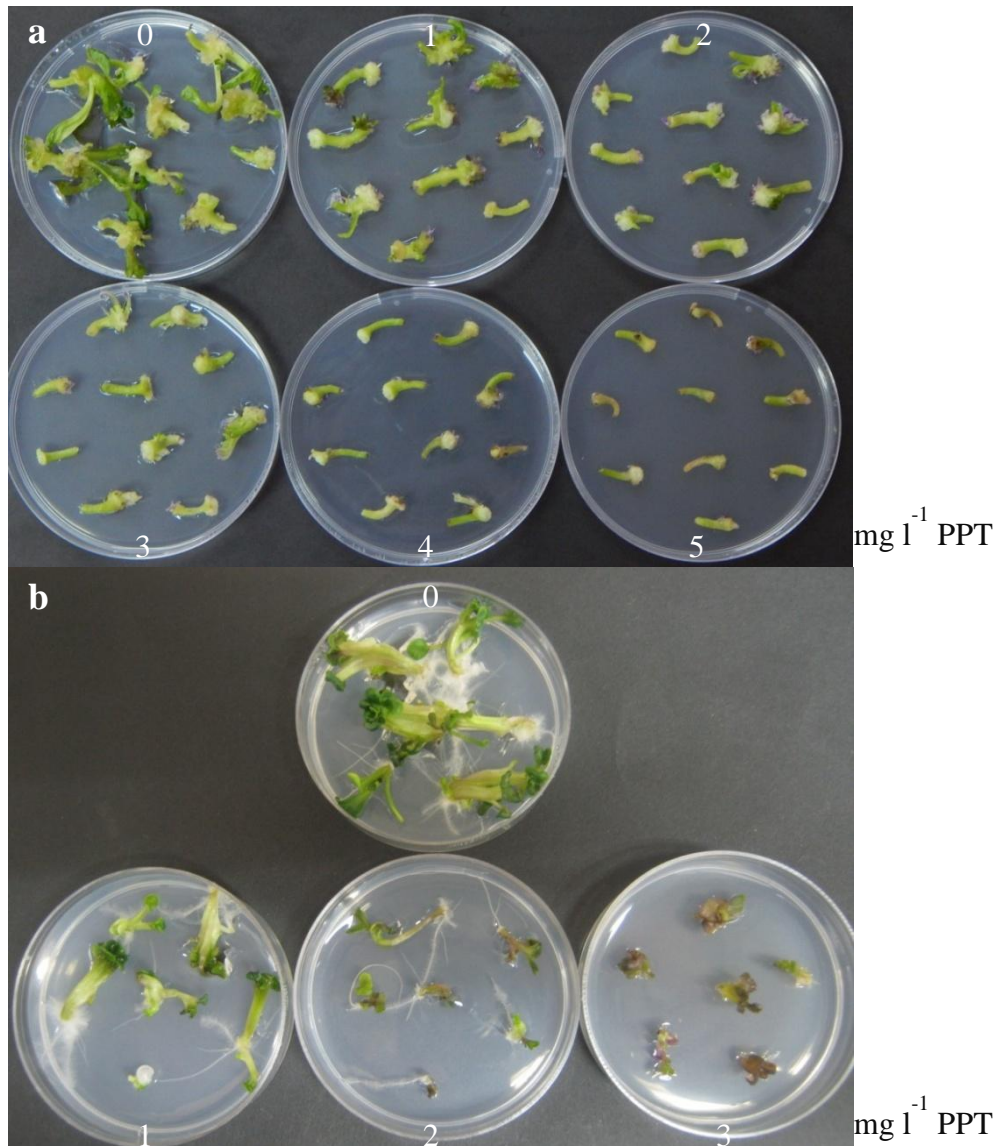
#### 4.3.1. Selektivna koncentracija fosfinotricina (PPT)

Radi određivanja koncentracije selektivnog agensa PPT-a, koja će se primenjivati posle transformacije za razdvajanje transformisanog tkiva od netransformisanog, urađen je test osetljivosti eksplantata (hipokotila i SE) prema različitim koncentracijama PPT-a. Eksplantati su gajeni na odgovarajućim podlogama za regeneraciju (poglavlje 3.4.3) sa dodatkom rastućih koncentracija PPT (1, 2, 3, 4 i 5 mg l<sup>-1</sup>). Dobijeni rezultati upoređivani su sa kontrolnim segmentima hipokotila i somatskim embrionima gajenim na hranljivoj podlozi koja nije sadržala PPT (Tabela 4.12). Procenat regeneracija kao i broj pupoljaka po eksplantatu su se smanjivali sa porastom koncentracije PPT-a (Tabela 4.12). Nakon 4 nedelje gajenja, do nekroze eksplantata i potpune inhibicije regeneracije dolazilo je kod hipokotila gajenih na podlogama sa 5 mg l<sup>-1</sup> PPT-a i kod SE gajenih na 3 mg l<sup>-1</sup> PPT-a (Tabela 4.12, Slika 4.14), tako da su za selekciju transformisanog tkiva, u zavisnosti od tipa eksplantata koji je korišćen za transformaciju, upotrebljene ove dve koncentracije PPT-a.

**Tabela 4.12.** Uticaj različitih koncentracija PPT-a na regenerativni kapacitet eksplantata hipokotila i SE karfiola, nakon 4 nedelje gajenja na selektivnoj podlozi.

Tip eksplantata	PPT (mg l <sup>-1</sup> )	Frekvencija regeneracije (%)	Broj regenerisanih pupoljaka po eksplantatu *	IR
Hipokotil	0	86,67 <sup>A</sup>	5,06 ± 0,34 <sup>A</sup>	<b>4,39</b>
	1	80,00 <sup>B</sup>	3,78 ± 0,21 <sup>B</sup>	<b>3,02</b>
	2	63,33 <sup>C</sup>	2,80 ± 0,38 <sup>C</sup>	<b>1,77</b>
	3	53,33 <sup>D</sup>	2,07 ± 0,18 <sup>D</sup>	<b>1,1</b>
	4	23,33 <sup>E</sup>	1,57 ± 0,19 <sup>E</sup>	<b>0,37</b>
	5	0 <sup>F</sup>	0 <sup>F</sup>	<b>0</b>
Somatski embrioni	0	72,22 <sup>a</sup>	3,13 ± 0,26 <sup>a</sup>	<b>2,26</b>
	1	55,56 <sup>b</sup>	1,56 ± 0,22 <sup>b</sup>	<b>0,87</b>
	2	22,22 <sup>c</sup>	1,15 ± 0,22 <sup>c</sup>	<b>0,26</b>
	3	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	<b>0</b>

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (n=30). Vrednosti obeležene različitim slovima u okviru jedne kolone i istog tipa eksplantata su statistički značajno različite za  $P \leq 0,05$ , što je utvrđeno primenom LSD testa. Velika slova se odnose na hipokotile, a mala na somatske embrione.

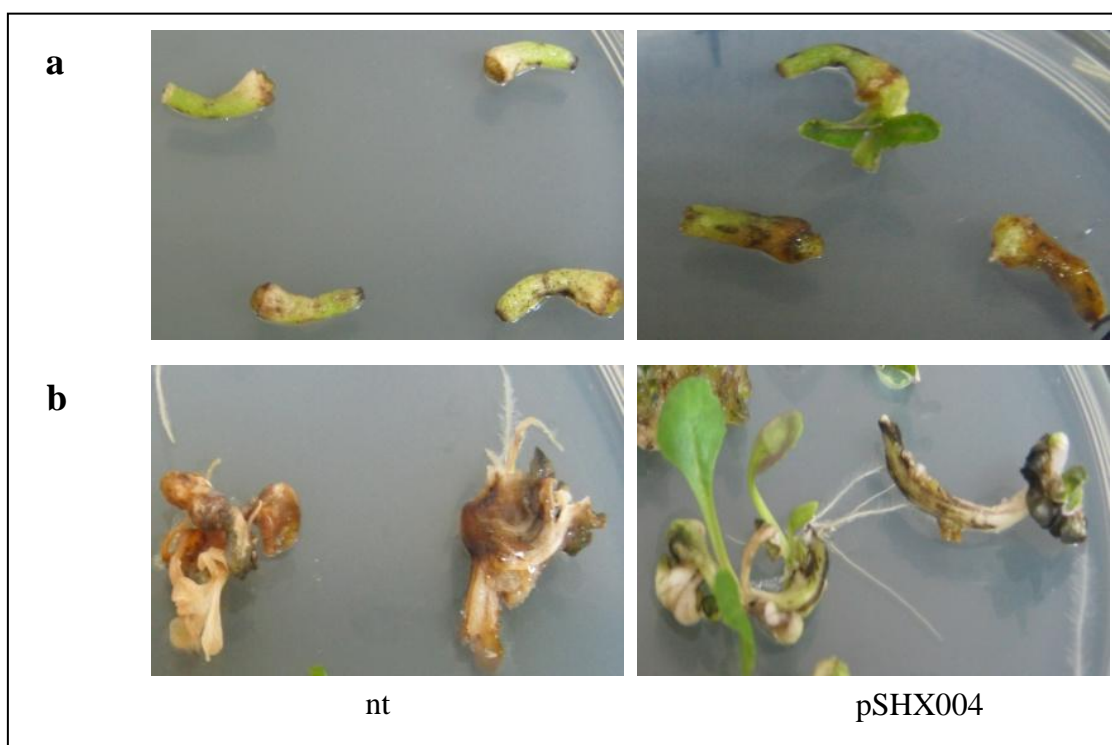


**Slika 4.14. Određivanje selektivne koncentracije PPT-a.** Segmenti hipokotila (a) i SE (b) gajeni 4 nedelje na regenerativnoj MS podlozi sa rastućom koncentracijom PPT (0–5 mg l<sup>-1</sup>).

#### **4.3.2. Genetička transformacija karfiola pomoću *A.tumefaciens* EHA101(pSHX004)**

Segmenti hipokotila, izolovani sa klijanaca karfiola starih 8 dana, kao i somatski embrioni u kotiledonarnom stadijumu razvoja, dobijeni u toku procesa repetitivna somatske embriogeneze, predkultivisani su 4 dana na odgovarajućim regenerativnim podlogama (Materijal i metode, poglavlje 3.3.4) nakon čega su inokulirani sa *A. tumefaciens* EHA101(pSHX004) i postavljeni na istu podlogu sa ili bez acetosiringona (AS) i obavezno prisustvo cefotaksima radi dekontaminacije eksplantata. Potencijalno

„čisti,, eksplantati osam dana nakon inokulacije su preneseni na podloge istog sastava uz dodatak PPT-a u odgovarajućim koncentracijama. Praćeno je preživljavanje eksplantata na selektivnim podlogama, kao i uticaj AS na efikasnost transformacije. Tokom prve dve nedelje gajenja eksplantati su se izduživali i zadebljavali, i dok su na kraju ovog perioda uočavani prvi znaci regeneracije na kontrolnim neinokulisanim eksplantatima na podlozi bez PPT-a, na inokulisanim eksplantatima do regeneracije dolazilo 2 nedelje kasnije (Slika 4.15). Odmah po uočavanju začetaka regeneracije na neinokulisanim eksplantatima, hipokotili i SE su prebacivani na selektivne podloge koje su sadržale 5 odnosno 3 mg l<sup>-1</sup> PPT-a, respektivno. Kontrolni eksplantati postavljeni na selektivnu podlogu nisu regenerisali pupoljke i podlegli su nekrozi u toku prve dve nedelje gajenja. Kod inokulisanih eksplantata nekrozi je podleglo 25% odnosno 49,17% u zavisnosti od prisustva ili odsustva AS.



**Slika 4.15.** Selekcija pupoljaka transformisanih sa EHA101(pSHX004) koji se regenerisani na eksplantatima hipokotila (a) i somatskim embrionima (b) nakon 4 nedelje gajenja na MS podlozi za regeneraciju sa dodatkom 5 mg l<sup>-1</sup> PPT-a kod hipokotila (a) odnosno 3 mg l<sup>-1</sup> PPT-a kod SE (b). nt - kontrolni neinokulisani eksplantati.

Kontrolni neinokulisani eksplantati hipokotila gajeni na regenerativnom MS medijumu bez PPT-a normalno su se razvijali i regenerisali pupoljke u visokom procentu (72%), sa prosečno 3,25 pupoljaka po eksplantatu (Tabela 4.13). Međutim kod inokulisanih hipokotila koji su gajeni na medijumu sa PPT-om zapaženo je smanjenje frekvence regeneracije (35,75%) i prosečnog broja pupoljaka po eksplantatu (2,68) (Tabela 4.13).

Kod somatskih embriona, inokulacija sa EHA101(pSHX004) takođe je izazvala smanjenje frekvence regeneracije za 13-16% u poređenju sa kontrolnim neinokulisanim eksplantatima. Međutim prosečan broj regenerisanih pupoljaka po eksplantatu je bio veći kod inokuliranih SE i zavisio od prisustva (1,68) ili odsustva (1,48) AS u podlozi (Tabela 4.13).

Potencijalno transformisani pupoljci, regenerisani iz oba tipa eksplantata, su dalje gajeni na selektivnoj regenerativnoj podlozi sa PPT-om. Nakon dva ciklusa selekcije preživela su ukupno 22 izdanka (po 11 od oba tipa inokuliranih eksplantata, Tabela 4.13) koji su prebačeni na podloge za multiplikaciju. Svaki izdanak je tretiran kao zasebna potencijalno transformisana linija.

Upotreba AS je značajno povećala efikasnost transformacije kod oba tipa eksplantata u odnosu na tretman bez AS i to: sa 0,83% na 2,5% kod hipokotila i sa 0% na 7,33% kod SE (Tabela 4.13).

**Tabela 4.13.** Transformacija karfiola (*B. oleracea* var. *botrytis*) pomoću *A. tumefaciens* EHA101(pSHX004).

Tip eksplantata	Tretman	AS	Broj inokulisanih eksplantata	Preživeli eksplantati (%)	Frekvenca regeneracije (%) <sup>*</sup>	Srednji broj pupoljaka po eksplantatu <sup>**</sup>	<i>NPK1</i> i <i>bar</i> PCR pozitivni izdanci	Efikasnost transformacije (%) <sup>***</sup>
Hipokotili	EHA101	-	120	50,83 <sup>C</sup>	30,83 <sup>B</sup>	2,68 ± 0,21 <sup>B</sup>	1 <sup>B</sup>	0,83 <sup>B</sup>
	(pSHX004)	+	400	75,00 <sup>B</sup>	35,75 <sup>B</sup>	2,46 ± 0,42 <sup>B</sup>	10 <sup>A</sup>	2,5 <sup>A</sup>
	Kontrola	-	100	98,00 <sup>A</sup>	72,00 <sup>A</sup>	3,25 ± 0,36 <sup>A</sup>	-	-
Somatski embrioni	EHA101	-	120	61,67 <sup>b</sup>	45,67 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,35 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	(pSHX004)	+	150	70,00 <sup>b</sup>	48,67 <sup>b</sup>	1,68 ± 0,12 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	7,33 <sup>a</sup>
	Kontrola	-	60	89,17 <sup>a</sup>	61,67 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,09 <sup>c</sup>	-	-

<sup>\*</sup> Frekvenca regeneracije = br. eksplantata sa regeneracijom / br. inokulisanih eksplantata x 100

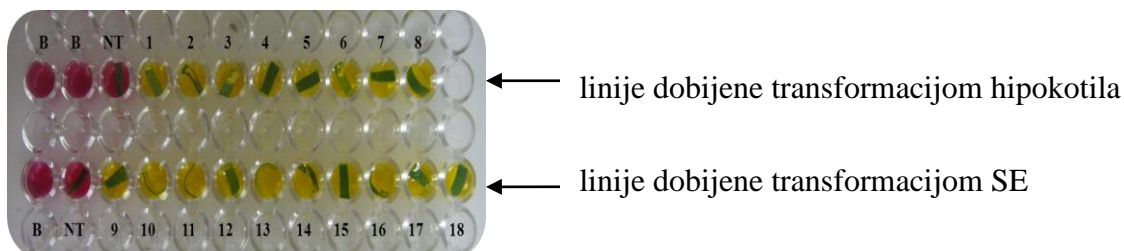
<sup>\*\*</sup> Srednji broj pupoljaka po eksplantatu = ukupan br. regenerisanih pupoljaka / br. regenerativnih eksplantata. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n= 60-400.

<sup>\*\*\*</sup> Efikasnost transformacije = br. PCR pozitivnih izdanaka / br. inokulisanih eksplantata x 100

Različita slova u okviru jedne kolone istog tipa eksplantata ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ( $P \leq 0,05$ ). Velika slova se odnose na hipokotile, a mala na somatske embrione.

#### 4.3.2.1. Hlorofenol-crveno reakcija

Inicijalni skrining potencijalno transformisanih izdanaka izvršen je pomoću hlorofenol-crveno (HFC) reakcije. HFC je pH indikator koji rastvoru čija je pH vrednost 6,0 daje tamno crvenu boju. U prisustvu PPT-a u rastvoru, transformisano biljno tkivo, kao otporno prema PPT-u, ostaje zdravo i funkcionalno i svojom metaboličkom aktivnošću izaziva acidifikaciju podloge i promenu njene boje iz crvene u žutu. Netransformisano tkivo neotporno prema PPT-u propada usled čega dolazi do akumulacije amonijum jona u rastvoru koji povećava njegovu pH vrednost i izaziva promenu boje u ljubičastu. Promena boje podloge iz crvene u žutu je detektovana nakon 3-4 dana kod svih testiranih potencijalno transformisanih linija (Slika 4.16).

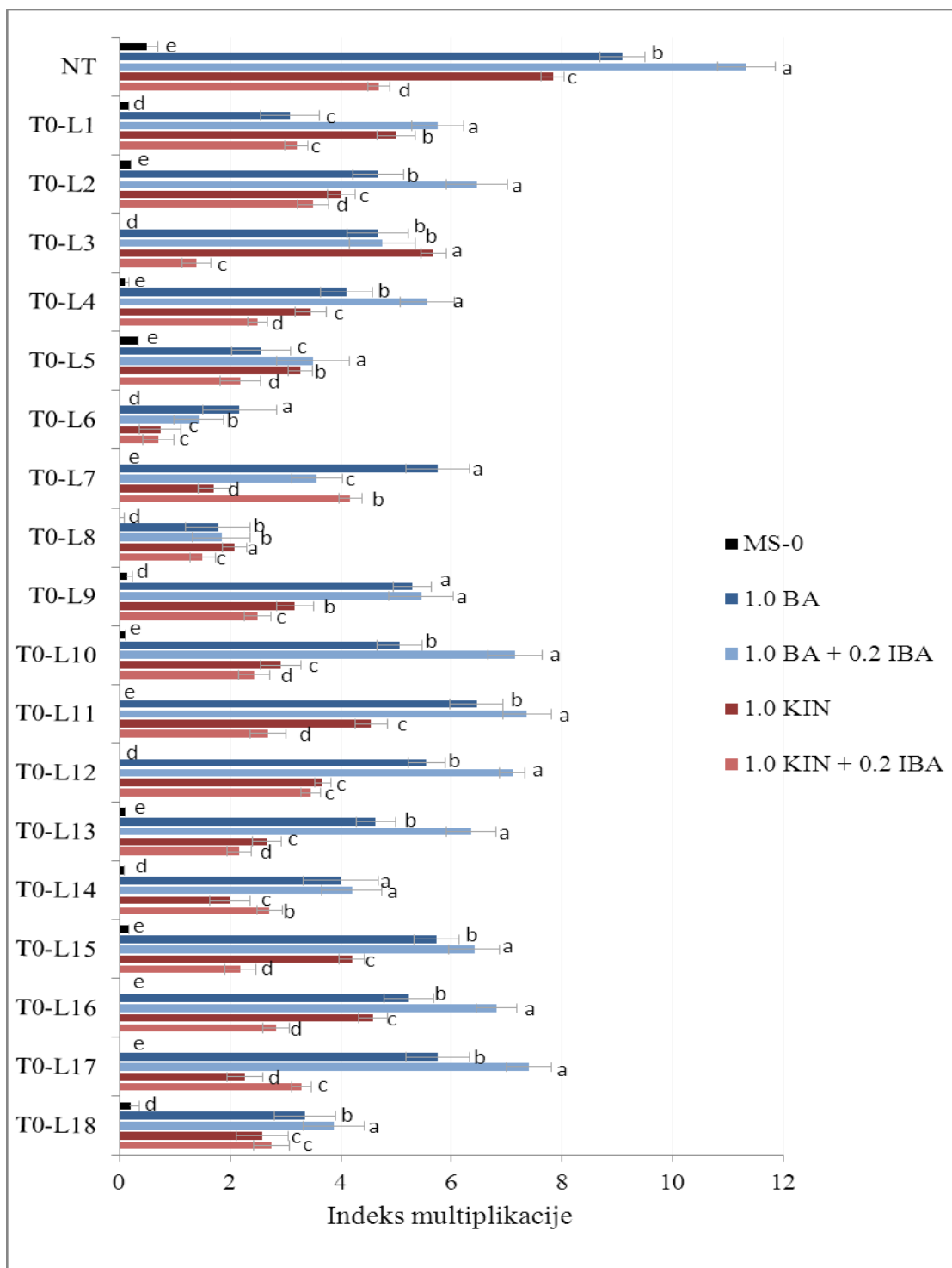


**Slika 4.16.** Hlorofenol-crveno reakcija. B: blank; NT: kontrolno, netransformisano tkivo; 1-18: tkivo potencijalno transformisanih linija.

#### 4.3.2.2. Umnožavanje transformisanih izdanaka *in vitro*

Od 21 potencijalno transformisane linije, uspešno je umnoženo 18 linija (linije T<sub>0</sub>-L1-T<sub>0</sub>-L8 dobijene transformacijom hipokotila i linije T<sub>0</sub>-L9-T<sub>0</sub>-L18 dobijene transformacijom SE), dok su 3 linije izgubljene usled gljivične kontaminacije. Linije su umnožavane na MS podlogama bez selektivnog agensa PPT-a, a koje su sadržale BA ili KIN u koncentraciji 0 i 1 mg l<sup>-1</sup> u kombinaciji sa 0 i 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA. ANOVA je pokazala da su se transformisane linije međusobno razlikovale u kapacitetu za umnožavanje kao i da je kod svake linije indeks multiplikacije zavisio od hormonskog sastava podloge. Na podlozi bez regulatora rastezanja (MS-0) ili nije bilo umnožavanja ili je indeks multiplikacije bio nizak (0,08 kod linije T<sub>0</sub>-L14) dok je kod kontrole bio 0,5 (Slika 4.17). To je ukazalo na potrebu uključivanja citokinina radi postizanja boljeg umnožavanja. Najbolje umnožavanje većine linija postignuto je na podlozi sa 1,0 mg l<sup>-1</sup> BA + 0,2 mg l<sup>-1</sup> IBA (od 3,5 kod linije T<sub>0</sub>-L5 do 7,4 kod linije T<sub>0</sub>-L17) (Slika 4.17). Ipak i na ovoj podlozi, kapacitet za umnožavanje transformisanih linija je bio značajno

ispod kapaciteta za umnožavanje kontrolnih netransformisanih biljaka (za 35% kod linije T<sub>0</sub>-L17 do 87% kod linije T<sub>0</sub>-L6) (Slika 4.17).



**Slika 4.17.** Indeks multiplikacije netransformisane (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> linija karfiola. T<sub>0</sub>-L1-L18: transformisane linije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=30. Vrednosti označene različitim slovima u okviru jedne linije su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05).



#### **4.3.2.3. Morfološke karakteristike, ožiljavanje i aklimatizacija *in vitro* transformisanih izdanaka**

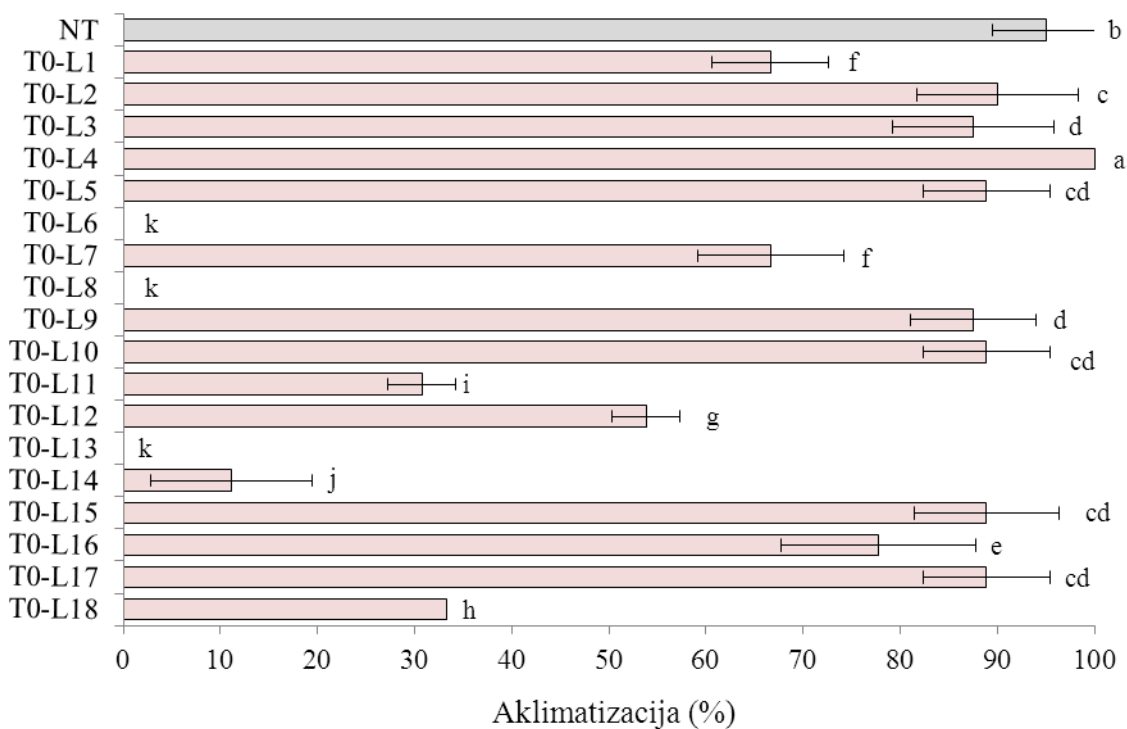
Potencijalno transformisani izdanci su radi ožiljavanja postavljeni na MS podlogu sa IBA  $1 \text{ mg l}^{-1}$  i 4% saharozom, koja se prethodno pokazala kao najpodesnija za ožiljavanje i aklimatizaciju netransformisanih izdanaka karfiola (poglavlje 4.1.2, Tabela 4.8). Nakon četiri nedelje gajenja na ovoj podlozi ocenjivani su ožiljavanje i fenotipske karakteristike biljaka iz različitih transformisanih linija. Biljke svih transformisanih linija su se razlikovale po visini u odnosu na kontrolne netransformisane (NT) biljke. Najmanju visinu su imale biljke linija T<sub>0</sub>-L1, T<sub>0</sub>-L4 i T<sub>0</sub>-L15, čija je visina bila upola manja u odnosu na NT kontrolu, dok su biljke linija T<sub>0</sub>-L11 i T<sub>0</sub>-L12 dostizale visinu veću u odnosu na NT za 33% (Tabela 4.14). Sve transformisane linije su se uspešno ožilile na datoj podlozi. Dužina najdužeg korena kod svih transformisanih linije je bila manja u odnosu na koren kontrolnih NT biljaka, ali je kod čak deset transformisanih linija srednji broj korenova po biljci bio statistički značajno veći u odnosu na NT kontrolu.

Ožiljenje transformisane (T<sub>0</sub>) biljke zajedno sa odgovarajućim NT kontrolnim biljkama posadene su sterilni supstrat i prenete u staklenik radi aklimatizacije. Većina transformisanih linija se uspešno aklimatizovala u stakleniku, izuzev linija T<sub>0</sub>-L6, T<sub>0</sub>-L8 i T<sub>0</sub>-L13 koje su imale slab korenov sistem i kod kojih nije uspeo nijedan pokušaj aklimatizacije (Slika 4.18). Kod svih transformisanih linija, izuzev linije T<sub>0</sub>-L4 kod koje su uspešno aklimatizovale sve biljke, efikasnost aklimatizacije je bila niža u odnosu na NT kontrolu kod koje se uspešno aklimatizovalo 95% biljaka. Uprkos tome, visok procenat aklimatizacije iznad 85% postignut je kod osam transformisanih linija, dok je kod svega tri linije bio ispod 50%. Najmanja efikasnost aklimatizacije je postignuta kod linije T<sub>0</sub>-L14 (11,11%) (Slika 4.18).

**Tabela 4.14.** Morfološke karakteristike netransformisane i transformisanih linija (T<sub>0</sub>-L1-T<sub>0</sub>-L18) nakon 4 nedelja gajenja na MS podlozi za ožiljavanje sa IBA 1 mg l<sup>-1</sup> i 4% saharoze.

Linija	Visina biljaka (mm)	Broj listova	Broj korenova po ožiljenoj biljci	Dužina najdužeg korena (mm)
NT	59,80 ± 1,07	5,80 ± 0,37	14,60 ± 0,75	30,00 ± 0,89
T <sub>0</sub> -L1	29,60 ± 1,50*	5,20 ± 0,37	14,00 ± 0,84	17,20 ± 1,16*
T <sub>0</sub> -L2	48,60 ± 1,72*	4,80 ± 0,37	12,40 ± 0,51*	10,20 ± 0,58*
T <sub>0</sub> -L3	33,20 ± 1,20*	4,20 ± 0,37*	15,00 ± 0,71	10,40 ± 0,51*
T <sub>0</sub> -L4	29,40 ± 1,44*	5,40 ± 0,40	19,20 ± 0,58*	11,20 ± 0,86*
T <sub>0</sub> -L5	77,00 ± 1,64*	4,60 ± 0,24*	15,00 ± 1,00	18,40 ± 0,68*
T <sub>0</sub> -L6	68,80 ± 1,16*	3,80 ± 0,37*	2,60 ± 1,12*	5,00 ± 1,34*
T <sub>0</sub> -L7	60,00 ± 0,71	3,80 ± 0,20*	14,20 ± 0,58	15,00 ± 0,63*
T <sub>0</sub> -L8	68,60 ± 2,16*	3,80 ± 0,37*	7,60 ± 0,51*	10,40 ± 0,81*
T <sub>0</sub> -L9	37,60 ± 0,93*	7,20 ± 0,58*	19,80 ± 0,58*	19,40 ± 1,36*
T <sub>0</sub> -L10	46,60 ± 1,29*	6,00 ± 0,32	14,00 ± 0,71	26,20 ± 1,07*
T <sub>0</sub> -L11	81,00 ± 2,28*	4,00 ± 0,45*	23,80 ± 0,80*	24,20 ± 1,28*
T <sub>0</sub> -L12	80,00 ± 1,58*	6,00 ± 0,45	16,20 ± 0,49*	26,60 ± 0,75*
T <sub>0</sub> -L13	74,60 ± 1,33*	5,60 ± 0,40	3,60 ± 0,51*	8,40 ± 0,51*
T <sub>0</sub> -L14	69,20 ± 0,97*	6,60 ± 0,40	10,60 ± 0,51*	25,20 ± 0,86*
T <sub>0</sub> -L15	29,20 ± 0,58*	5,20 ± 0,58	19,80 ± 0,66*	26,00 ± 0,84*
T <sub>0</sub> -L16	45,00 ± 1,82*	4,60 ± 0,24*	23,80 ± 0,66*	22,20 ± 0,66*
T <sub>0</sub> -L17	34,40 ± 1,69*	4,80 ± 0,37	17,60 ± 0,51*	28,00 ± 1,70
T <sub>0</sub> -L18	36,20 ± 1,85*	6,00 ± 0,55	18,80 ± 0,58*	27,20 ± 1,59

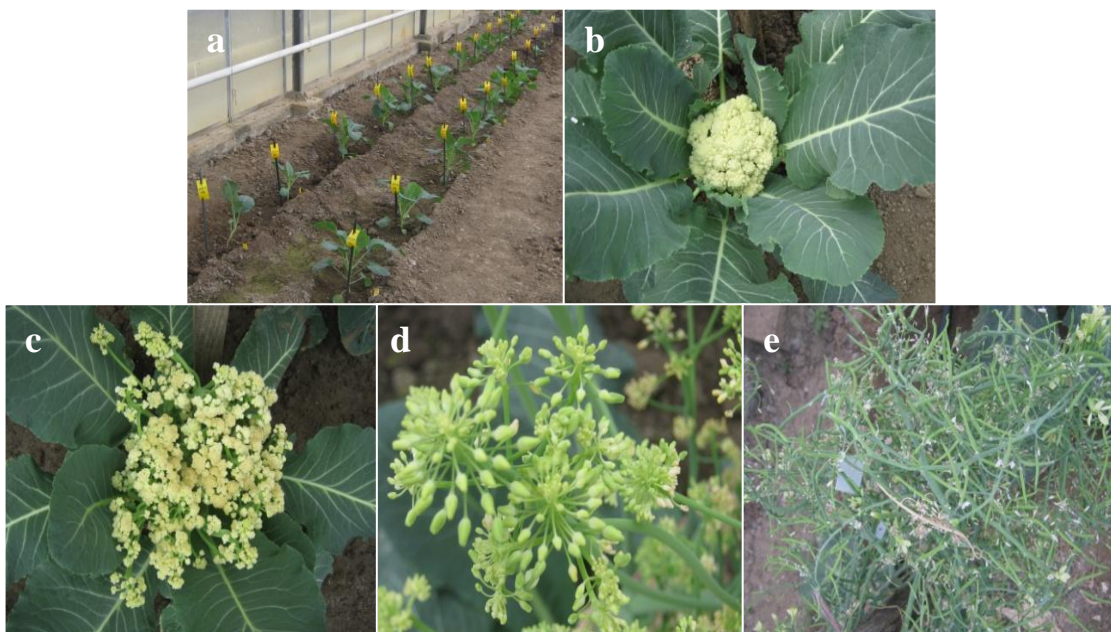
Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ± standardna greška; n=5. NT: netransformisana kontrola, T<sub>0</sub>-L1 - T<sub>0</sub>-L18: transformisane linije. Zvezdica označava postojanje statistički značajne razlike u merenom parametru transformisane biljke u poređenju sa NT kontrolnom biljkom na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ).



**Slika 4.18.** Procenat aklimatizacije netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola. T<sub>0</sub>-L1-L18: transformisane linije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; n=12-20. Vrednosti označene različitim slovima su statistički različite na osnovu Fišerovog LSD testa (P ≤ 0,05).

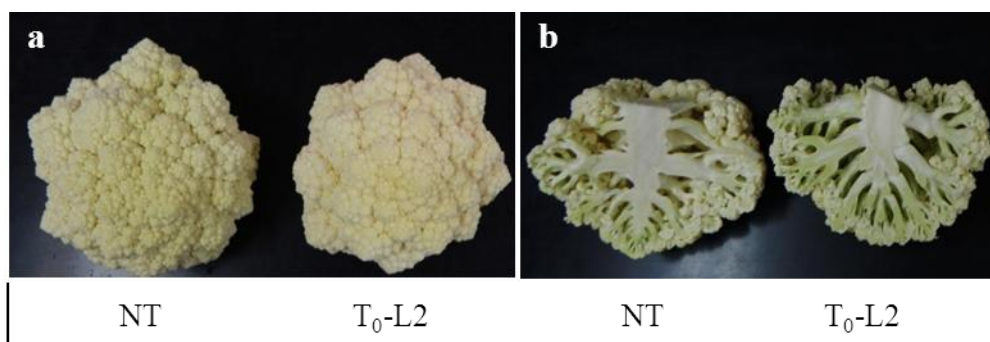
#### 4.3.2.4. Fenotipske karakteristike transformisanih biljaka aklimatizovanih u stakleniku

Aklimatizovane transformisane T<sub>0</sub> biljke posađene su u leje u stakleniku (Slika 4.19 a) gde su dalje rasle i razvijale se, formirale cvasti (Slika 4.19 b), vernalizovale tokom zimskog perioda (Slika 4.19 c), procvetale (Slika 4.19 d) i nakon ručnog samooprašivanja dale seme T<sub>1</sub> generacije (Slika 4.19 e). Seme sakupljeno sa biljaka šest T<sub>0</sub> linija (T<sub>0</sub>-L9, L10, L15-L18) je isklijavano *in vitro* i dobijena je T<sub>1</sub> generacija biljaka.



**Slika 4.19.** Aklimatizovane transformisane  $T_0$  biljke karfiola u stakleniku (a), izgled biljke sa razvijenom cvasti nakon četiri meseca gajenja u uslovima staklenika (b), vernalizacija u toku zimskog perioda (c), formirani butoni (d) i formirane ljuske nakon ručnog oprašivanja (e).

Kod  $T_0$  biljka 10 transformisanih linija koje su četiri meseca gajene u stakleniku vizuelno nije uočeno prisustvo morfoloških abnormalnosti kao što su na primer patuljast rast, nepravilni listovi, abnormalne cvasti (Slika 4.19 b i 4.20). Cvasti su bile okruglog, ujednačenog oblika i dobre zbijenosti kao i cvasti kontrolnih biljaka (Slika 4.20).



**Slika 4.20.** Izgled zrelih cvasti (a) i poprečni presek cvasti (b) netransformisanog karfiola (NT) i transformisane linije  $T_0$ -L2.

Iako su merenja pokazala da su se biljke pojedinih  $T_0$  linija razlikovale u odnosu na NT kontrolu u nekim parametrima rasta koji su generalno imali nešto niže vrednosti u odnosu na kontrolu, to nije uslovalo razlike u prinosu izmrđu  $T_0$  i NT biljaka (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15.** Karakteristike transformisanih linija u poređenju sa kontrolnom netransformisanom linijom (NT) nakon 4 meseca gajenja u stakleniku.

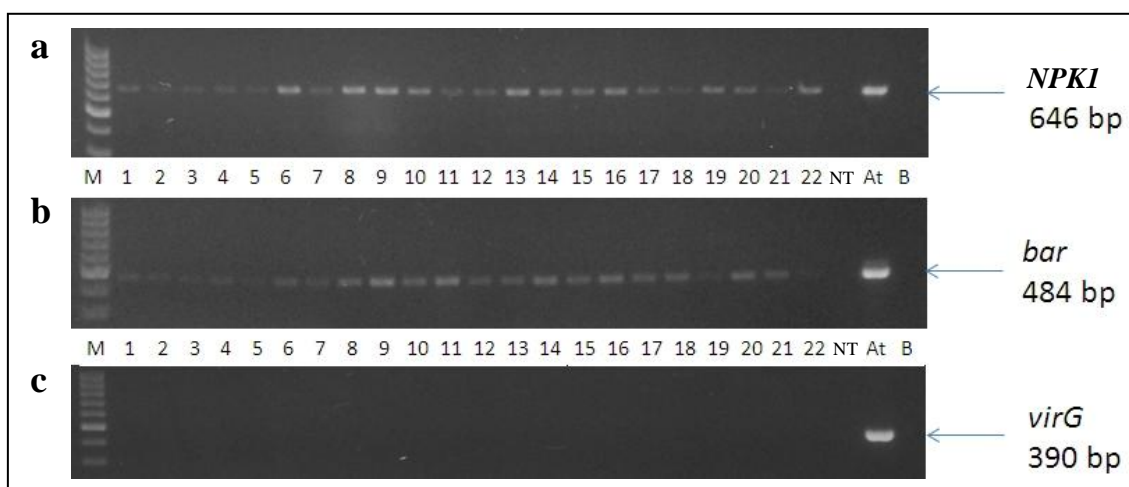
Linija	Visina biljke (cm)	Masa biljke (kg)	Broj listova	Širina cvasti (cm)	Visina cvasti (cm)	Obim cvasti (cm)	Masa cvasti (kg)
NT	58,10 ± 3,69	4,26 ± 0,38	34,20 ± 0,51	21,08 ± 0,39	16,10 ± 0,40	68,10 ± 2,35	1,38 ± 0,01
T <sub>0</sub> -L1	54,66 ± 0,86	3,66 ± 0,06*	27,60 ± 0,51*	19,26 ± 0,51	15,20 ± 0,24	62,52 ± 0,77	1,28 ± 0,03
T <sub>0</sub> -L2	56,86 ± 2,31	4,33 ± 0,08	32,60 ± 1,03	22,10 ± 0,60	16,78 ± 0,36	73,30 ± 1,20	1,36 ± 0,04
T <sub>0</sub> -L3	54,18 ± 4,95	4,22 ± 0,54	28,80 ± 2,35*	21,30 ± 0,43	15,18 ± 0,16	68,02 ± 0,96	1,31 ± 0,02
T <sub>0</sub> -L4	61,24 ± 0,20	4,40 ± 0,31	28,40 ± 0,60*	22,02 ± 0,44	14,92 ± 0,37	70,80 ± 0,78	1,29 ± 0,05
T <sub>0</sub> L9	60,88 ± 0,36	4,15 ± 0,15	35,40 ± 0,81	20,24 ± 0,24	16,32 ± 0,28	68,34 ± 0,73	1,32 ± 0,02
T <sub>0</sub> -L10	59,56 ± 0,68	3,70 ± 0,06*	28,20 ± 0,37*	18,88 ± 0,21*	15,38 ± 0,22	60,26 ± 1,92*	1,28 ± 0,01
T <sub>0</sub> -L12	48,34 ± 2,35*	3,80 ± 0,04	34,60 ± 1,63	20,36 ± 0,71	16,38 ± 0,31	68,46 ± 0,36	1,34 ± 0,12
T <sub>0</sub> -L14	59,36 ± 0,41	3,80 ± 0,14*	32,20 ± 0,97	18,74 ± 0,53*	14,32 ± 0,62	60,36 ± 0,43*	1,27 ± 0,01
T <sub>0</sub> -L16	49,30 ± 1,67*	3,72 ± 0,05*	29,00 ± 0,84*	22,59 ± 0,86	15,62 ± 0,13	60,86 ± 1,92*	1,33 ± 0,09
T <sub>0</sub> -L17	54,60 ± 0,38	4,25 ± 0,11	32,20 ± 0,58	20,48 ± 0,62	14,32 ± 0,29	60,74 ± 0,24*	1,28 ± 0,03

Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ± standardna greška, n= 5. Zvezdica označava postojanje statistički značajne razlike u merenom parametru između transformisane biljke i NT kontrolne biljke na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2.5. Molekularna analiza biljaka transformisanih sa EHA101(pSHX004)

##### 4.3.2.5.1. PCR analiza potencijalno transformisanih linija

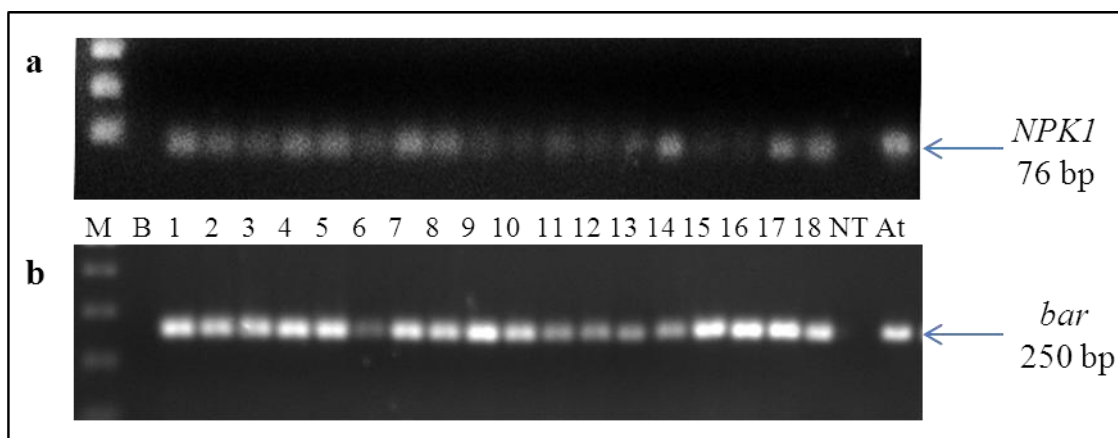
PCR analizom genomske DNK izolovane iz potencijalno transformisanih izdanaka (11 regenerisanih iz hipokotila i 11 regenerisanih iz SE) potvrđeno je prisustvo produkata amplifikacije očekivane veličine od 646 bp (*NPKI*) i 484 bp (*bar*) kod svih analiziranih linija kao i kod bakterijske DNK kao pozitivne kontrole i njihovo odsustvo kod odgovarajućih, netransformisanih kontrolnih uzoraka. Odsustvo amplifikacije fragmenta od približno 390 bp, koji pokriva sekvencu *virG* gena, potvrdilo je da analizirane linije nisu kontaminirane agrobakterijom (Slika 4.21).



**Slika 4.21.** PCR analiza T<sub>0</sub> izdanaka karfiola transformisanih sa EHA101 (pSHX004) uz korišćenje *NPKI* (a), *bar* (b) i *virG* (c) prajmera. M: DNK standard (100 bp DNA ladder, Fermentas), 1-22: potencijalno transformisane linije, NT: netransformisana kontrola, At: plazmidna DNK pSHX004 upotrebljena kao pozitivna kontrola za *NPKI*, *bar* i *virG*, B: blank.

##### 4.3.2.5.2. RT-PCR analiza transformisanih linija

Ekspresija *NPKI* i *bar* gena kod transformisanih linija T<sub>0</sub> generacije gajenih *in vitro* pokazana je RT-PCR analizom. Potvrđeno je prisustvo produkata amplifikacije očekivane veličine od 76 bp (*NPKI*) i 250 bp (*bar*) kod svih analiziranih linija kao i kod plazmidne DNK korišćene kao pozitivna kontrola, kao i odsustvo oba gena kod odgovarajućih, netransformisanih kontrolnih uzoraka (Slika 4.22).

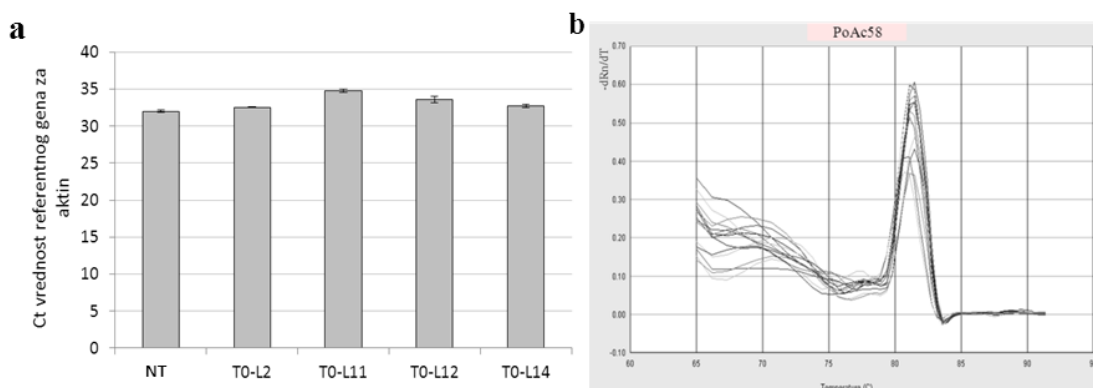


**Slika 4.22.** RT-PCR analiza ekspresije *NPK1* (a) i *bar* (b) gena kod T<sub>0</sub> transformisanih izdanaka karfiola. M: DNK standard (100 bp DNA ladder, Fermentas), 1-18: transformisane linije, NT: netransformisana kontrola, At: plazmidna DNK korišćena kao pozitivna kontrola za *NPK1* i *bar*.

#### 4.3.2.5.3. qPCR analiza transformisanih linija

Nivo ekspresije *NPK1*, odnosno *bar* gena u odabranim transformisanim linijama karfiola T<sub>0</sub> i T<sub>1</sub> generacije određen je pomoću qPCR analize. cDNK fragmenti gena *NPK1* i *bar*, dužine 76 bp, odnosno 250 bp, amplifikovani su sparivanjem prajmera na 56°C pod standardnim uslovima qPCR reakcije nakon čega je specifičnost amplifikacije proverena analizom krive topljenja produkata.

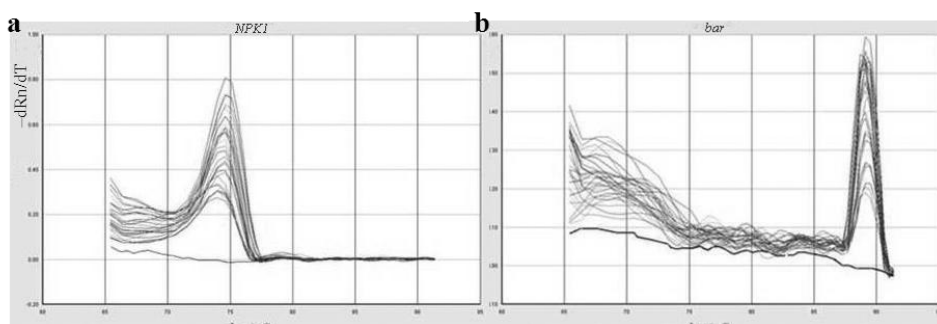
Ujednačena količina ukupne cDNK u svim uzorcima na početku qPCR analize potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena *PoAc58*. Prosečan broj ciklusa qPCR reakcije posle kojih se dostiže prag detekcije *PoAc58* produkta (Ct vrednost) bio je ujednačen među svim analiziranim uzorcima izdanaka sa vrednostima od  $33,06 \pm 0,48$  (Slika 4.23 a).



**Slika 4.23.** Prosečne Ct vrednosti referentnog gena za aktin kod kontrolnih, netransformisanih (NT) izdanaka i  $T_0$  transformisanih izdanaka (T0-L2, T0-L11, T0-L12 i T0-L14) (a). Prikazani podaci predstavljaju srednju Ct vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Odsustvo statistički značajne razlike između Ct vrednosti kod bilo koja dva uzorka cDNK prema Fišerovom LSD testu ( $P \leq 0,05$ ) ukazuje na ujednačeno prisustvo transkripta aktinskog gena u svim uzorcima. (b) Zbirne krive topljenja produkata qPCR amplifikacije cDNK izdanaka pomoću prajmera specifičnih za sekvencu aktinskog gena.

Specifičnost amplifikacije gena *PoAc58* pokazana je analizom krive topljenja. Kod svih analiziranih uzoraka zabeležen je ujednačen oblik krive i jedinstven maksimum vrednosti  $-dRn/dT$  u temperaturnom opsegu od 81-83°C (Slika 4.23 b).

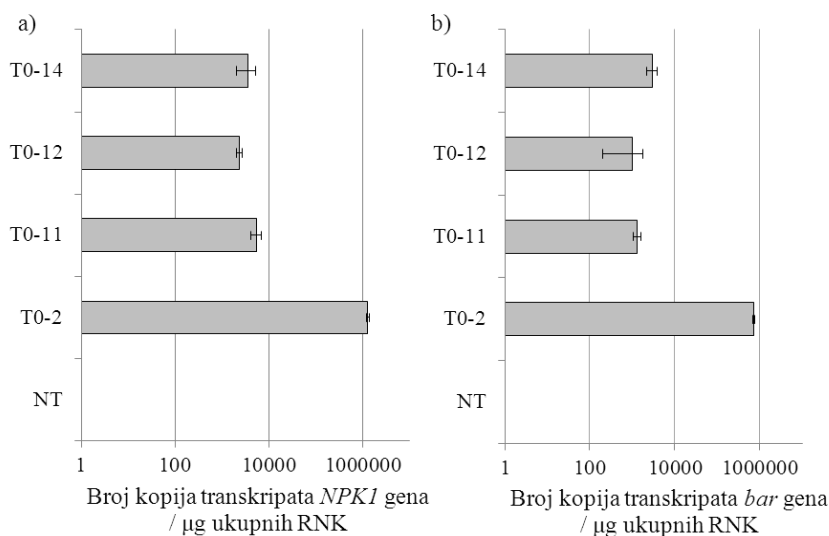
Specifičnost amplifikacije gena *NPK1* i *bar* pokazana je analizom krive topljenja. Kod svih analiziranih uzoraka zabeležen je ujednačen oblik krive i jedinstven maksimum vrednosti  $-dRn/dT$  u temperaturnom opsegu od 74-75°C (*NPK1*) (Slika 4.24 a) i 88-89 °C (*bar*) (Slika 4.24 b).



**Slika 4.24.** Zbirne krive topljenja produkata qPCR amplifikacije cDNK izdanaka kontrolnih (NT) i transformisanih biljaka karfiola pomoću prajmera specifičnih za sekvencu *NPK1* (a) i *bar* (b) gena. Ujednačen oblik krive i položaj maksimuma potvrđuju specifičnost amplifikacije.

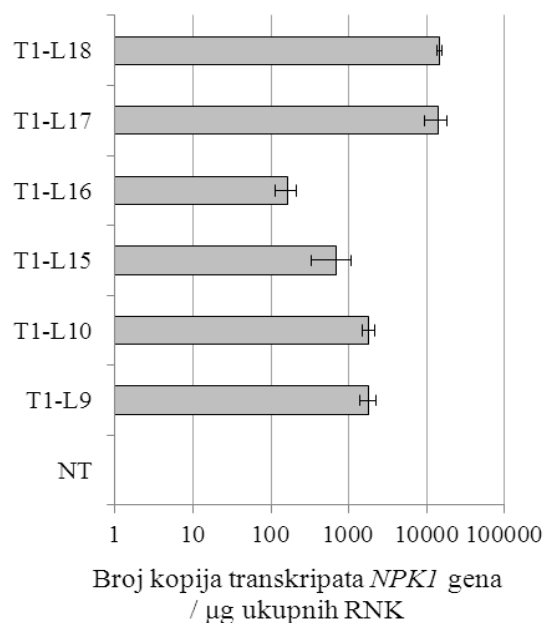


qPCR analiza je urađena kod četiri odabrane transformisane linije iz generacije T<sub>0</sub> (T<sub>0</sub>-L2, T<sub>0</sub>-L11, T<sub>0</sub>-L12 i T<sub>0</sub>-L14) i šest linija iz generacije T<sub>1</sub> (T<sub>1</sub>-L9, T<sub>1</sub>-L10, T<sub>1</sub>-L15-18). Slika 4.25 prikazuje da je broj kopija *NPKI* transkripata u izdancima varirao od 2341 do 1272\*10<sup>4</sup> po µg ukupne RNK, a *bar* transkripata od 990 do 7180\*10<sup>2</sup> po µg RNK. Najveći broj kopija *NPKI* i *bar* transkripata detektovan je kod izdanaka linije T<sub>0</sub>-L2, a najmanji kod linije T<sub>0</sub>-L12. U kontrolnim netransformisanim izdancima (NT) nije dolazilo do specifične amplifikacije fragmenata sekvenci *NPKI* i *bar*.



**Slika 4.25.** Broj kopija *NPKI* (a) i *bar* (b) transkripata u izdancima T<sub>0</sub> transformisanih linija karfiola gajenih *in vitro*. Količina transkripta *NPKI*, odnosno *bar* prikazana je kao broj kopija po mikrogramu ukupne RNK. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± standardna greška (n=3). Kod kontrolnih biljaka (NT) nije dolazilo do specifične amplifikacije fragmenata sekvenci *NPKI* i *bar*.

Kod svih šest testiranih T<sub>1</sub> linija, dobijenih iz semena nakon samooplođenja aklimatizovanih T<sub>0</sub> linija, dokazana je ekspresija *NPKI* gena. Značajna ekspresija *NPKI* utvrđena je kod dve linije T<sub>1</sub>-L17 i T<sub>1</sub>-L18 sa po 13870 i 14400 kopija transkripata po µg ukupne RNK (Slika 4.26). Najniža ekspresija *NPKI* gena je zabeležena kod T<sub>1</sub>-L16. U kontrolnim netransformisanim izdancima (NT) nije dolazilo do specifične amplifikacije fragmenata sekvenci *NPKI* (Slika 4.26).



**Slika 4.26.** Broj kopija *NPK1* transkripata u izdancima T<sub>1</sub> transformisanih linija karfiola gajenih *in vitro*. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Kod kontrolnih biljaka (NT) nije dolazilo do specifične amplifikacije fragmenata sekvenci *NPK1*.

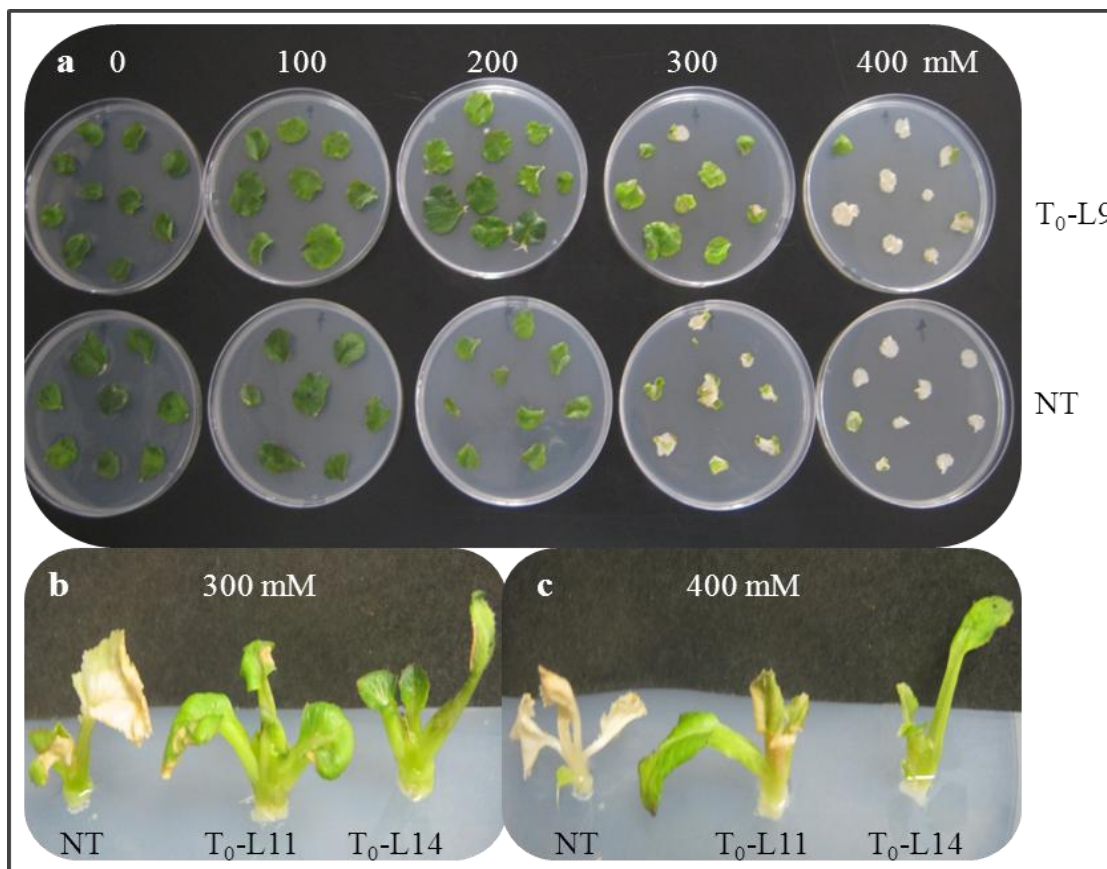
#### 4.3.3. Efekat povišenih koncentracija NaCl *in vitro* na transformisane biljke karfiola

Uticaj različitih koncentracija NaCl (0-400 mM) ispitivan je u preliminarnom testu sa listovima, izolovanih sa biljaka transformisane linije T<sub>0</sub>-L9, kao i u testu sa celim pojedinačno gajenim transformisanim biljkama *in vitro* linija T<sub>0</sub>-L11 i T<sub>0</sub>-L14. Na taj način određena je kritična koncentracija NaCl koju transformisane biljke mogu da prežive, a koja je bila toksična za kontrolne netransformisane (NT) biljke. Nakon 5 dana tretmana na podlozi sa 200 mM NaCl, uočavale su se vidljive razlike u boji listova kontrolne NT biljke i transformisane T<sub>0</sub>-L9 linije (Slika 4.27 a). Listovi izolovani sa kontrolne NT biljke su bili svetle zelen žute boje što je ukazivalo na smanjeni sadržaj hlorofila u njima. Na podlozi sa 300 mM NaCl dolazilo je potpunog izbeljivanja listova NT biljke dok su se kod T<sub>0</sub>-L9 listova zapažale tek pojedinačne naznake hloroze (Slika 4.27 a). Na 400 mM NaCl hlorofil su izgubili listovi i NT i T<sub>0</sub>-L9 transformisane biljke.

Netransformisane NT biljke gajene *in vitro* na podlozi sa 100 mM NaCl pokazivale su umerene simptome stresa koje su se ogledale u vidu hloroze većih delova

ili celih pojedinačnih listova. Na podlozi sa 200 mM NaCl, na NT biljkama pored hloroze zapažena i ozbiljnija oštećenja u vidu nekroze delova ili celih listova, dok je u prisustvu 300 mM NaCl u hranljivoj podlozi dolazilo do potpunog propadanja biljaka nakon 7-10 dana. S druge strane, na transformisanim biljkama sporadično su se javljali znaci nekroze tek na 300 mM NaCl, ali su preživljavale ovaj tretman (Slika 4.27 b). Transformisane linije T<sub>0</sub>-L11 i T<sub>0</sub>-L14 su preživljavale i na podlozi sa 400 mM NaCl (Slika 4.27 c).

Prikazani rezultati su ukazali na to da su koncentracije manje od 300 mM NaCl, na kojima i kontrolne NT biljke preživljavaju, odgovarajuće za postavljanje stres tretmana radi procene tolerancije transformisanih linija prema povišenoj koncentraciji NaCl u podlozi *in vitro*, jer omogućavaju poređenje odgovora netransformisanih i transformisanih biljaka.



**Slika 4.27.** Efekat rastućih koncentracija NaCl-a (0, 100, 200, 300 i 400 mM) na listove izolovane netransformisane (NT) i T<sub>0</sub>-L9 transformisane biljke (a); 4 nedelje stare netransformisane (NT) i transformisane biljke (T<sub>0</sub>-L11 i T<sub>0</sub>-L14) gajene 5 dana *in vitro* na MS podlozi sa 300 mM NaCl (b) i sa 400 mM NaCl (c).

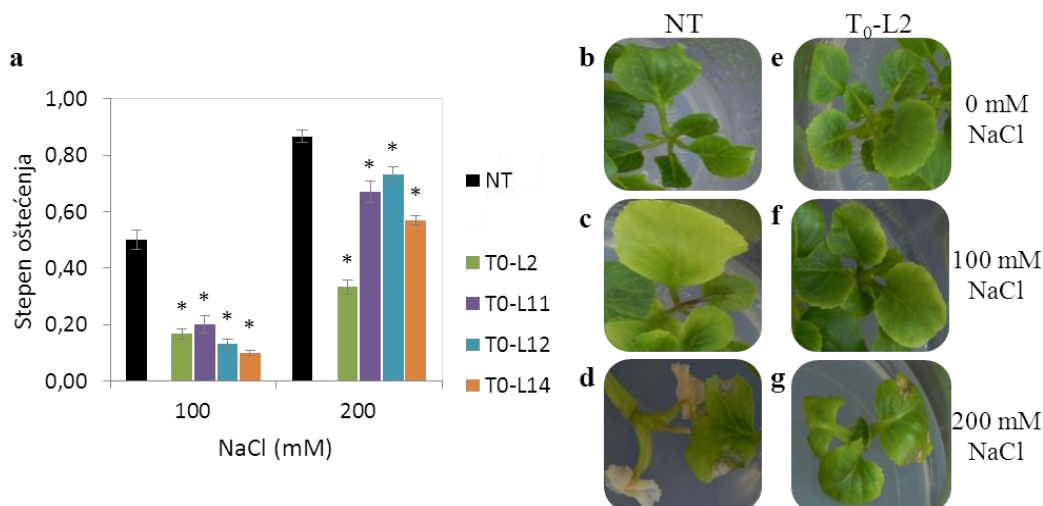
#### 4.3.3.1. Rast i morfološke karakteristike transformisanih biljaka gajenih u uslovima povećane koncentracije NaCl *in vitro*

Kod biljaka četiri transformisane T<sub>0</sub> linije (L2, L11, L12 i L14) i netransformisane kontrole (NT), nakon 7 dana tretmana na MS podlogama koje su sadržale NaCl u koncentracijama od 0, 100 i 200 mM, ocenjivane su morfološke (stepen oštećenja, parametri rasta, ožiljavanje) i fiziološke promene (sadržaj hlorofila, karotenoida, redukovanih šećera, prolina i aktivnost antioksidativnih enzima).

Najpre je izvršena vizuelna procena **stepena oštećenja** na *in vitro* gajenim biljkama na način koji je opisan u poglavlju 3.4.2.

U prisustvu 100 mM NaCl u hranljivoj podlozi na T<sub>0</sub> biljkama došlo je do pojave hloroze po ivicama pojedinih listova (Slika 4.28 e), dok je kod NT biljaka hloroza obuhvatala veće delove ili čak čitave površine listova (Slika 4.28 d). Međutim, na podlozi sa 200 mM NaCl, na NT biljkama su pored hloroze zapažena i ozbiljnija oštećenja u vidu nekroze delova ili celih listova (Slika 4.28 f), dok su oštećenja na transformisanim linijama bila umerenog intenziteta u vidu slabe hloroze i sa sporadičnim pojavama nekroze na pojedinim listovima (Slika 4.28 g).

Ocenjivanjem stepena oštećenja tretiranih biljaka i normalizovanjem njihovih vrednosti u odnosu na one koje su dodeljene netretiranim biljkama (sa podloga bez NaCl), utvrđeno je da su sve T<sub>0</sub> linije imale statistčki značajno niži stepen oštećenja u odnosu na NT biljke na oba tretmana (Slika 4.28 a). Dok je na podlozi sa 100 mM NaCl srednji stepen oštećenja za NT biljke iznosio 0,5, kod svih transformisanih linija ova ocena se kretala od 0,2 kod L-11 do 0,1 kod T<sub>0</sub>-L14 (Slika 4.28 a). Na podlozi sa 200 mM NaCl najmanji stepen oštećenja od 0,33 zabeležen je takođe kod T<sub>0</sub>-L2 i bio je 2 puta niži nego kod ostalih transformisanih linija, a čak 3 puta niži od stepena oštećenja dobijenog kod netransformisanih biljaka.



**Slika 4.28.** Ocena tolerantnosti *NPK1* transformisanih T<sub>0</sub> i netransformisanih (NT) biljaka karfiola prema povećanoj koncentraciji NaCl u hranjivoj podlozi na osnovu stepena oštećenja biljaka *in vitro*. (a) Rezultati procenjenog stepena oštećenja prikazani su kao srednja vrednost ± standardna greška za n=30. Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između T<sub>0</sub> linije i NT kontrole u okviru istog tretmana sa NaCl (100 mM ili 200 mM NaCl) na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ). Reprezentativne slike izgleda izdanaka NT i T<sub>0</sub>-L2 linije posle 7 dana gajenja na MS podlozi sa 0 mM NaCl (b i e), 100 mM (c i f) i 200 mM (d i g).

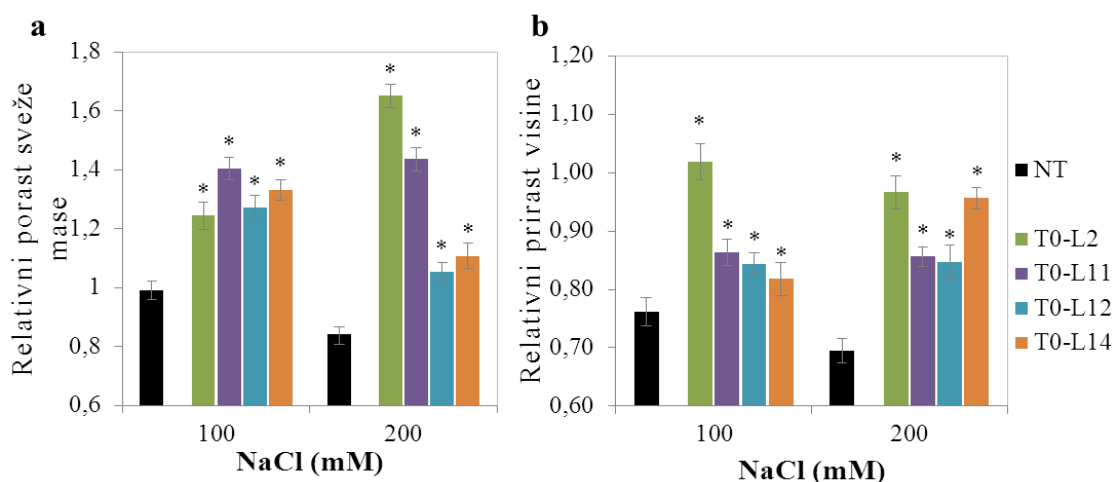
Merenjem **porasta sveže mase** kod netransformisanih biljaka karfiola nakon 7 dana tretmana na podlozi sa NaCl, uočeno je da umereni stres izazvan prisustvom 100 mM nije doveo do promene porasta mase, ali da je sa povećanjem koncentracije NaCl na 200 mM došlo do redukcije porasta sveže mase izdanaka (Slika 4.29 a). Dok je porast sveže mase na podlozi bez ili sa 100 mM NaCl iznosio 85 mg, na podlozi sa 200 mM porast sveže mase je bio 72 mg.

Nasuprot ovome sve T<sub>0</sub> biljke su naizgled normalno rasle na podlogama sa obe primenjene koncentracije NaCl i kod njih je posle 7 dana zabeležen veći porast sveže mase u odnosu na biljke koje su rasle na podlozi bez NaCl. Sve transformisane linije imale su 30- 40% veći porast sveže mase na podlozi sa 100 mM u odnosu na netretirane biljke iste linije (za linije T<sub>0</sub>-T<sub>2</sub>, T<sub>11</sub>, T<sub>12</sub> i T<sub>14</sub> porast mase netretiranih biljaka je iznosio 78; 130; 125 i 117 mg, dok je na 100 mM porast sveže mase za iste linije bio 96; 183; 159 i 156 mg). I dok je sa povećanjem koncentracije NaCl na 200 mM kod linije T<sub>0</sub>-L11 porast sveže mase ostao sličan onom izmerenom na nižoj koncentraciji, kod linija T<sub>0</sub>-L12 i T<sub>0</sub>-L14 porast sveže mase se vratio na nivo sličan onom kod

netretiranih biljaka, dok se kod linije T<sub>0</sub>-L2 i na ovoj koncentraciji nastavio trend povećanja mase (za 128 mg). (Slika 4.29 a).

Nakon 7 dana gajenja na podlogama sa NaCl promene sveže mase svih transgenih linija izazvane tretmanima NaCl bile su statistički značajno različite u odnosu na promene koje su zabeležene za NT biljke (Slika 4.29 a).

Za razliku od rezultata dobijenih merenjem porasta sveže mase, primećeno je da je NaCl tretman doveo do smanjenja **prirasta visine** kako netransformisanih biljaka (sa 5,67 mm na podlozi bez NaCl, na 4,32 mm na 100 mM i 3,94 mm na 200 mM), tako i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola (Slika 4.29 b). Kod linija T<sub>0</sub>-L11 i T<sub>0</sub>-L12 prirast visina netretiranih biljaka je sa 8,57 i 12,17 mm opala na 7,40 i 10,27 mm na 100 mM i 7,33 i 10,31 mm na 200 mM. Jedino kod linije T<sub>0</sub>-L2 nije došlo do značajnih promena u prirastu visine biljaka nakon NaCl tretmana (6,74; 6,87 i 6,51 mm na podlogama sa 0, 100 i 200 mM), dok je za liniju T<sub>0</sub>-L14 zabeležen veći prirast u visini na višoj koncentracijama (10,46; 8,55 i 10,00 mm na podlogama sa 0, 100 i 200 mM). Ipak, kod svih transformisanih linija karfiola tretman NaCl doveo je do statistički značajno manje redukcije prirasta visine biljaka (Slika 4.29 b).



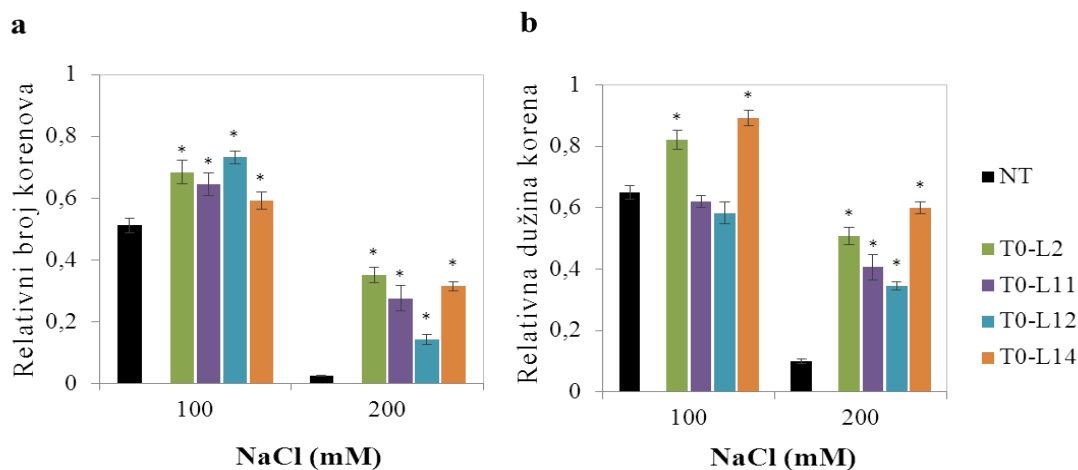
**Slika 4.29.** Efekti NaCl na porast sveže mase (a) i prirast visine (b) netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola. Za svaku liniju vrednosti dobijene na tretmanu sa NaCl su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ± standardna greška (n=30). Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između svake transformisane linije i NT kontrole u okviru istog tretmana na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ).

Kod svih testiranih linija do **ožiljavanja** je došlo nakon 3 nedelje gajenja na podlozi sa 1 mg l<sup>-1</sup> IBA. Dodavanje NaCl u podlogu produžilo je period do pojave prvih

korenova na 4 nedelje i uticalo, kako na broj formiranih korenova po izdanku, tako i na njihovu dužinu (Slika 4.30).

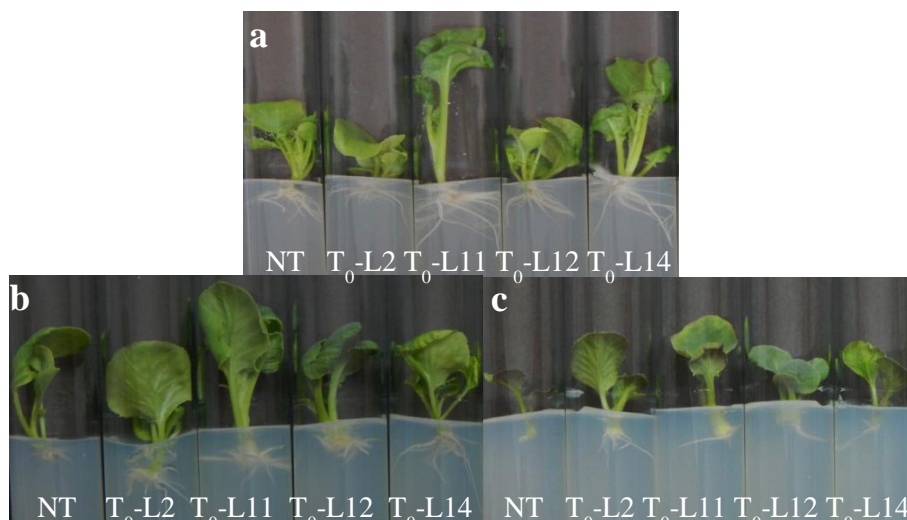
Kod NT biljaka uočeno je značajno smanjenje broja i dužine korenova nakon oba tretmana NaCl (100 i 200 mM), a posebno je bilo izraženo na podlozi sa 200 mM NaCl. Prisustvo NaCl u koncentraciji od 100 mM kod ovih biljaka dovelo je do smanjenja broja korenova od oko 50% (10,5 korenova u odnosu na 20,5 korenova kod netretiranih biljaka) i dužine najdužeg korena od 35% (13 mm u odnosu na 20 mm kod netretiranih biljaka). Na tretmanu sa 200 mM NaCl srednji broj korenova po biljci i dalje se smanjivao u odnosu na tretman bez NaCl za čak 98% (0,5), a njihova dužina u proseku je iznosila svega 2 mm.

Kod T<sub>0</sub> biljaka NaCl tretman je takođe uticao na smanjivanje vrednosti za parametre ožiljavanja, ali u statistički značajno manjoj meri nego kod NT, naročito na 200 mM NaCl. Obe koncentracije NaCl su negativno uticale na dužinu najdužeg korena kod svih T<sub>0</sub> linija, a posebno kod onih gajenih na tretmanu sa 200 mM NaCl gde je dužina bila 2-3 puta manja od one postignute na kontrolnoj podlozi bez NaCl (11,33; 11,67; 9,67 i 13 mm za T<sub>0</sub>-L2, L11, L12 i L14 na 200 mM u odnosu na 22,33; 28,67; 28 i 21,67 mm za iste linije na 0 mM NaCl).



**Slika 4.30.** Relativni broj korenova po biljci (a) i relativna dužina korenova (b) kod netransformisanih (NT) i *NPK1* transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola nakon 4 nedelje gajenja na podlozi za ožiljavanje (MS + 1 mg l<sup>-1</sup> IBA) u prisustvu 100 i 200 mM NaCl. Za svaku liniju vrednosti dobijene na tretmanu sa NaCl su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ± standardna greška (n=10). Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između pojedinačne T<sub>0</sub> linije i NT kontrole u okviru istog tretmana sa NaCl na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ).

Jasne razlike u ožiljavanju, bujnosti korenovog sistema, između T<sub>0</sub> linija i NT biljaka koje su bile izložene NaCl tretmanu se lako mogu i vizuelno uočiti na slici 4.31 b i c.



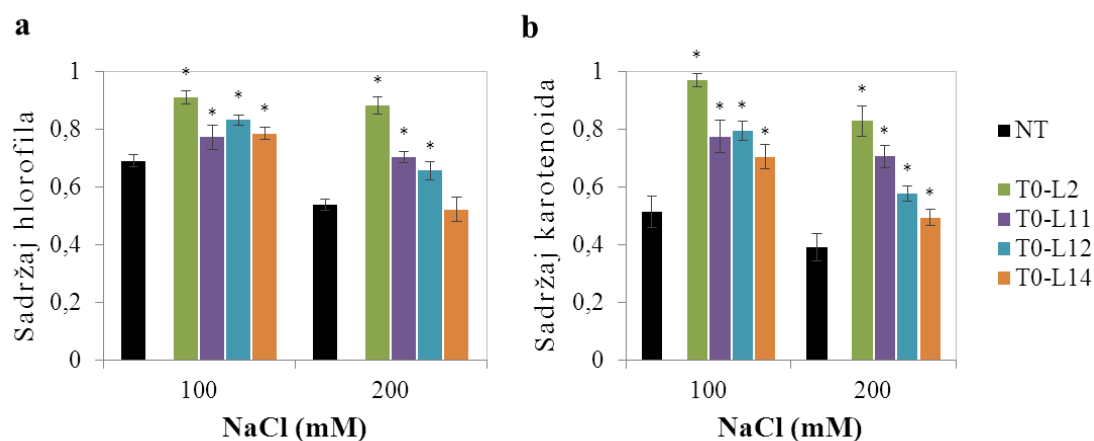
**Slika 4.31.** Ožiljavanje netransformisane (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> linija karfiola (T<sub>0</sub>-L2, L11, L12, L14) nakon 4 nedelje gajenja na podlozi za ožiljavanje (MS+ 1 mg l<sup>-1</sup> IBA) sa dodatkom NaCl u koncentraciji 0 mM (a), 100 mM (b) i 200 mM (c).

#### 4.3.3.2. Sadržaj hlorofila i karotenoida kod transformisanih biljaka gajenih u uslovima povećane koncentracije NaC *in vitro*

U odsustvu stresa sadržaj hlorofila kod svih transformisanih linija, izuzev linije T<sub>0</sub>-L11, je bio za 2-3 viši u odnosu na netransformisanu liniju. Dok je kod NT biljaka ukupna količina hlorofila bila 16,17 mg g<sup>-1</sup> FW, kod linija L2, L11, L12 i L14 izmereno je 30,40; 12,12; 44,47 i 38,56 mg g<sup>-1</sup> FW.

Negativan uticaj obe koncentracije NaCl na sadržaj hlorofila bio je veoma izražen kod NT biljaka, gde je tretman sa 100 mM snizio sadržaj hlorofila za 31% (11,16 mg g<sup>-1</sup> FW) dok je na 200 mM ova redukcija bila još više izražana i iznosila je blizu 46% (8,73 mg g<sup>-1</sup> FW). Kod transformisanih T<sub>0</sub> linija gubitak ukupnog hlorofila kao posledica NaCl tretmana bio je značajno manji nego kod NT biljaka. Transformisana linija T<sub>0</sub>-L2 je bila najotpornija na prisustvo NaCl u podlozi što se ogledalo neznatnim smanjenjem sadržaja ukupnog hlorofila od 9% na podlozi sa 100 mM, odnosno 12% na podlozi sa 200 mM (Slika 4.32 a). Najosetljivija transformisana linija na gubitak hlorofila bila je T<sub>0</sub>-L11 sa negativna promena od 26% zabeleženom na podlozi sa 100 mM i 50% na podlozi sa 200 mM NaCl (Slika 4.32 a).





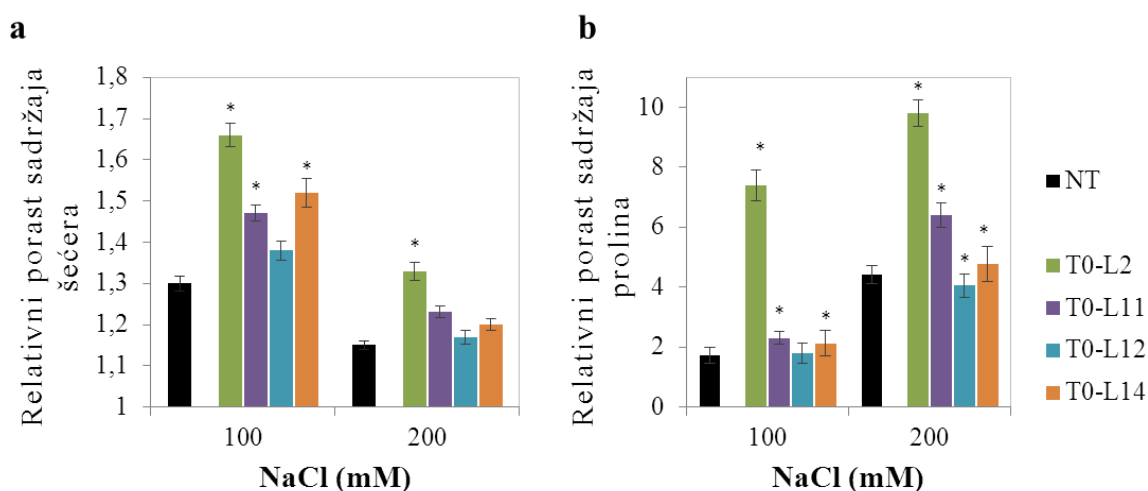
**Slika 4.32.** Promene sadržaja hlorofila (a) i karotenoida (b) kod netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola nakon 7 dana tretmana sa 100 i 200 mM NaCl. Vrednosti na tretmanu za svaku liniju su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ± standardna greška (n=3). Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između T<sub>0</sub> i NT biljaka u okviru istog tretmana sa NaCl na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ).

Za razliku od hlorofila, sadržaj karotenoida je u odsustvu stresa bio niži kod transformisanih linija u odnosu na NT biljke, izuzev kod linije T<sub>0</sub>-L2 kod koje je bio 2 puta veći. NT biljke su pokazale najznačajnije smanjenje koncentracije karotenoida od 49 i 61% nakon tretmana na podlozi sa 100 mM odnosno 200 mM NaCl (Slika 4.32 b). Za razliku od ovih biljaka, linije T<sub>0</sub>-L2, L11, L12 i L14 su nakon gajenja na podlozi sa 100 mM NaCl zadržavale 97, 77, 80 i 70 % karotenoida odnosno 83, 71, 58 i 49 % na podlozi sa 200 mM NaCl (Slika 4.32 b). Najmanji negativan uticaj NaCl na sadržaj karotenoida zabeležen je kod linije T<sub>0</sub>-L2 od svega 3% na 100 mM i 17% na 200 mM NaCl.

#### 4.3.3.3. Sadržaj osmolita (šećera i prolina) kod transformisanih biljaka gajenih u uslovima povećane koncentracije NaC *in vitro*

Koncentracija ukupnih šećera i prolina u *NPK1* transformisanim biljkama kafiola je merena radi utvrđivanja stepena osmotskog prilagođavanja biljaka na stres izazvan povećanom koncentracijom NaCl u podlozi. Sadržaj šećera u odsustvu stresa je kod netransformisanih biljaka iznosio 0,34 mg mg<sup>-1</sup> FW. Kod T<sub>0</sub> transgenih linija T<sub>0</sub>-L2, L11 i L14 izmeren je sličan sadržaj, dok linije T<sub>0</sub>-L12 bio je za oko 1,5 puta viši (0,55 mg mg<sup>-1</sup> FW).

Nakon dodavanja NaCl u podlogu došlo je do značajnog povećanja sadržaja šećera i kod NT i kod transformisanih T<sub>0</sub> biljaka. Ove promene bile su uočljivije na podlozi sa 100 nego sa 200 mM NaCl. Na podlozi sa 100 mM samo je kod linije T<sub>0</sub>-L12 povećanje od oko 1,4 puta je bilo na nivou onog zabeleženog kod NT kontrole gde je povećanje iznosilo 1,3 puta. Kod ostalih T<sub>0</sub> linija povećanje nivoa šećera je bilo znatno veće (Slika 4.33 a). Najveće promene zabeležene su kod linije T<sub>0</sub>-L2 sa porastom u sadržaju šećera od 1,65 puta na 100 mM NaCl i 1,3 puta na 200 mM NaCl. Sa povećanjem sadržaja NaCl u podlozi promene koncentracija šećera bile su dosta manje i jedino je kod linije T<sub>0</sub>-L2 ova promena od oko 32% bila statistički značajno veća u odnosu na promenu zabeleženu kod NT biljaka (Slika 4.33 a).



**Slika 4.33.** Promena sadržaja šećera (a) i prolina (b) kod netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola nakon 7 dana tretmana sa 100 mM i 200 mM NaCl. Vrednosti na tretmanu za svaku liniju su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti ± standardna greška (n=3). Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između transformisane linije i NT kontrole u okviru istog tretmana sa NaCl na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ).

Merenjem sadržaja prolina utvrđeno je da kao posledica izlaganja biljaka karfiola povišenom sadržaju NaCl dolazi do porasta njegove koncentracije kako kod netransformisanih, tako i kod svih analiziranih transformisanih biljaka karfiola (Slika 4.33. b). U uslovima bez stresa sadržaj prolina u NT biljkama iznosio je 5,82  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW, da bi nakon izlaganja stresu porastao na 10,02  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW kod 100 mM i 25,66  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW kod 200 mM NaCl tretmana.

Kod transformisanih linija sadržaj prolina u odsustvu stresa je bio za 1,5 puta (kod T<sub>0</sub>-L14) do 2,3 puta (kod T<sub>0</sub>-L2) viši u odnosu na NT biljke. Niži nivo prolina u odsustvu stresa u odnosu na NT biljke zabeležen je samo kod linije T<sub>0</sub>-L11 (3,77 μg g<sup>-1</sup> FW).

Najveći porast sadržaja prolina, nakon izlaganja povišenim koncentracijama NaCl, zabeležen je kod biljaka linije T<sub>0</sub>-L2 kod koje je sadržaj prolina bio najveći i u odsustvu stresa (13,14 μg g<sup>-1</sup> FW). Kod ovih biljaka je nakon gajenja na podlozi sa 100 mM NaCl sadržaj prolina bio 7,4 puta veći, a na podlozi sa 200 mM NaCl 9,8 puta veći u odnosu na biljke iste linije gajene na podlozi bez NaCl. U odnosu na porast sadržaja prolina kod NT kontrolnih biljaka, porast kod linije T<sub>0</sub>-L2 je bio 4 puta veći na 100 mM NaCl i 2 puta veći na 200 mM NaCl. Na podlozi sa 200 mM NaCl do statistički značajnog porasta dolazilo je i kod linija T<sub>0</sub>-L11 i T<sub>0</sub>-L14. Kod linije T<sub>0</sub>-L12 je na podlozi sa 100 mM NaCl sadržaj prolina bio na nivou zabeleženom kod NT kontrole, dok je relativni porast na tretmanu sa 200 mM NaCl bio nešto niži u poređenju sa NT kontrolom linijom (Slika 4.33 b).

#### **4.3.3.4. Aktivnost antioksidativnih enzima – peroksidaza (POD), katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD)**

Aktivnost POD kod svih analiziranih *NPKI* transformisanih linija gajenih pod optimalnim uslovima *in vitro* je bila značajno viša u odnosu na netransformisane (NT) biljke. Dok je kod NT biljaka izmerena aktivnost POD iznosila 3676,88 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina, kod transformisanih linija ona je iznosila od 4528,76 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina kod linije T<sub>0</sub>-L2 do 11068,71 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina kod T<sub>0</sub>-L14 (Tabela 4.16).

Nakon izlaganja biljaka osmotskom stresu izazvanom prisustvom povećane koncentracije NaCl u podlozi, kod svih analiziranih linija, uključujući i netransformisane, zabeleženo je povećanje aktivnosti ukupnih POD, na obe primenjene koncentracije NaCl (100 i 200 mM) (Tabela 4.16). Jedino je kod transformisane linije T<sub>0</sub>-L14 nakon tretmana na 200 mM NaCl aktivnost ovog enzima opala za 23% u odnosu na netretirane biljke iste linije. Uočeno je da je do većih promena u aktivnosti dolazilo nakon tretmana sa 100 mM NaCl u odnosu na tretman sa 200 mM NaCl. Aktivnost POD kod NT biljaka je bila 1,63 puta veća na 100 mM NaCl i 1,10 puta veća na podlozi sa 200 mM NaCl u odnosu na netretirane biljke iste linije. Najveće povećanje aktivnosti

POD izazvano prisustvom NaCl zabeleženo su kod linije T<sub>0</sub>-L11, od čak 2,39 puta na 100 mM NaCl i 1,87 puta na 200 mM NaCl. Uprkos tome što je povećanje aktivnosti POD kod linije T<sub>0</sub>-L12 bilo na nivou kontrolnih biljaka na oba tretmana (1,62 i 1,21 puta) postignute apsolutne vrednosti aktivnosti ovog enzima kod transformisane linije su bile na višem nivou usled veće početne aktivnosti (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16.** Promene aktivnosti peroksidaza (POD), kod netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola nakon 7 dana tretmana na podlogama sa 100 mM i 200 mM NaCl.

Linija	POD aktivnost (U mg <sup>-1</sup> ukupnih proteina)			Relativna promena POD aktivnosti	
	0 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl	100 mM/0 mM	200 mM/0 mM
NT	3676,88	5993,31	4044,57	1,63	1,10
T <sub>0</sub> -L2	4528,76	8559,36	7110,15	1,89*	1,57*
T <sub>0</sub> -L11	7561,78	18072,65	14140,52	2,39*	1,87*
T <sub>0</sub> -L12	5476,94	8872,64	6627,10	1,62	1,21
T <sub>0</sub> -L14	11068,71	12839,70	8522,91	1,16*	0,77*

Za svaku liniju vrednosti na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Zakrivljenim ciframa obeležene su vrednosti koje ukazuju na smanjivanje aktivnosti enzima nakon NaCl tretmana u odnosu na aktivnost kod biljaka iste linije koje su gajene na podlozi bez NaCl. Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između T<sub>0</sub> i NT biljaka u okviru istog tretmana sa NaCl na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ) za  $n=2$ . Crvenom zvezdicom označeno je statistički značajno smanjivanje aktivnosti enzima kod transformisane linije u poređenju sa NT biljkama.

Za razliku od POD, aktivnost CAT je kod netransformisanih biljaka bila i do 4 puta veća u odnosu na aktivnost zabeleženu kod svih transformisanih linija (Tabela 4.17). Dok su NT biljke imale prosečnu vrednost od 16497,70 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina, aktivnost ovog enzima kod svih transformisanih linija bila je značajno niža i kretala se od 2682,15 (T<sub>0</sub>-L12) do 3912,57 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina (T<sub>0</sub>-L2 i T<sub>0</sub>-14).

Sa dodavanjem NaCl u podlogu za gajenje aktivnost CAT kod NT biljaka ostala je na sličnom nivou zabeleženom kod netretiranih biljaka (Tabela 4.17). Kod tri od četiri analizirane transformisane linije (T<sub>0</sub>-L2, L11 i L14) nakon tretmana sa NaCl došlo je do povećanja aktivnosti ukupnih CAT. Najveća promena je zabeležena kod linije T<sub>0</sub>-L2 kod koje je tretman sa 100 mM NaCl doveo do porasta u aktivnosti od 1,85 puta, a tretman sa 200 mM NaCl do povećanja od čak 2,9 puta. Jedino je kod transformisane

linije T<sub>0</sub>-L12 došlo do značajnog smanjivanja aktivnosti od 17% na 100 mM i 27% na 200 mM NaCl (Tabela 4.17).

Upoređivanjem promena CAT aktivnosti izazvanih NaCl tretmanima transformisanih linija sa zabeleženim promenama u NT biljkama, uočava se da je aktivnost statistički značajno veća kod linija T<sub>0</sub>-L2, L12 i L14 na 100 mM i kod linija T<sub>0</sub>-L2 i L11 na 200 mM. Kod linije T<sub>0</sub>-L12 promene izazvane NaCl tretmanom bile su statistički značajno manje od promena zabeleženih kod tretiranih NT biljaka.

**Tabela 4.17.** Promene aktivnosti katalaza (CAT) kod netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola nakon 7 dana tretmana na podlogama sa 100 mM i 200 mM NaCl.

Linija	CAT aktivnost (U mg <sup>-1</sup> ukupnih proteina)			Relativna promena CAT aktivnosti	
	0 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl	100 mM/0 mM	200 mM/0 mM
NT	16497,70	18972,35	18312,45	1,15	1,11
T <sub>0</sub> -L2	3912,57	7238,25	11346,45	1,85*	2,90*
T <sub>0</sub> -L11	3844,48	5882,05	4728,71	1,53*	1,23*
T <sub>0</sub> -L12	2682,15	2226,18	1957,97	0,83*	0,73*
T <sub>0</sub> -L14	3912,57	5047,21	4264,70	1,29*	1,09

Za svaku liniju vrednosti na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Zakrivljenim ciframa obeležene su vrednosti koje ukazuju na smanjivanje aktivnosti enzima nakon NaCl tretmana u odnosu na aktivnost kod biljaka iste linije koje su gajene na podlozi bez NaCl. Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između T<sub>0</sub> i NT biljaka u okviru istog tretmana sa NaCl na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ) za  $n=2$ . Crvenom zvezdicom označeno je statistički značajno smanjivanje aktivnosti enzima kod transformisane linije u poređenju sa NT biljkama.

U odsustvu stresa aktivnost SOD kod 3 od 4 analizirane transformisane linije bila viša u odnosu na aktivnost kod NT biljaka od 12,02 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina (Tabela 4.18). Jedino je kod linije T<sub>0</sub>-L11 aktivnost ovog enzima bila oko 2 puta niža (5,92 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina).

Za razliku od prethodna dva enzima, kod NT biljaka došlo je do smanjivanja aktivnosti SOD nakon tretmana NaCl i to za 64% na 100 mM i 56% na 200 mM tretmanu. Smanjivanje aktivnosti SOD usled osmotskog stresa detektovano je i kod transformisanih linija T<sub>0</sub>-L2 i L14 nakon oba tretmana (za 20% odnosno 46% na 100 mM NaCl i za 64% odnosno 30% na 200 mM NaCl), ali je kod ovih biljaka izmerena aktivnost bila viša u odnosu na NT biljke (14,02 i 7,16 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina u

odnosu na 4,37 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina). Do povećanja aktivnosti SOD nakon NaCl tretmana dolazilo je samo kod linije T<sub>0</sub>-L11 (Tabela 4.18), tako da je uprkos početno manjoj aktivnosti SOD kod ove linije u odsustvu stresa, u uslovima stresa postignuta veća aktivnost u odnosu na netransformisane biljke (7,16 u odnosu na 4,33 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina na 100 mM NaCl i 6,69 u odnosu na 5,65 U mg<sup>-1</sup> ukupnih proteina na 200 mM NaCl). Kod linije T<sub>0</sub>-L12 aktivnost SOD se povećavala nakon tretmana sa 100 mM NaCl, dok je nakon tretmana sa 200 mM NaCl dolazilo do pada aktivnosti SOD u odnosu na kontrolni tretman za 32%.

**Tabela 4.18.** Promene aktivnosti superoksid dismutaza (SOD) kod netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub> biljaka karfiola nakon 7 dana tretmana na podlogama sa 100 mM i 200 mM NaCl.

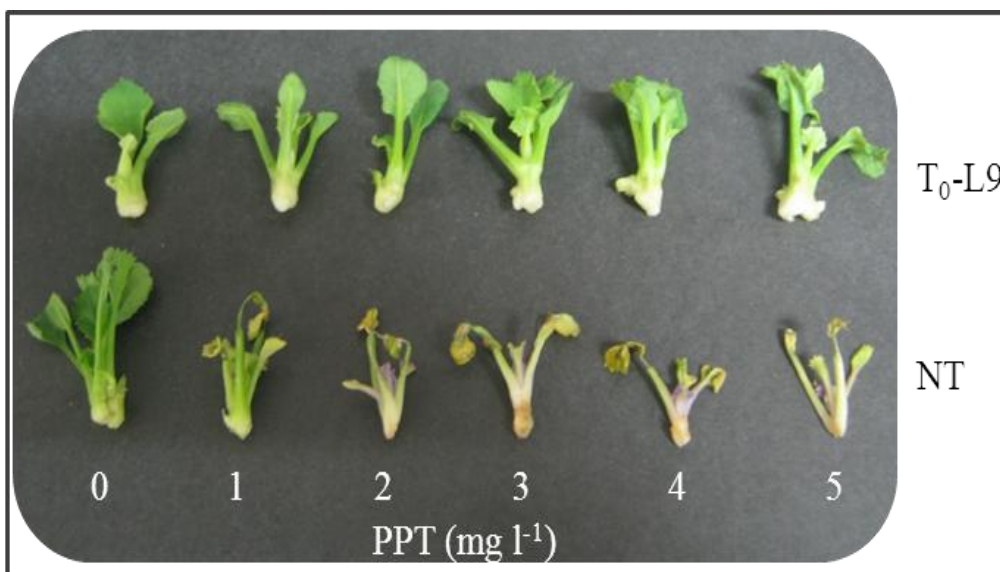
Linija	SOD aktivnost (U mg <sup>-1</sup> ukupnih proteina)			Relativna promena SOD aktivnosti	
	0 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl	100 mM/0 mM	200 mM/0 mM
NT	12,02	4,33	5,65	0,36	0,47
T <sub>0</sub> -L2	17,53	14,02	6,31	0,80*	0,36*
T <sub>0</sub> -L11	5,92	7,16	6,69	1,21*	1,13*
T <sub>0</sub> -L12	16,75	20,10	11,39	1,20*	0,68*
T <sub>0</sub> -L14	13,23	7,14	9,26	0,54*	0,70*

Za svaku liniju vrednosti na tretmanu su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene na podlozi bez NaCl (= 1). Zakrivljenim ciframa obeležene su vrednosti koje ukazuju na smanjivanje aktivnosti enzima nakon NaCl tretmana u odnosu na aktivnost kod biljaka iste linije koje su gajene na podlozi bez NaCl. Zvezdica predstavlja statistički značajne razlike između T<sub>0</sub> i NT biljaka u okviru istog tretmana sa NaCl na osnovu *t*-testa ( $P \leq 0,05$ ) za  $n=2$ . Crvenom zvezdicom označeno je statistički značajno smanjivanje aktivnosti enzima kod transformisane linije u poređenju sa NT biljkama.

#### 4.3.4. Otpornost transformisanih biljaka karfiola prema totalnom herbicidu fosfotricinu (PPT) *in vitro* i *ex vitro*

Otpornost na PPT ispitivana je kod *in vitro* gajenih izdanaka transformisanih biljaka karfiola (linija T<sub>0</sub>-L9) i NT kontrolnih biljaka na podlogama sa rastućim (0-5 mg l<sup>-1</sup>) koncentracijama PPT-a. Prvi znaci nekroze i propadanja netransformisanih NT biljaka, pri upotrebi PPT-a u koncentraciji 4 i 5 mg l<sup>-1</sup> su se javili već nakon 2 dana, dok su nakon 7 dana ovi izdanci propadali i na manjim koncentracijama PPT (2 mg l<sup>-1</sup>) (Slika 4.34). Biljke transformisane linije T<sub>0</sub>-L9 su normalno rasle na svim testiranim

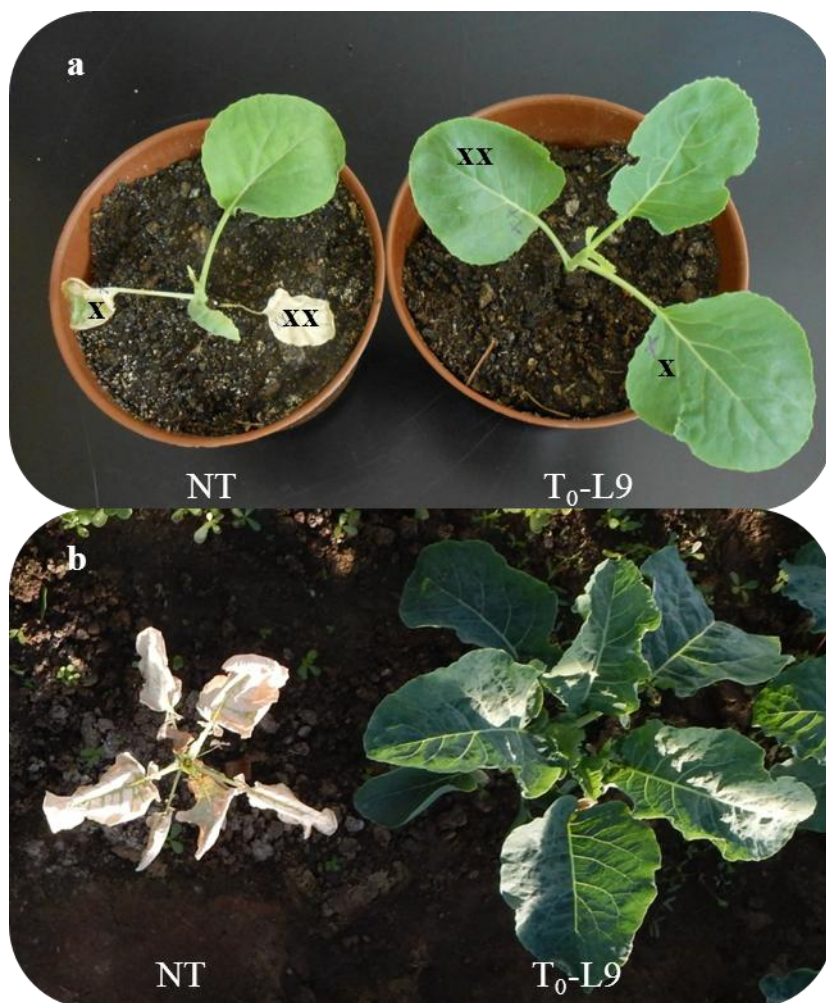
koncentracijama PPT-a bez vidljivih znakova nekroze i drugih mogućih oštećenja koja se javljaju upotrebom ovog herbicida (Slika 4.34).



**Slika 4.34.** Otpornost netransformisanih (NT) i transformisanih biljaka linije T<sub>0</sub>-L<sub>9</sub> prema rastućim koncentracijama PPT-a (0-5 mg l<sup>-1</sup>) nakon 7 dana gajenja *in vitro*.

Listovi mesec dana starih aklimatizovanih transformisanih T<sub>0</sub> biljaka linije T<sub>0</sub>-L<sub>9</sub> i NT biljaka iste starosti tretirani su rastvorima herbicida BASTA (300 i 600 mg l<sup>-1</sup> PPT) *ex vitro*. Oba tretmana nisu prouzrokovala bilo kakva oštećenja na listovima T<sub>0</sub> biljaka, dok su se na NT biljkama znaci nekroze javili već 2 odnosno 5 dana (zavisno od primenjene koncentracije PPT-a) nakon tretmana herbicidom (Slika 4.35 a). Nakon prskanja T<sub>0</sub> i NT biljaka starih 3 meseca rastvorom BASTA koji sadrži 600 mg l<sup>-1</sup> PPT, što je 2-3 puta veća koncentracija od one koja se preporučuje za suzbijanje većine korovskih vrsta, T<sub>0</sub> biljke su pokazale izuzetnu otpornost s obzirom da na njima nije bilo ikakvih promena nakon primene herbicida, dok su se NT kontrolne biljke potpuno osušile već 3 nakon dana posle prskanja (Slika 4.35 b).





**Slika 4.35.** Otpornost netransformisanih (NT) i transformisanih T<sub>0</sub>-L9 biljaka prema totalnom herbicidu BASTA. Tretman različitih listova iste aklimatizovane biljke mesec dana stare rastvorom herbicida BASTA koji sadrži 300 mg l<sup>-1</sup> (x) ili 600 mg l<sup>-1</sup> (xx) aktivne supstance PPT (a). Prskanje 3 meseca starih biljaka rastvorom BASTA sa 600 mg l<sup>-1</sup> PPT (b).



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. REGENERACIJA VARIJETETA *B. oleracea* L. PUTEM ORGANOGENEZE I SOMATSKE EMBRIOGENEZE

Uspešnost regeneracije svakog genotipa zavisi od adekvatnog izbora eksplantata, sastava hranljive podloge (koncentracija regulatora rastjenja i drugih materija koje se dodaju u podlogu) i uslova gajenja.

Kod više varijeteta *B. oleracea* (karfiola, kupusa, kelja i brokolija) ispitivanih u ovom radu, dominantan faktor koji je uticao na procenat regeneracije pupoljaka bio je tip eksplantata. Kod većine varijeteta, hipokotili su pokazali najveći procenat regeneracije (i do 91,67%). Regenerativni odgovor kotiledona je široko varirao u zavisnosti od varijeteta i podloge, a najmanji kapacitet regeneracij postignut je na segmentima korenova. Ovo je u saglasnosti sa publikovanim rezultatima koja su takođe pokazala da su eksplantati hipokotila bili najpogodniji za regeneraciju različitih varijeteta *B. oleracea* (Metz i sar., 1995a; Puddephat i sar., 2001; Sasaki, 2002; Munshi i sar., 2007; Ravanfar i sar., 2009; Siong i sar., 2012; Qamar i sar., 2014; Gerszberg i sar., 2015).

U našem radu, podloga sa BA je bila pogodna za regeneraciju pupoljaka kod svih varijeteta, izuzev kod karfiola kod koga je najbolja regeneracija postignuta na podlozi sa KIN. Pozitivan efekat BA na regeneraciju iz različitih eksplantata je pokazan kod različitih *B. oleracea* varijeteta od strane više autora (Bhalla i Smith, 1998; Christey i Earle, 1991; Sparrow i sar., 2004b; Qin i sar., 2006; Siong i sar., 2012). Prisustvo BA u hranljivoj podlozi značajno je povećavalo broj regenerisanih pupoljka po eksplantatu kod brzo-ciklusnih *B. oleracea* (Cheng i sar., 2001). Šta više, kod ove grupe biljaka do regeneracije pupoljaka je dolazilo približno 4 dana ranije na hipokotilima u prisustvu BA. Ravanfar i sar. (2009) su pokazali da je BA u kombinaciji sa NAA i 2,4-D mnogo efikasniji u indukciji regeneracije iz peteljki kotiledona *B. oleracea* var. *italica* u poređenju sa KIN i TDZ. Suprotno ovome, Rihan i sar. (2011) su najbolju regeneraciju iz cveta karfiola postigli na kombinaciji KIN i IBA.

Citokinini i auksini su ključni faktori koji utiču na regeneraciju kod mnogih *B. oleracea* varijeteta. Auksini indukuju formiranje kalusa dok je prisustvo citokinina neophodno za diferencijaciju kalusa u pupoljke. U našem eksperimentu dodavanje IBA

u regenerativnu podlogu povećavalo je frekvencu regeneracije iz hipokotila kod svih varijeteta. Kombinacija citokinina (BA) i auksina (NAA) u podlozi se pokazala kao najpogodnija za regeneraciju brokolija cv. Green Marvel (Ravanfar i sar., 2011), kao i za formiranje kalusa i diferencijaciju u pupoljke na segmentima hipokotila *B oleracea* L. var. *capitata* (Gerszberg i sar., 2015). Jednake koncentracije BA i IBA od 1,0 mg l<sup>-1</sup> u hranljivoj podlozi su bile najbolje za regeneraciju iz segmenata lista brokolija (Farzinebrahimi i sar., 2012).

Hiperhidriranost (vitifikacija) je problem kod *in vitro* kultura mnogih biljaka (Guo i Pulli, 1996; Kevers i sar., 2004; Ivanova i van Staden, 2008), uključujući i *Brassica* vrste kod kojih ovaj fenomen može znatno ometati klonalnu propagaciju (Vandemoortele, 1999). Nekoliko faktora je opisano kao odgovorno za vitifikaciju, a najvažniji je prisustvo citokinina, pre svega BA u podlozi (Gaspar i sar., 1987; Kataeva i sar., 1991; Debergh i sar., 1992). Li i sar. (2003) su takođe ukazali da je primena BA zajedno sa visokim vodnim potencijalom podloge glavni razlog vitifikacije pupoljaka, ali sa druge strane smanjenje koncentracije BA u podlozi smanjuje frekvencu regeneracije. Prilikom propagacije karfiola zapažen je sinergistični efekat između BA i visokog nivoa šećera u podlozi (Vandemoortele i sar., 1998). Vandemoortele i sar. (2001) su objavili jednostavnu proceduru propagacije pupoljaka karfiola bez pojave vitifikacije korišćenjem osmotskog pretretmana potapanjem eksplantata 24h u rastvor saharoze od -2 Mpa, pre kultivisanja na podlozi bez hormona, koji povećava količinu endogenog citokinina i samim tim ukida potrebu za primenom istog u podlozi.

Relativno visok procenat vitifikovanih pupoljka, posebno kod karfiola i kelja (preko 50%), prilikom regeneracije u našim ogledima na podlogama sa BA, umanjen je povećanjem koncentracije agara u regenerativnoj podlozi sa 7 g l<sup>-1</sup> na 8 g l<sup>-1</sup>. Smanjenje procenta vitifikacije na podlogama sa povećanom koncentracijom agara se može objasniti povećanim viskozitetom podloge, što se odražava na apsorpciju vode (Casanova i sar., 2008) ili citokinina iz hranljive podloge (Debergh, 1983). Casanova i sar. (2008) su pokazali da procenat vitifikacije pupoljaka *Dianthus caryophyllus* L. opada sa povećanjem koncentracije agara u podlozi, ali i da prekomerno povećanje koncentracije agara (10 g l<sup>-1</sup>) može dovesti do uvenuća pupoljaka. Pupoljci su bili najvitalniji na podlozi sa agarom u koncentraciji od 8 g l<sup>-1</sup>.

Izdanci svih ispitivanih varijeteta su pokazivale spontano ožiljavanje na podlozi bez regulatora rastenja, što može ukazivati da kupusnjače imaju dovoljan endogeni nivo auksina potreban za ožiljavanje. Ožiljavanje kupusnjača se često postiže prostim uklanjanjem citokinina iz podloge (Sparrow i sar., 2006; Qamar i sar., 2014), ali u nekim slučajevima je neophodno dodavanje auksina (Bhalla i Singh, 2008; Singh i sar., 2009). U našem eksperimentu dodavanjem IBA u podlogu za ožiljavanje povećavao se broj korenova po izdanku kod svih ispitivanih varijeteta. Indukcija korena je kompleksan morfogogenetski proces na koji mogu uticati, u najvećoj meri auksini, ali i drugi endogeni i egzogeni faktori. Moncousin (1991) je razmatrao faktore kao što su mineralni i hormonalni sastav podloge za ožiljavanje, koncentracija šećera u podlozi, svetlo, temperatura i prisustvo fenolnih jedinjenja. Rezultati ovog rada su pokazali da je sadržaj šećera u podlozi za ožiljavanje značajno uticao na uspešnost aklimatizacije, i da su se na uslove *ex vitro* uspešnije adaptirale biljke ožiljene na podlozi sa većom koncentracijom saharoze. Publikovani rezultati su takođe pokazali da sadržaj saharoze u podlozi za ožiljavanje može biti važan faktor u aklimatizaciji i da može biti značajniji i od sastava hormona (Sretenović-Rajičić i sar., 2002).

Somatska embriogeneza, kao brži i poželjniji način za regeneraciju biljaka *in vitro* u odnosu na organogenezu, ređe je uspostavljena kod većine varijeteta *B. oleracea*. Mogući razlog je postojanje velikog broja ustaljenih protokola za regeneraciju putem organogeneze kod mnogih *Brassica* vrsta. Rezultati prezentovani u ovom radu pružaju podatke o indukciji somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona i uspostavljanju repetitivna embriogeneze kod dva ekonomski značajna varijeteta *B. oleracea*, belog kupusa (linija K7-L) i karfiola (cv. Raša).

Kod oba varijeteta izbor eksplantata je bio ključan za indukciju somatske embriogeneze. Pokušaji da se somatska embriogeneza indukuje iz različitih segmenata klijanaca na osnovu ranije objavljenih protokola kod drugih *B. oleracea* varijeteta (Qin i sar., 2007; Yang i sar., 2010), nisu dali rezultate, osim u slučaju korišćenja nezrelih zigotskih embriona kao eksplantata. Inače, nezreli zigotski embrioni su poznati kao pogodan materijal za indukciju somatske embriogeneze, jer poseduju embrio kompetentne ćelije koje mogu lako biti preusmerene na embriogeni put (Williams i Maheswaran, 1986). Ovo je posebno značajno kod vrsta (*Capsicum*, *Fabaceae*,

*Poaceae*) koje su problematične za regeneraciju *in vitro* (Ochoa-Alejo i Ramirez-Malagon, 2001; Choudhary i sar., 2009; Khalafalla i Hattori, 2000; Ahmad i sar., 2002).

Kod većine biljnih vrsta, embrio kompetentne ćelije zahtevaju neki fizički ili hemijski stimulus kako bi se razvile u somatske embrione (Williams i Maheswaran, 1986). Kao značajni induktivni faktori somatske embriogeneze kod mnogih biljnih vrsta su se pokazali auksini, posebno 2,4-D, uključujući i *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) (Gaj, 2001), koja je kao model biljka korišćena za molekularne analize somatske embriogeneze *in vitro* (Elhiti i sar., 2010). Međutim, upotreba auksina (2,4-D) u indukciji somatske embriogeneze može uticati na promenu genetičke stabilnosti embriogenih ćelija. To može rezultirati somaklonalnim varijacijama i posledično gubitkom embriogenog potencijala (Merkle i sar., 1995). Ove varijacije su često nasledne i zbog toga nepoželjne kod embriogenih klonova. Vrlo je važno detektovati ih rano u životnom ciklusu biljke kako bi se izbegle ekonomske štete ukoliko je reč o komercijalnoj proizvodnji. Mnogi istraživači su za procenu ovih varijacija kod *Brassica* vrsta koristili morfološke analize, izozome i ISSR (eng. *inter simple sequence repeat*) markere (King, 1995; Lazaro i Aguinagalde, 1998; Lim i sar., 1998; Leroy i sar., 2000). Analize su pokazale da biljke regenerisane iz neorganizovanog kalusa variraju mnogo više nego one regenerisane iz organizovanog kalusa, dok se varijacije gotovo i ne dešavaju prilikom direktne regeneracije (Leroy i sar., 2001). Stoga je od velikog značaja da se indukcija somatskih embriona postigne na hranljivim podlogama bez regulatora rastenja, pogotovo ako se radi o direktnoj embriogenezi kao što je to bio slučaj kod vrste *Brassica napus* (Koh i Loh, 2000).

U našem radu potencijal za embriogenezu nezrelih embriona karfiola i kupusa je bio takav da su se somatski embrioni indukovali putem direktne embriogeneze na hranljivoj podlozi bez dodatka regulatora rastenja, za razliku od nekih ranijih saopštenja gde je za indukciju embriogenog kalusa iz segmenata hipokotila karfiola bio potreban 2,4-D (Leroy i sar., 2000). Novouspostavljeni sistem je ujedno i efikasniji, s obzirom na frekvencu embriogeneze blizu 90% u odnosu na 27,4% koliko je iznosila u prethodno pomenutom protokolu Leroy i sar. (2000). Pored toga, ovako regenerisani somatski embrioni pokazali su zavidan potencijal za sekundarnu somatsku embriogenezu omogućujući uspostavljanje procesa repetitivna somatske embriogeneze. Na ovaj način je obezbeđen visoko efikasan sistem za somatsku embriogenezu kod karfiola i kupusa u

kome je embriogeni potencijal održavan skoro godinu dana i koji omogućava dobijanje velikog broja somatskih embriona u kratkom vremenskom periodu. Izračunato je da, primenom protokola opisanog u ovom radu, oko 2000-3000 somatskih embriona može biti produkovano iz jednog zigotskog embriona nakon četiri ciklusa embriogeneze, koji traju otprilike četiri meseca.

Histološkom analizom potvrđena je direktna somatska embriogeneza i nepostojanje vaskularne veza između materinskog tkiva i razvijenih embriona, koji su imali jasnu bipolarnu organizaciju sa definisanim polom korena i kotiledona na suprotnoj strani. Interesantno je da se veliki broj somatskih embriona, posebno sekundarnih, pojavljivao iz materinskog tkiva korenovim polom, što je fenomen zapažen i kod nekih drugih povrtarskih *Brassica* (keleraba, brokoli, kelj) (neobjavljeni podaci).

Sem odsustva potrebe za regulatorima rastenja, direktna regeneracija embriona tj. odsustvo kalusne faze tokom procesa somatske embriogeneze, je još jedna od prednosti uspostavljenog postupka regeneracije jer, kao što je pomenuto, redukuje verovatnoću nastanka varijabilnosti među regenerisanim biljakama, što je i dokazano RAPD analizom regeneranata kupusa i karfiola koje smo dobili.

Priroda stimulusa za somatsku embriogenezu u odsustvu regulatora rastenja, uočena i kod drugih biljnih vrsta (Gharyal i Maheshwari, 1981; Smith i Krikorian, 1989; Dhanalakshmi i Laksmanan, 1992; Koh i Loh, 2000; Zegzouti i sar., 2001; Burbulis i Kupriene, 2005) je još uvek nepoznata. U nekim slučajevima za indukciju somatskih embriona bez korišćenja regulatora rastenja, bio je potreban specijalan tretman, kao što je povređivanje zigotskih embriona (Smith i Krikorian, 1990).

Pretrman niskom temperaturom (4°C) takođe se pominje kao bitan za povećanje embriogeneze iz zigotskih embriona *Arabidopsis*-a i cvetnih pupoljaka karfiola (Bassuner i sar., 2007; Gu i sar., 2014).

Orijentacija eksplantata se pokazala kao značajan faktor za podsticaj somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona karfiola i kupusa, s obzirom da su se somatski embrioni indukovali jedino iz eksplantata postavljenih horizontalno na hranljivu podlogu. Suprotno, ukoliko su bili postavljeni vertikalno, razvijali su se u pupoljke. Jedno od objašnjenja za ovo može biti nivo i distribucija endogenih regulatora

rastinja u eksplantatima, što je presudan faktor koji utiče na embriogenezu (Luo i Koop, 1997; Gaj, 2001; Ni i sar., 2001).

Stadijum razvića ili starost eksplantata je još jedan od faktora koji može bitno da utiče na indukciju somatske embriogeneze. Kod zigotskih embriona, potencijal za somatsku embriogenezu je obično bio veći kod onih koji se nalaze na ranijem stupnju razvića (Koh i Loh, 2000). Naši rezultati pokazuju je da kod kupusa i karfiola, najveći kapacitet za formiranje somatskih embriona (KFE) je bio povezan sa kotiledonarnim stupnjem razvića zigotskih embriona i opadao je kod kasnijih razvojnih stadijuma.

Značajan korak za primenu somatske embriogeneze u procesu oplemenjivanja biljaka jeste uspešnost konverzije somatskih embriona u biljke. Iako je spontana konverzija somatskih embriona u biljke na podlozi bez regulatora rastinja bila zadovoljavajuća kod karfiola (preko 50%), niska konverzija dobijena kod kupusa (20%) zahtevala je ispitivanje mogućnosti za njeno poboljšanje. U skladu sa literaturom da prisustvo citokinina može poboljšati sazrevanje i klijanje somatskih embriona nekih biljaka, na primer uljane repice (Loh i sar., 1983; Koh i Loh, 2000) i vlašca (Zdravković-Korać i sar., 2010), citokinini BA i KIN su bili uključeni u podlogu za sazrevanje somatskih embriona kupusa i karfiola. Efekat ovog tretmana je bio više nego dvostruko povećanje konverzije kod kupusa i za 10-35% kod karfiola, uz poboljšanje razvijenosti dobijenih biljaka.

## **5.2. GENETIČKA TRANSFORMACIJA KARFIOLA POMOĆU EHA101(pSHX004)**

Karfiol je podložan je negativnom dejstvu različitih faktora sredine, kako abiotičkim tako i biotičkim. Dejstvom čoveka i promenom klime dešavaju se kvantitativne, ali i kvalitativne promene ovih faktora pa povećanje otpornosti gajenih biljaka prema negativnim uticajima sredine predstavlja strategiju od posebnog izazova. Koristeći metode genetičkog inženjeringa, geni uključeni u prilagođavanje biljaka na uslove stresa ili njihovi transkripcioni aktivatori mogu biti ugrađeni u biljke u cilju povećanja tolerancije na negativne uticaje sredine (Zhang i sar., 2000; Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2007). Kao povrtarska kultura, karfiol je izložen intenzivnom zalivanju i đubrenju, koji za sobom povlače povećanje zaslanjenosti zemljišta i prisustvo korova, zajedno sa pojačanim stepenom napada različitih patogena. Na osnovu

malobrojnih i relativno starih podataka karfiol je umereno tolerantan na povećani salinitet zemljišta (Bernstein, 1959) i dosta izložen uticaju različitih vrsta korova (Qasem, 2009). Zbog toga je glavni cilj genetičke transformacije karfiola bio dobijanje biljaka sa povećanom tolerancijom prema povišenom salinitetu. U cilju povećanja tolerancije biljaka na povećani salinitet pomoću genetičkog inženjeringa najčešće se koriste geni koji kodiraju: proteine za transport jona, antioksidante, organske osmoprotektante, “heat-chock” proteine i dr., kao i transkripcione faktore za regulaciju ekspresije gena uključenih u neki od mehanizama tolerancije (Ashraf i sar., 2008; Ashraf i Akram, 2009). S obzirom da su mitogenom aktivirajući protein (MAP) kinaze identifikovane kao glavne komponente u uspostavljanju odbrambenog odgovora biljaka na različite vrste stresa (Pedley i Martin, 2005), povećana tolerancija na povišeni salinitet kod biljaka karfiola može biti postignuta konstitutivnom ekspresijom aktivne verzije MAPKKK gena duvana (*NPKI*). Ugradnjom ovog gena u genom biljaka kukuruza poboljšana je njihova tolerancija na niske temperature (Shou i sar, 2004a) i sušu (Shou i sar., 2004b; Assem i sar., 2009; Omer i sar., 2013; Muoma i Ombori, 2014).

Mada postoje podaci o transformaciji karfiola direktnim transferom DNK (Mukhopadhyay i sar., 1991; Eimert i Siegemund, 1992; Radchuk i sar., 2002; Nugent i sar., 2006), do sada je najčešće korišćena metoda transformacije je pomoću *A. tumefaciens* vektora (Metz i sar., 1995a; Balla i Smith., 1998; Kuvshinov i sar., 2001; Chakrabarty i sar., 2002; Yu i sar., 2010; Ray i sar, 2012; Metwali i sar., 2012). Kako je regeneracija biljaka karfiola u *in vitro* kulturi uspostavljena uglavnom putem organogeneze, ovaj sistem je korišćen i za transformaciju, pri čemu su kao eksplantati najčešće korišćeni hipokotili klijanaca (David i Tempé, 1988; Metz i sar., 1995a; Kuvshinov i sar., 2001; Chakrabarty i sar., 2002; Metwali i sar., 2012).

U našem radu u slučaju primene organogenog regenerativnog puta iz hipokotila klijanaca u transformaciji karfiola pomoću *A. tumefaciens* vektora EHA101(pSHX004), koji nosi *NPKI* gen za povećanje tolerancije prema stresu i *bar* gen za otpornost prema herbicidu, postignuta je efikasnost transformacije od 2,5%. Sličnu efikasnost transformacije karfiola pomoću *Agrobacterium*-a, koristeći iste eksplantate dobili su i Puddephat i sar. (2001). Viša frekvencija transformacije (8-30%) dobijena je iz hipokotila klijanaca dva varijeteta karfiola uz upotrebu srebrno nitrata kao anti-etilenskog agensa

kako bi se obezbedila bolja regeneracija transformisanih pupoljaka (De Block i sar., 1989). Nažalost, ova procedura nije uspešno reprodukovana u drugim laboratorijama (Metz i sar, 1995a; Bhalla i Smith, 1998). Balla i Singh (2008) su uspeli da postignu nešto veću efikasnost transformacije (9,5%) regeneracijom transformisanih biljaka iz kotiledona. Svi naši pokušaji transformacije kotiledona karfiola pomoću EHA101(pSHX004) završeni su neuspešno propadanjem svih eksplantata tokom ili ubrzo nakon perioda kokultivacije. Do sada ne postoje literaturni podaci koji govore o upotrebi somatskih embriona (SE) kao eksplantata za genetičku transformaciju karfiola. Sistem za cikličnu somatsku embriogenezu, koji je po prvi put uspostavljen u ovom radu, pokazao se se kao veoma pogodan za primenu u genetičkom inženjeringu karfiola. Postignuta efikasnost transformacije u ovom slučaju je iznosila 7,33%, što je skoro tri puta viša efikasnost nego već ranije pomenutom organogenezom iz hipokotila klijanaca (2,5%). Sem efikasnosti, prednost korišćenja SE u transformaciji leži i u činjenici da je verovatnoća dobijanja himeričnih biljaka svedena na minimum (Taylor i Fauquet, 2002; Deo i sar., 2009).

Niska efikasnost transformacije pokazala se kao glavni ograničavajući faktor u genetičkoj transformaciji *B. oleracea*. Istraživanja genetičkih faktora koji kontrolišu osetljivost *B. oleracea* prema *A. tumefaciens* tokom *in vitro* regeneracije pupoljaka potvrđuju da transformacioni potencijal *B. oleracea* genotipova zavisi i od regenerativne sposobnosti i od stepena osetljivosti prema *A. tumefaciens* (Sparrow i sar., 2004b, c). Od svih *B. oleracea* varijeteta karfiol, koji inače pokazuje visok kapacitet za regeneraciju *in vitro*, pokazao se kao najnepodesniji materijal za genetičku transformaciju (Puddephat i sar., 1996; Passelegue i Kerlan, 1996; Metwali, 2006). Razlog je hipersenzitivna reakcija tkiva karfiola pri infekciji *A. tumefaciens*-om (Yu i sar., 2010). Prilikom korišćenja hipokotila klijanaca kao eksplantata, nakon infekcije sa *Agrobacterium*-om EHA101(pSHX004), usled nekroze propadalo je 49% eksplantata, dok je prilikom korišćenja somatskih embriona taj procenat bio manji (oko 38%). Takođe je, po inokulaciji eksplantata, dolazilo i do smanjenja frekvence regeneracije, i do 50% kod hipokotila. Nekroza indukovana *Agrobacterium*-om je zabeležena i kod kukuruza (Hansen, 2000). Kao faktori koji mogu uticati na nekrozu navedeni su starost eksplantata, dužina pretretmana, gustina bakterijskih suspenzija i trajanje inokulacije (Kumria i sar., 2001; Kuta i Tripathi, 2005).



Protokol za transformaciju karfiola koji smo razvili je bio usklađivan sa uslovima za transfer gena i regeneraciju biljaka korišćenim od strane različitih autora (Bhalla i Smith, 1998; Radchuk i sar., 2002; Sretenović-Rajičić 2004, 2006; Bhalla i Singh, 2008; Yu i sar., 2010). Njihova istraživanja su pokazala da efikasna transformacija karfiola zahteva pretretman eksplantata, određene uslove kokultivacije i odloženo izlaganje selektivnom agensu nakon kokultivacije.

Pretreman eksplantata se pokazao kao značajan i pri transformaciji drugih *B. oleracea* varijeteta (Metz i sar., 1995a; Villemont i sar., 1997) čime se može povećati broj potencijalno kompetentnih ćelija (Sangwan i sar., 1992; Puddephat i sar., 1996).

Poznato je da povrede biljnog tkiva mogu pomoći u proizvodnji hemotaksičnih signala i olakšati prolaz bakterijama kroz ćelijski zid biljne ćelije (Gelvin, 2000). U skladu sa navedenim, blago povređivanje krajeva eksplantata tankom iglom pre potapanja u bakterijsku suspenziju je doprinelo uspešnosti transformacije karfiola sa EHA101(pSHX004).

Dodavanjem fenolnog jedinjenja – acetosiringona (AS) u kokultivacioni medijum tokom interakcije između bakterije i biljnog tkiva, moguće je poboljšati efikasnost transformacije (Henzi i sar., 2000). Kod kupusa infekcija *Agrobacterium*-om je najefikasnija kada se eksplantati kokultivišu na podlozi sa 100  $\mu$ M acetosiringona (Gelvin i Liu, 1994; Jin i sar., 2000). Acetosiringon indukuje *vir* gen (Shimoda i sar., 1990), povećavajući na taj način virulentnost agrobakterije pa i efikasnost transformacije.

Naši rezultati pokazuju da je dodavanje 100  $\mu$ M AS u podlogu tokom kokultivacije povećalo efikasnost transformacije iz hipokotola karfiola pomoću EHA101(pSHX004) od 0,83% na 2,5%, dok je za uspešnu transformaciju iz somatskih embriona prisustvo AS bilo neophodno.

Odloženo i postupno izlaganje višim koncentracijama selektivnom agensu (antibiotiku, herbicidu) znatno može da utiče na povećanje regeneracije transformisanih pupoljaka (Metz i sar., 1995a). Iako se odlaganjem selekcije, za bar 7 dana nakon inokulacije *Agrobacterium*-om, može podstaći regeneracija i netransformisanih pupoljaka, na kraju selektivnog ciklusa povećava se i broj transgenih događaja (Toriyama i sar., 1991) zbog čega se ova strategija sve češće koristi za unapređenje transformacionog odgovora kod raznih biljnih vrsta (Nikolić i sar., 2013). Ovako

odloženi postupak selekcije primenjen je i u selekciji pupoljaka karfiola transformisanih pomoću EHA101(pSHX004) na podlozi sa selektivnim agensom fosfotricinom (PPT). PPT je herbicidalna komponenta tripeptidnog antibiotika bialafosa (SF-1293) (L-phosphinothricyl-L-alanyl-L-alanine) koji u prirodi produkuje bakterije *Streptomyces hygroscopicus* i *S. viridochromogenes*. Herbicidalni efekat PPT-a je zasnovan na inhibiciji glutamin sintetaze (GS) koja je ključni enzim u asimilaciji amonijuma i metabolizmu azota kod biljaka. Inhibicija GS vodi brzom akumulaciji amonijum jona u ćeliji i ćelijskoj smrti (Dan Hess, 2000). *Bar* gen kodira fosfotricin acetil transferazu, koja acilacijom pretvara PPT u netoksičnu formu i tako omogućuje biljkama sa introdukovanim *bar* genom otpornost prema PPT-u (De Block i sar., 1987). Nije poznat prirodni mehanizam otpornosti biljaka prema PPT-u (Duke i sar., 2010). Zbog toga je metod selekcije na podlozi sa PPT-om u skladu sa konceptom pozitivne selekcije jer samo transformisane ćelije u koje je integrisan *bar* gen stiču otpornost prema PPT-u. Na taj način se kod selekcije zasnovane na primeni PPT-a smanjuje verovatnoća dobijanja lažno pozitivnih rezultata, za razliku od selekcije zasnovane na primeni različitih antibiotika, što je kasnije i potvrđeno PCR analizom. *Bar* gen je korišćen kao selektivni marker u eksperimentima transformacije različitih vrsta, obezbeđujući efikasnu selekciju npr. kod lucerke (Montague i sar., 2007) i odsustvo somaklonalnih varijacija kod *L. japonicus* (Lohar i sar., 2001). Takođe nisu uočene razlike u sadržaju nuklearne DNK i fenotipu između PPT selektovanih i kontrolnih biljaka *L. corniculatus* gajenih *in vitro* (Nikolić i sar., 2013).

### **5.3. EKSPRESIJA NPKI I *bar* TRANSGENA**

Još je devedesetih godina XX veka otkriveno da stabilna integracija T-DNK u biljni genom ne garantuje i ekspresiju transgena, koja 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 eukromatin, 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 hromatina koji dovode do kondenzacije i prevođenja eurohromatina u heterohromatin, a samim tim i do inaktivacije promotora.

Kvantitativni PCR (qPCR) je često korišćena metoda koja omogućava detekciju i kvantifikaciju nivoa ekspresije gena od interesa koji je ugrađen u biljni genom (Kim i sar, 2002; Panchuk i sar, 2002; Svensson i sar, 2002). RT-PCR analiza dokazala je da su se *NP1* i *bar* geni koji su ugrađeni u genom biljaka karfiola ekspimirali kod svih dobijenih transgenih linija. Daljom analizom ekspresije qPCR metodom pokazano je da su se dobijene linije međusobno razlikovale u nivou ekspresije. Različiti nivo ekspresije transgena kod različitih linija se može objasniti pozicionim efektom. Moguće je da, u zavisnosti od pozicije na DNK na kojoj se ubačeni gen insertovao kod različitih transgenih linija, promotor koji vodi njegovu ekspresiju radi različitim jačinom ili pokazuje različiti vremenski i tkivno-specifični obrazac transkripcione aktivnosti. Tako je za ekspresiju transgena pod vođstvom 35S promotora, kojim su vođena i oba transgena (*NP1* i *bar*) insertovana u različite linije karfiola, pokazano da može da varira od tkiva do tkiva i u funkciji vremena, najverovatnije kao posledica pozicionog efekta (van Leeuwen i sar., 2001).

Brojne studije su pokazale da postoji obrnuta korelacija između broja kopija transgena i njegove ekspresije, što podržava argument da multiple kopije transgena mogu dovesti do njegove ko-supresije i utišavanja (Vaucheret i sar., 1998; Dai i sar., 2001).

Shou i sar. (2004a) su pokazali da prekomerna ekspresija *NP1* gena može dovesti do smrti transformisanog pupoljka kukuruza u toku ranih procesa selekcije. Takođe su pokazali da je u slučajevima gde je ekspresija *NP1* na nivou koji transformisane linije mogu da prežive, teško definisati korelaciju između broja kopija transgena i nivoa ekspresije, pa je vrlo verovatno da još neki dodatni faktori, kao što su metilacija, DNK rearanžmani i struktura hromatina na mestu insercije transgena, mogu uticati na transgeno utišavanje (Matzke i Matzke, 1998; Vaucheret i sar., 1998; Muskens i sar., 2000).

Testirane transformisane linije karfiola dobijene u ovom radu su imale relativno nisku ekspresiju *NP1* transgena, kao i transformisane linije kukuruza dobijene transformacijom istim vektorom EHA101(pSHX004) (Shou i sar., 2004a; Muoma i Ombori, 2014). *NP1* i njegov ortolog kod *Arabidopsis* (*ANP1*), kao članovi MAPKK

familije, imaju značajnu ulogu u citokinezi (Nishihama i sar., 2001) i signalnoj transdukciji auksina (Kovtun i sar., 1998). Dok supresija *NPK1* rezultira abnormalnim ćelijskim deobama, prekomerna ekspresija *NPK1* kinaznog domena (konstitutivno aktivan NPK1) ima štetne efekte na procese embriogeneze i razvoja semena (Kovtun et al., 1998). Ovo može biti posledica kako smanjene auksinom indukovane ekspresije, usled uloge *NPK1* gena u negativnoj regulaciji transdukcije signala auksina, tako i zbog uloge NPK1 u indukciji apoptoze (Shou i sar., 2004a). Nizak novo ekspresije *NPK1* gena kod regenerisanih linija karfiola se stoga može objasniti time što se jedino one sa niskom ekspresijom uspešno razvijaju u biljke, dok se transformisane biljke sa visokim nivoom ekspresije ovog gena ne mogu normalno razvijati i zato propadaju jako rano još na početku selekcionog procesa (Shou i sar., 2004a). Ovo može da se potkrepi i činjenicom da je različita efikasnost transformacije kukuruza dobijena prilikom transformacije sa istim sojem agrobakterije (EHA101) koja nosi različite vektore, pSHX004 odnosno pTF102. Efikasnost transformacije je bila skoro za 50% niža u slučaju kada je korišćen pSHX004 vektor (2,24-6,54%) u odnosu na pTF102 (5,98-13,03%), uprkos činjenici da oba vektora imaju isti kostur (backbone) (Muoma i Ombori, 2014). Shou i sar. (2004c) su takođe nisku efikasnost transformacije (4-8%) kukuruza sa vektorom pSHX004 pripisali propadanju transformisanih linija sa visokom ekspresijom *NPK1* (Shou i sar., 2004c).

Testirane transformisane linije karfiola dobijene u ovom radu su se međusobno razlikovale po nivou ekspresije *NPK1* i *bar* gena, ali su kod svake pojedinačne transformisane linije karfiola nivoi ekspresije ova dva gena bili ujednačeni. Slično ovome, ranije studije su pokazale da transformisane linije dobijene transformacijom pomoću *A. tumefaciens* (pSHX004) imaju sličan broj kopija *NPK1* i *bar* gena, sa korelacionim koeficijentom od 0,9098 (Shou i sar., 2004c). Ovaj podatak ukazao je da se sekvenca vektora između leve i desne granične sekvence cela integrisala u genom kukuruza.

Vizuelno ocenjivanje transformisanih aklimatizovanih biljaka nije otkrilo prisustvo morfoloških nepravilnosti kao što su na primer patuljast rast, nepravilni listovi, abnormalne cvasti i sl., dok su merenja pokazala da nije bilo razlike ni u prinosu između netransformisanih i transformisanih  $T_0$  biljaka, prilikom gajenja u odsustvu stresa. Slično našim rezultatima, razlike u fenotipu i prinosu nisu detektovane ni između

transformisanih (NPK1) i netransformisanih linija kukuruza (Shou i sar., 2004b; Muoma i Ombori, 2014), što je takođe objašnjeno mogućom posledicom niskog nivoa ekspresije *NPK1* gena koji nije mogao da izazove pojavu abnormalnog fenotipa (Shou i sar., 2004b).

Imajući u vidu da NPK1 protein ima ključnu ulogu u odbrambenim mehanizmima regulacijom oksidativnih signalinih puteva u ćelijama, a samim tim i u kontroli nivoa ROS u biljnom tkivu u uslovima stresa, od transformisanih biljaka koje imaju povećanu ekspresiju *NPK1* gena može se očekivati da imaju i poboljšanu toleranciju prema abiotičkim stresovima.

#### **5.4. TOLERANCIJA TRANSFORMISANIH LINIJA KARFIOLA PREMA POVEĆANOJ KONCENTRACIJI NaCl *in vitro***

Razvijanje tolerancije biljaka prema povećanom salinitetu je ključno u poljoprivredi jer ovaj abiotički stres, samostalno ili u kombinaciji sa drugim stresovima, značajno ograničava prinos gajenih kultura širom sveta. U toku stresa soli dolazi do kaskade fizioloških, molekularnih i biohemijskih promena koje su pod kontrolom više gena (Flowers, 2004). U ovom kontekstu, značaj transgenih biljaka koje su stekle povećanu toleranciju prema povišenom salinitetu je i u tome što mogu doprineti razumevanju fizioloških, biohemijskih i molekularnih odgovora biljaka na stres.

Smanjeni rast biljaka u uslovima povišenog saliniteta je zabeležen kod različitih vrsta kao što su *Zea mays* (Ashraf i McNeilly, 1990), *Oryza sativa* (Lutts i sar., 1996), *Triticum durum* (Lutts i sar., 2004) i *Saccharum officinarum* (Errabii i sar., 2006). Inhibicija rasta u uslovima povećanog saliniteta je posledica dehidratacije ćelije i pada turgora (Rhodes i Samaras, 1994). Do smanjenja visine stabljike u uslovima stresa može doći usled negativnog efekta saliniteta na nivo fotosinteze, promene aktivnosti enzima (koje posledično utiču na sintezu proteina), kao i usled smanjenja sadržaja ugljenih hidrata i hormona rasta, što posledično vodi inhibiciji rasta (Mazher i sar., 2007).

U odsustvu stresa vrednosti svih merenih parametara tolerantnosti su kod transformisanih biljaka karfiola bile više u odnosu na netransformisane biljke. Izlaganje biljaka povećanim koncentracijama NaCl dovelo je do boljeg odgovora *NPK1* transformisanih biljaka karfiola koje su u uslovima stresa, u odnosu na netransformisane, pokazivale veću stopu rasta, veću koncentraciju fotosintetskih

pigmenata hlorofila i karotenoida, povećani osmotski regulacioni kapacitet i povišenu antioksidativnu aktivnost.

Veća stopa rasta kod transformisanih linija u poređenju sa netransformisanim se može objasniti sposobnošću njihovih ćelija da usvajaju vodu i mineralne materije i u uslovima visokog osmotskog pritisaka izazvanog povećanjem saliniteta (Cicek i Cakirlar, 2002). Povećanje mase može biti i posledica povećanja veličine vakuola, čime se obezbeđuje sakupljanje velike količine vode i rastvaranje akumuliranih jona, što posledično vodi povećanju mase (Munns, 2002a). Shou i sar (2004b) su analizirajući efekte *NPK1* genske ekspresije na agronomске karakteristike kukuruza u uslovima suše, zaključili da je procenat smanjenja težine klipa kod transgenih biljaka daleko manji nego kod netransformisanih. Ovaj rezultat je ukazivao da *NPK1* transgeni kukuruz ima veći potencijal za prinos nego netransformisane biljke u uslovima suše. Prinos transformisanih linija kukuruza pod stresom bio je i 25-30% veći u odnosu na kontrolne biljke (Shou i sar., 2004b; Muoma i Ombori, 2014).

Koncentracija hlorofila i fotosintetska efikasnost su od veoma velike važnosti za rastenje i produktivnost biljaka. U uslovima povećanog saliniteta dolazi do inhibicije procesa fotosinteze, a stepen inhibicije zavisi od efekta stresa na koncentraciju fotosintetskih pigmenata. Efikasnost fotosistema II je ključna za fotosintezu tokom stresa (Baker, 1991), a pokazano je da postoji direktna korelacija između aktivnosti fotosistema II i sadržaja hlorofila i karotenoida u listovima (Checker i sar., 2012). U našem eksperimentu odabrane transformisane linije karfiola su u uslovima povišene koncentracije NaCl zadržavale značajno više hlorofila i karotenoida u poređenju sa etransformisanim biljkama. Viši nivo hlorofila i karotenoida u transformisanim linijama, predstavlja prilagodavanje transformisanih biljaka, koje im omogućava vezivanje više ugljenika u uslovima stresa. Smatra se da se povećana tolerancija *NPK1* transgenog kukuruza prema suši može povezati sa potencijalnim zaštitnim mehanizmima za očuvanje fotosintetske mašinerije od dehidracije (Shou i sar., 2004b). Aktivirani odbrambeni mehanizmi, koji kod transgenih biljaka štite fotosintetski aparat od oštećenja, doprinose njihovoj fotosintetskoj aktivnosti i rastenju u uslovima stresa (Biswal i sar., 2011). Karotenoidi štite biljke od oksidativnog stresa kao neenzimatski antioksidanti (Parvaiz i Satyawati, 2008), neutrališu slobodne radikale

(Jithesh i sar., 2006) i naj taj način doprinose održavanju redoks stanja u ćeliji i olakšavaju funkcionisanje ćelija pod stresom.

Većina oštećenja izazvana abiotičkim stresom kod biljaka su povezana sa oksidativnim oštećenjima na ćelijskom nivou. Stres inhibira transport elektrona tokom fotosinteze i na taj način generiše ROS u biljkama (Ning i sar., 2010) čija je funkcija u ćelijama određena koncentracijom. U fiziološkim koncentracijama ROS deluju kao signalni molekuli koji pokreću ćelijske odgovore kroz ROS signalne puteve, dok prekomerna akumulacija ROS vodi ćelijskoj smrti (Asada i Takahashi, 1987; Niu i sar., 1995; Hammond-Kosack i Jones, 1996; Yeo, 1998; Asada, 1999; Glenn i sar., 1999; Dat i sar., 2000).

Antioksidativni enzimi i neenzimatske komponente antioksidativnog sistema biljaka održavaju ROS homeostazu tokom abiotičkog stresa. Kao deo ovog sistema, antioksidativni enzimi POD, CAT i SOD imaju ključnu ulogu u odbrambenim odgovorima. Postoje podaci o tome da su MAPK odgovorne za aktivaciju antioksidativnih enzima kod biljaka (Samuel, 2002; Zong i sar., 2009), što je pokazano i u ovom radu. U uslovima stresa kod *NPK1* transformisanih biljaka karfiola dolazilo je do značajnog povećavanja aktivnosti POD, CAT i do blagog porasta SOD aktivnosti u odnosu na netransformisane biljke.

Postoje kontradiktorni rezultati o uticaju povišenog saliniteta na aktivnost antioksidativnih enzima. Neki istraživači povezuju pojačanu ekspresiju antioksidativnih enzima sa tolerancijom prema povišenom salinitetu (Gueta-Dahan i sar., 1997; Tsugane i sar., 1999; Hernández i sar., 2003; López-Gómez i sar., 2007), dok drugi smatraju da je koordinisana regulacija aktivnosti antioksidativnih enzima, mehanizam uključen u toleranciju prema salinitetu (Gómez i sar., 1999; Hernández i sar., 2000, 2001; Mittova i sar., 2003). Wu i sar. (2012) su pokazali da tretman karfiola metil-jasmonatom, za koji je pokazano da ublažava efekte suše (Hassanein i sar., 2009), dovodi do značajnog porasta aktivnosti POD i CAT i manjeg porasta aktivnosti SOD kod klijanaca u uslovima stresa. Drazkiewicz i sar. (2004) su potvrdili da prilikom izlaganja klijanaca *A. thaliana* oksidativnom stresu indukovanom Cu, dolazi do smanjenja CAT i povećanja POD aktivnosti u listovima. Seckin i sar. (2009) su pokazali da u korenovima pšenice izloženoj povećanoj koncentraciji soli (NaCl) dolazi do povećane aktivnosti SOD i CAT, dok je aktivnost POD smanjena.

Manja aktivnost SOD se može objasniti činjenicom da sposobnost biljaka da prevaziđe oksidativni stres samo delimično zavisi od indukcije SOD aktivnosti, s obzirom na činjenicu da brojni faktori mogu da regulišu dostupnost supstrata za SOD: promene u putevima nastanka ROS, prostorna razdvojenost pojedinih oksidativnih procesa (naelektrisane ROS ne mogu da prolaze kroz ćelijske membrane). Sistem za uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji čine askorbat peroksidaza, glutation reduktaza i CAT, ima mnogo veći značaj u toleranciji pšenice na oksidativni stres izazvan sušom u poređenju sa ulogom koju u ovom procesu ima SOD (Sairam i sar., 1998).

Uz antioksidativni sistem, osmotsko prilagođavanje je značajan mehanizam prilagođavanja biljke na uslove stresa. U uslovima povišenog saliniteta dolazilo je do pojačane sinteze prolina i šećera kod *NPK1* transformisanih biljaka karfiola, što je jedan od mehanizama kojim biljke prilagođavaju/smanjuju svoj osmotski potencijal (Ashraf i Foolad, 2007). Novija istraživanja su ukazala na pozitivnu ulogu MAPK signala u stres indukovanoj akumulaciji prolina (Kong i sar., 2011a; Zhang i sar., 2011). Prolin ima veoma važnu ulogu u zaštiti biljke od osmotskog stresa (Tripathi i Gaur, 2004; Sumithra i sar., 2006; Ashraf i Foolad, 2007; Ahmed i sar., 2008; Parida i sar., 2008; Rai i sar., 2010). Uloga prolina u uslovima povišenog stresa je da doprinese osmotskom prilagođavanju, stabilizaciji membrana, zaštiti procesa fotosinteze i disanja, dok nakon prestanka stresa služi kao izvor ugljenika i azota (Silveira i sar., 2003; Kavi Kishore i sar., 2005). Moguće je da povećana koncentracija prolina doprinosi zaštiti antioksidativnih enzima ublažujući negativne efekte izazavane stresom kod transgenih biljka (Xu i sar., 2013).

Promenom uslova sredine brzo se menja i metabolizam ugljenih hidrata. OsCIPK03 i OsCIPK12 pirinča i MAPKK kukuruza (*ZmMKK4*), koje podstiču akumulaciju prolina u uslovima stresa takođe stimulišu i stresom indukovano povećanje sadržaja šećera (Xiang i sar., 2007; Kong i sar., 2011a). Kod *NPK1* transformisanog karfiola porast sadržaja šećera u uslovima stresa bio je u korelaciji sa nivoom ekspresije *NPK1* gena. Međutim, kod *NPK1* transformisanog kukuruza, nije pronađena korelacija između nivoa ekspresije *NPK1* i nivoa šećera, što ukazuje da još neki faktori mogu da utiču na porast koncentracije šećera u odgovoru na stres (Shou i sar., 2004b).

Različite strategije za razvoj tolerancije prema stresu kod biljaka podrazumevale su transformacije genima koji kodiraju transkripcione faktore (Song i sar., 2009),



enzime koji učestvuju u sintezi osmoprotektanata (Bhattacharya i sar., 2004; Niu i sar., 2014) ili antioksidativne enzime (Diaz-Vivancos i sar., 2013). MAPKKK su pogodnije za genetički inženjering jer funkcionišu na vrhu kaskade koja vodi aktivaciji više transkripcionih faktora i stres inducibilnih gena. Evolutivno su konzervirane i uklanjanjem regulatornih domena dobijaju se konstitutivno aktivne forme ovih kinaza (Banno i sar., 1993; Nishihama i sar., 1997; Ichimura i sar., 1998; Kovtun i sar., 1998; Yuasa i sar., 1998). Modulacijom ekspresije MAPKKK može se istovremeno uticati na aktivnost više target gena nego kroz pojačanu ekspresiju pojedinačne MAPK ili nekog transkripcionog faktora.

Odsustvo fenotipskih i razlika u prinosu između transformisanih (*NPKI*) i netransformisanih naših linija u odsustvu stresa, što je zapaženo i kod *NPKI* transformisanog kukuruza (Shou i sar., 2004b; Muoma i Ombori, 2014), predstavlja veliku prednost za dobijanje biljaka sa povećanom tolerancijom na uslove stresa u odnosu na gene za pojedine transkripcione faktora čija ekspresija interaguje sa normalnim rastom i razvojem (Jaglo-Ottosen i sar., 1998; Liu i sar., 1998).

#### **5.5. OTPORNOST TRANSFORMISANIH BILJAKA KARFIOLA PREMA TOTALNOM HERBICIDU FOSFINOTRICINU**

Prednost korišćenja *bar* gena kao selektivnog markera je dvostruka. Pored toga što povećava efikasnost inicijalne selekcije transformisanih pupoljaka, o čemu je ranije bilo reči, integracija i ekspresija *bar* gena biljkama obezbeđuje još jednu, za poljoprivredu značajnu karakteristiku, otpornost prema totalnim herbicidima koji kao aktivnu komponentu imaju PPT. Sintetički PPT je aktivna komponenta više neselektivnih herbicida pod različitim komercijalnim nazivom (BASTA<sup>®</sup>, BUSTER<sup>®</sup>, RELY<sup>®</sup>, FINALE<sup>®</sup>, CHALLENGE<sup>®</sup>, IGNITE<sup>®</sup> i LIBERTY<sup>®</sup>) koji kontrolišu širok spektar uskolisnih i širokolisnih korova u usevima. PPT se apsorbuje putem lista i stabljike biljke, a utvrđeno je da je za brojne gajene i divlje biljke fitotoksičan u niskim dozama (2,64-7,74% od preporučene doze) (Carpenter i Boutin, 2010). Simptomi žućenja i uvenuća se pojavljuju 3-7 dana nakon primene herbicida, u zavisnosti od spoljašnjih uslova i vrste biljke. Nije poznat prirodni mehanizam otpornosti biljaka prema PPT-u (Duke i sar., 2010), ali su primećeni različiti stepeni osetljivosti biljaka što se pripisuje uticaju nekoliko faktora (Peterson i Hurle, 2001; Sellers i sar., 2004;

Everman i sar., 2009). Upotreba PPT herbicida je ekološki bezbedna, jer ga mikrobi iz zemljišta lako metabolišu u prirodne komponente (Bartsch i Tebbe, 1989; Tebbe i Reber, 1991) bez izazivanja zagađenja zemljišta i akumulacije u biljkama. Ovo obezbeđuje efikasno uništavanje korova na obradivim površinama bez naknadnog štetnog uticaja na razvoj i prinos gajenih biljaka. Međutim ovaj herbicid se ne translocira kroz biljku, tako da uništava samo površinske delove biljaka koje su direktno pogođene prskanjem i ne obezbeđuje kontrolu preostalih korova. Potreba i (opravdanost) za eksperimentom transformacije *bar* genom i razvoja otpornosti prema totalnom herbicidu BASTA® kod biljaka karfiola se ogleda u mogućoj primeni u poljoprivrednoj proizvodnji. Transformisane biljke karfiola su pokazivale otpornost i prema koncentraciji PPT-a od 600 mg l<sup>-1</sup>, zadržavajući pritom normalan rast. Ovo je tri puta veća koncentracija od preporučene za većinu korovskih vrsta (200 mg l<sup>-1</sup>) što obezbeđuje efikasniju kontrolu korova u usevima karfiola tokom čitavog vegetacionog perioda ove kulture. Ovo je vrlo značajno imajući u vidu da nekontrolisani korov u usevima karfiola, tokom čitave vegetacione sezone, može dovesti do smanjenja prinosa i do 76% (Qasem, 2007).

## 6. ZAKLJUČCI

- Uspešno je indukovana *in vitro* organogeneza iz različitih segmenata klijanaca *Brassica oleracea* L. varijeteta: kupusa (beli i crveni), karfiola, kelja i brokolija, na MS podlogama sa različitim kombinacijama BA i KIN. Kod kupusa, kelja i brokolija najbolja regeneracije pupoljaka je postignuta iz hipokotila klijanaca na podlogama sa BA, dok su kod karfiola nabolji kapacitet za formiranje pupoljaka imali kotiledoni na podlozi sa KIN. Visok stepen multiplikacije regenerisanih pupoljaka je ostvaren na hranljivoj podlozi koja je sadržala BA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ), samostalno ili u kombinaciji sa IBA (0,1 ili 0,2  $\text{mg l}^{-1}$ ). Regenerisane i umnožene biljke su uspešno ožiljene i aklimatizovane u stakleniku. Povećanje sadržaja saharoze u podlozi za ožiljavanje pozitivno je uticalo na aklimatizaciju biljaka.
- Postignuta je direktna somatska embriogeneza iz nezrelih zigotskih embriona belog kupusa i karfiola i uspostavljena repetitivna somatska embriogeneza na B5 i MS podlogama bez regulatora rastenja (B5-0 ili MS-0 medijum). Embriogeni potencijal za somatsku embriogenezu je odžavan oko 10 meseci. Prisustvo citokinina ( $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  BA ili KIN) u hranljivoj podlozi uticao je na povećanje konverzije sekundarnih somatskih embriona u biljke, koje su pokazivale normalnu morfologiju i reproduktivne karakteristike kao i kontrolne biljke dobijene iz semena. Odsustvo varijabilnosti kod regeneranata je potvrđeno i RAPD analizom.
- Izvršena je uspešna transformacija karfiola pomoću *A. tumefaciens* vektora EHA101(pSHX004) koji sadrži gene koji kodiraju MAPKKK duvana (*NPKI*) i fosfotricin aciltransferazu (*bar*). Prisustvo oba transgena je detektovano u svim transformisanim linijama.
- Efikasnost transformacije je bila veća kada su kao eksplantati za transformaciju korišćeni somatski embrioni (7,33%) u odnosu na hipokotile (2,5%). Primena acetosiringona u toku kokultivacije omogućila je transformaciju kod SE kao eksplantata, a kod hipokotila značajno je povećavala efikasnost (za 3 puta).

- Transformisane *NPKI* biljke karfiola su uspešno ožiljene, aklimatizovane i dale  $T_1$  seme. Gajene u uslovima staklenika transformisane biljke nisu ispoljavale značajna odstupanja od normalnog fenotipa, niti razliku u prinosu u odnosu na netransformisane.
- RT-PCR analiza dokazala je da su se *NPKI* i *bar* geni ekspresirali kod svih dobijenih  $T_0$  i  $T_1$  transgenih linija karfiola. Kvantitativna analiza ekspresije (qPCR) je pokazala da su se ove linije međusobno razlikovale u nivou ekspresije. Najveći broj kopija *NPKI* i *bar* transkripata detektovan je kod izdanaka linije  $T_0$ -L2.
- Integracija i ekspresija *NPKI* gena omogućila je povećanje tolerancije transformisanih linija prema povišenoj koncentraciji NaCl u podlozi.
- Sve transformisane linije, na tretmanu sa 100 mM NaCl, su pokazivale veći stepen tolerancije (manji stepen hloroze i nekroze listova, veći rast i sposobnost zadržavanja fotosintetskih pigmenata hlorofila i karotenoida) u odnosu na netransformisane biljke, a većina je veći stepen tolerancije zadržavala i na tretmanu sa 200 mM NaCl. Linija  $T_0$ -L2 se isticala po povećanoj toleranciji prema stresu soli, što je u korelaciji sa izmerenim nivoom ekspresije *NPKI* gena.
- Povećana tolerancija *NPKI* transformisanih biljaka karfiola prema povišenim koncentracijama NaCl je, barem delimično, bila posledica povišene aktivnosti antioksidativnih enzima i osmotskog prilagođavanja.
- Učešće *NPKI* gena u različitim signalnim putevima ćelija, čini dobijene transformisane biljke pogodnim sistemom za proučavanje uticaja različitih faktora abiotičkog i biotičkog stresa, kao i za proučavanje mehanizama razvića biljaka.
- Ekspresija *bar* gena obezbedila je rezistenciju transformisanih biljaka prema totalnom herbicidu fosfotricinu (BASTA<sup>®</sup>). Transformisane linije su pokazale visoku otpornost prema herbicidu BASTA<sup>®</sup> koji je bio primenjen u 2-3 puta višim koncentracijama od onih koje su preporučene za tretiranje korova u polju.

## 7. LITERATURA

- About Qamar S, Luo H, Laluk K, Mickelbart VM, Mengiste T (2009) Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by *AIM1* transcription factor. *Plant J* 58: 1–13.
- Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growthrepressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20: 2117–2129.
- Acquaah G (2007) Principles of plant genetics and breeding. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121 – 126.
- Ahloowalia BS (1991) Somatic embryos in monocots. Their genesis and genetic stability. *Rev Cytol Biol Veget - Bot* 14: 223–235.
- Ahmad A, Zhong H, Wang WL, Sticklen MB (2002) Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 163-167.
- Ahmad P, Sharma S (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil Environ* 54: 89–99.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010a) Roles of Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30:161–175.
- Ahmad P, Jaleel CA, Sharma S (2010b) Antioxidative defence system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes and Biochemical activity in two genotypes of *Morus alba* L. subjected to NaCl stress. *Russ J Plant Physiol* 57: 509–517.
- Ahmad P, Nabi G, Ashraf M (2011) Cadmium-induced oxidative damage in mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.) plants can be alleviated by salicylic acid. *South Afr J Bot* 77: 36–44.
- Ahmed CB, Rouina BB, Boukhris M (2008) Changes in water relations, photosynthetic activity and proline accumulation in one-year-old olive trees (*Olea europaea* L. cv. *Chemlali*) in response to NaCl salinity. *Acta Physiol Plant* 30: 553–560.
- Allard RW (1999) Principles of plant breeding. John Wiley & Sons, New York, USA.

- Anderson P, Sharma SR, Sresty TVS, Devi S, Bala S, Kumar PS, Saradhi PP, Frutos R, Altosaar I, Kumar PA (2005) Transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) resistant to Diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Ind J Biotechnol* 4: 72-77.
- Anderson WC, Carsten JB (1977) Tissue culture propagation of broccoli, *Brassica oleracea* (italic group), for use in F1 hybrid seed production. *J Am Soc Hortic Sci* 102: 69-73.
- Andreasson E, Ellis B (2010) Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends Plant Sci* 15: 106–113.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev Plant Biol* 55: 373–399.
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ (Eds.) *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 227–287.
- Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396.
- Ashraf M, McNeilly T (1990) Improvement of salt tolerance in maize by selection and breeding. *Plant Breed* 104: 101–107.
- Ashraf M (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 17-42.
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59: 206–216.
- Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR (2008) Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv Agron* 97: 45-110.
- Ashraf M, Akram NA (2009) Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnol Adv* 27: 744-752.
- Aslam FN, MacDonald MV, Loudon P, Ingram DS (1990) Rapid-cycling *Brassica* species: inbreeding and selection of *B. campestris* for anther culture ability. *Ann Bot* 65: 557–566.

- Assem SK, Hussein EH, Hussein HA, Basry M (2009) Genetic transformation of the *Nicotiana* protein kinase (*NPKI*) gene confers osmotic tolerance in Egyptian maize. *Aust J Basic App Sci* 3: 828-835.
- Bai YY, Mao HZ, Cao XL, Tang T, Wu D, Chen DD, Li WG, Fu WJ (1993) Transgenic cabbage plants with insect tolerance. In: You CB, Chen Z, Ding Y (Eds.) *In Biotechnology in Agriculture Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp 156-159.
- Baillie AMR, Epp DJ, Hucheson D, Keller WA (1992) *In vitro* culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. *Plant Cell Rep* 11: 234–237.
- Bajaj YPS, Nietsch P (1975) *In vitro* propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L.var. *capitata*). *J Exp Bot* 95: 883-890.
- Bajaj YPS (1995) Cryopreservation of Somatic Embryos. *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry* 30, 221-229.
- Baker NR (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. *Physiol Plant* 81: 563-570.
- Banno H, Hirano K, Nakamura T, Irie K, Nomoto S, Matsumoto K, Machida Y (1993) PK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Mol Cell Biol* 13: 4745–4752.
- Barro F, Martin A (1999) Response of different genotypes of *Brassica carinata* to microspore culture. *Plant Breed* 118: 79- 81.
- Bartsch K, Tebbe CC (1989) Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by Soil Bacteria. *Appl Environ Microb* 55: 711–716.
- Basset MJ (1986) *Breeding Vegetable Crops*. Avi Publishing Company, Westport, Connecticut, USA.
- Bassuner BM, Lam R, Lukowitz W, Yeung EC (2007) Auxin and root initiation in somatic embryos of *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 26: 1-11.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207
- Beck M, Komis G, Müller J, Menzel D, Šamaj J (2010) *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated

- protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* 22: 755–771.
- Beck M, Komis G, Ziemann A, Menzel D, Šamaj J (2011) Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 189: 1069–1083.
- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304:1494–1497.
- Bernstein L (1959) Salt tolerance of vegetable crops in the West. *USDA Info Bull* 205: 5.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.
- Beyer WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 161: 559 – 566.
- Bhalla PL, Smith NA (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Mol Breed* 4: 531-541.
- Bhalla PL, de Weerd N (1999) *In vitro* propagation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis* for hybrid seed production. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56: 89-95.
- Bhalla PL, Singh M (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat Protoc* 2: 181-189.
- Bhattacharjee S (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci* 89: 1113-1121.
- Bhattacharya RC, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Chopra VL (2002) Development of insect-resistant transgenic cabbage plants expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Curr Sci* 83:146–150.
- Bhattacharya RC, Maheswari M, Dineshkumar V, Kirti PB, Bhat SR (2004) Transformation of *Brassica oleracea* var. *capitata* with bacterial *betA* gene enhances tolerance to salt stress. *Sci Hortic* 100:215–227.
- Biswal B, Joshi PN, Raval MK, Biswal UC (2011) Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signaling and adaptation. *Curr Sci* 100: 1-10.



- Bitá CE, Gerats T (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci* 4: 273.
- Bögre L, Calderini O, Binarova P, Mattauch M, Till S, Kiegerl S, Jonaka C, Pollascheka C, Barkerd P, Huskissond NS, Hirta H, Heberle-Borsa E (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11: 101–113.
- Boguszewska D, Zagdanska B (2012) ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions. In: Lushchak V (Ed.) *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 341-362.
- Bohnert HJ, Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations—making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1: 267–274.
- Bohnert HJ, Ayoubi P, Borchert C, Bressan RA, Burnap RL, Cushman JC, Cushman MA, Deyholos M, Fisher R, Galbraith DW, Hasegawa PM, Jenks M, Kawasaki S, Koiwa H, Koreeda S, Lee BH, Michalowski CB, Misawa E, Nomura M, Ozturk N, Postier B, Prade R, Song CP, Tanaka Y, Wang H, Zhu JK (2001) A genomic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol Bioch* 39: 295–311.
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inzé D (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 10: 1723–1732.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994) Superoxide dismutases in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 199-218.
- Bowley SR, Kielly GA, Anandarajah K, McKersie BD, Senaratna T (1993) Field evaluation following two cycles of backcross transfer of somatic embryogenesis of commercial alfalfa germplasm. *Can J Plant Sci* 73: 131-137.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principal of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72: 24 – 54.

- Brouers M, Michel-Wolwertz M-R (1983) Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). *Photosynth Res* 4: 265-270.
- Brown DCW, Finstad KI, Watson EM (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: *In vitro Embryogenesis in plants*. (T. A. Thorpe-Ed.). Amsterdam, Kluwer Academic Publishers. PP. 345-415.
- Brugnoli E, Bjorkman O (1992) Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta* 187: 335–347.
- Burbulis N, Kupriene R (2005) Induction of somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of spring *Brassica napus*. *Acta Univers Latviensis* 691: 137-143.
- Burbulis N, Kupriene R, Liakas V (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryos of *Brassica napus*. *Acta Univ Latviensis* 723: 27-35.
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58: 2181–2191.
- Cai R-Q, Sun D-L, Zhao Q-C (2000) Preliminary Report of Bt Infected in Cauliflower by *Agrobacterium Tumefaciens*. *Tianjin Agric Sci* 6: 9-12.
- Calderini O, Bögre L, Vicente O, Binarova P, Heberle-Bors E, Wilson C (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J Cell Sci* 111: 3091–3100.
- Cao J, Tang JD (1999) Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry 1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry 1A or Cry 1C. *Mol Breed* 5: 131–141.
- Cao J, Earle ED (2003) Transgenic expression in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) clones propagated *in vitro* via leaf explants. *Plant Cell Rep* 21: 789-796.
- Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 14: 703–711.

- Cardoza V, Stewart JRN (2004) *Brassica* biotechnology: Progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 542-551.
- Carpenter D, Boutin C (2010) Sublethal effects of the herbicide glufosinate ammonium on crops and wild plants: short-term effects compared to vegetative recovery and plant reproduction. *Ecotoxicology* 19: 1322–1336.
- Carrington JC, Freed DD (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol* 64: 1590–1597.
- Casanova E, Moysset L, Trillas MI (2008) Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biol Plant* 52: 1-8.
- Chaiwongsar S, Otegui MS, Jester PJ, Monson SS, Krysan PJ (2006) The protein kinase genes MAP3Ke1 and MAP3Ke2 are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 48: 193–205.
- Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD, Chopra VL (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *J Biosci* 27: 495-502.
- Chan LF, Chen LFO, Lu HY, Lin CH, Huang HC, Ting MY, Chang YM, Lin CY, Wu MT (2009) Growth, yield and shelf-life of isopentenyltransferase (ipt)-gene transformed broccoli. *Can J Plant Sci* 89: 701-711.
- Checker VG, Chhibbar AK, Khurana P (2012) Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. *Transgenic Res* 21: 939-957.
- Chen LFO, Hwang JY, Charng YY, Sun CW, Yang SF (2001) Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for postharvest yellowing retardation. *Mol Breed* 7: 243-257.
- Cheney G (1950) Anti-peptic ulcer dietary factor (Vitamin “U”) in the treatment of peptic ulcer. *J Am Diet Assoc* 26: 668-672.
- Cheng P-K, Lakshmanan P, Swarup S (2001) High-frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cycling *Brassica oleracea* *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 592-598.

- Chiang MS, Chong C, Landry BS, Crete R (1993) Cabbage, *Brassica oleracea* subsp. *capitata* L. In: Kalloo G, Bergh BO (Eds.) Genetic Improvement of Vegetable Crops. Pergamon Press, New York, USA, pp 113-155.
- Chikkala VRN, Nugent GD, Dix PJ, Stevenson TW (2009) Regeneration from leaf explants and protoplasts of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower). *Sci Hortic* 119: 330-334.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55: 225–236.
- Choudhary K, Singh M, Rathore MS, Shekhawat NS (2009) Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration in moth bean [*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal]: a recalcitrant grain legume. *Plant Biotechnol Rep* 3: 205-211.
- Chrispeels MJ, Sadava DE (2003) *Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Jones and Bartlett Learning, Burlington, UK.
- Christey MC, Earle ED (1991) Regeneration of *Brassica oleracea* from peduncle explants. *HortScience* 26: 1069-1072.
- Christey MC, Sinclair BK (1992) Regeneration of transgenic kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), rape (*B. napus*) and turnip (*B. campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Sci* 87: 161–169.
- Christey MC, Sinclair BK, Braun RH, Wyke L (1997) Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 16: 587-593.
- Chuong PV, Deslauriers C, Kott L, Beversdorf WD (1988) Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Can J Bot* 66: 1653-1657.
- Chutipajit S, Cha-um S, Sompornpailin K (2011) High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. *indica*. *Aust J Crop Sci* 5: 1191–1198.
- Cicek N, Cakirlar H (2002) The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulg J Plant Physiol* 28: 66–74.
- Cogan N, Harvey E, Robinson H, Lynn J, Pink D, Newbury HJ, Puddephat I (2001) The effects of anther culture and plant genetic background on *Agrobacterium*

- rhizogenes*-mediated transformation of commercial cultivars and derived doubled-haploid *Brassica oleracea*. Plant Cell Rep 20:755–762.
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of *Arabidopsis*. PNAS 101: 15243–15248.
- Cristea TO (2013) The Influence of pH on Microspore Embryogenesis of White Cabbage (*Brassica oleracea* L.). Not Sci Biol 5: 485-489.
- Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian WZ, Chen SY, Beachy RN, Fau C (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. Mol Breed 7: 25-33.
- Dai Y, Wang H, Li B, Huang J, Liu X, Zhou Y, Mou Z, Li J (2006) Increased expression of MAP Kinase Kinase7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. Plant Cell 18: 308–320.
- Dan Hess F (2000) Light-dependent herbicides: an overview. Weed Science 48, 160-170.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci 57: 779–795.
- David C, Tempé J (1988) Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*) by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep 7: 88-91.
- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J 6: 2513-2518.
- De Block M, Tenning P, De Brouwer D (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol 91: 694-701.
- Deane CR, Fuller MP, Dix PJ (1997) Somatic embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Cruciferae Newsletter 19: 43-44.
- Debergh PC (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol Plant 59: 270-276.

- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grant B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 30: 135-140.
- Delpierre N, Boccon-Gibod J (1992) An extensive hairy root production precedes shoot regeneration in protoplast-derived calli of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Rep* 11: 351-354.
- Deo PC, Harding RM, Taylor M, Tyagi AP, Becker DK (2009) Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 99: 61-71.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1: 561–573.
- Desikin R, Mackerness SAH, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127: 159–172.
- Dhanalakshmi S, Lakshmanan KK (1992) *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Clitoria ternatea*. *J Exp Bot* 43: 213-219.
- Diaz-Vivancos P, Faize M, Barba-Espin G, Faize L, Petri C, Hernández JA, Burgos L (2013) Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums. *Plant Biotech J* 11: 976–985.
- Dickson MH, Wallace DH (1986) Cabbage breeding. In: Basset MJ (Ed.) *Breeding Vegetable Crops*. AVI Publishing Co Inc, USA, pp 395-432.
- Dimson EV (2001) Cauliflower production in Arizona, weeds. Web stranica <http://pestdata.ncsu.edu/cropprofiles/docs/azcauliflower.html>.
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z.(2004) Copper–induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17: 379 – 387.
- Duan P, Rao Y, Zeng D, Yang Y, Xu R, Zhang B, Dong G, Qian Q, Li Y (2014) SMALL GRAIN 1, which encodes a mitogenactivated protein kinase kinase 4, influences grain size in rice. *Plant J* 77: 547–557.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 26: 350.
- Duke SO, Cantrell CL, Meepagala KM, Wedge DE, Tabanca N, Schrader KK (2010) Natural toxins for use in pest management. *Toxins* 2: 1943–1962.

- Eimert K, Siegemund F (1992) Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) — an experimental survey. *Plant Mol Biol* 19:485-490.
- Elhiti M, Tahir M, Gulden RH, Khamiss K, Stasolla C (2010) Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J Exp Bot* 61: 4069-4085.
- Errabii T, Gandonou CB, Essalmain H, Abrini J, Idaomar M, Skalisenhaji N (2006) Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *Afr J Biotech* 5: 1488–1493.
- Evelin H, Kapoor R, Giri B (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Ann Bot* 104: 1263-1280.
- Everman WJ, Thomas WE, Burton JD, York AC, Wilcut JW (2009) Absorption, translocation, and metabolism of glufosinate in transgenic and nontransgenic cotton, palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*), and pitted morning glory (*Ipomoea lacunosa*). *Weed Sci* 57: 357–361.
- Fang HJ, Li DL, Wang GL, Li YH, Zhu Z, Li XH (1997) An insect resistance transgenic cabbage plant with cowpea trypsin inhibitor (*CpTI*) gene. *Acta Bot Sinica* 39: 940–945.
- FAOSTAT (2015) Food and Agricultural Organization of United Nations. Web stranica <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/home/E>.
- Farzinebrahimi R, Taha RM, Fadainasab M, Mokhtari S (2012) *In vitro* plant regeneration, antioxidant and antibacterial studies on broccoli, *Brassica oleracea* var. *italic*. *Pak J Bot* 44: 2117-2122.
- Feilner T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RG, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D, Cahill DJ, Lehrach H, Kreuzberger J, Kersten B (2005) High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics* 4: 1558–1568.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 28: 89-121.
- Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55: 307-319.

- Fowler S, Thomashow MF (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675–1690.
- Foyer C, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *PNAS* 80: 4803-4807.
- Fuller MP, Metwali EMR, Ead MH, Jellings AJ (2006) Evaluation of abiotic stress resistance in mutated populations of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 86: 239-248.
- Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for in vitro regeneration of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64: 39-46.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27: 143–153.
- Gasic K, Hernandez A, Korban SS (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 437a-437g.
- Gaspar T, Kevers C, Debergh P, Maene L, Paques M, Boxus P (1987) Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga JM, Durzan DJ (Eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 1, General Principles and Biotechnology*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp 152-166.
- Gelvin SB, Liu C-N (1994) Genetic engineering of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (Eds.) *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp 1-13.



- Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 223-256.
- Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T (2015) *In vitro* regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. *capitata*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:80–87.
- Gharyal PK, Maheshwari SC (1981) *In vitro* differentiation of somatic embryoids in a leguminous tree - *Albizia lebbeck* L. *Naturwissenschaften* 68: 379-380.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909 – 930.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 124: 1854–1865.
- Gilmour SJ, Fowler SG, Thomashow MF (2004) *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol Biol* 54: 767–781.
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit Rev Plant Sci* 18: 227-255.
- Gómez JM, Hernández JA, Jiménez A, del Río LA, Sevilla F (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Rad Res* 31: S11–S18.
- Gong W, Shen YP, Ma LG, Pan Y, Du YL, Wang DH, Yang JY, LD Hu, Liu XF, Dong CX, Ma L, Chen YH, Yang XY, Gao Y, Zhu D, Tan X, Mu JY, Zhang DB, Liu YL, Dinesh-Kumar SP, Li Y, Wang XP, Gu HY, Qu LJ, Bai SN, Lu YT, Li JY, Zhao JD, Zuo J, Huang H, Deng XW, Zhu YX (2004) Genomewide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol* 135: 773-782.
- Govindra S, Bhan VM, Tripathi SS (1983) Weed control in cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Indian J Weed Sci* 15: 1–6.
- Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190.

- Gu H, Zhao Z, Sheng X, Yu H, Wang J (2014) Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Euphytica* 195: 467–475.
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S (2014) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 10: e1004384.
- Gudesblat GE, Iusem ND, Morris PC (2007) *Arabidopsis* MPK3, a key signalling intermediate in stomatal function. *Plant Signal Behav* 2:271–272.
- Gueta-Dahan Y, Yaniv Z, Zilinskas BA, Ben-Hayyim G (1997) Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in *Citrus*. *Planta* 203: 460–469.
- Guo YD, Pulli S (1996) High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 46: 219-225.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791.
- Hancock J, Desikan R, Harrison J, Bright J, Hooley R, Neill S (2006) Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J Exp Bot* 57: 1711–1718.
- Hansen G, Wright MS (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci* 4: 226–231.
- Hansen G (2000) Evidence for *Agrobacterium*-induced poptosis in maize cells. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 649-657.
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21: 79–102.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M (2013) Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV (Eds.) *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer Science & Business Media LLC, New York, USA, pp 25-87.
- Hassanein RA, Hassanein AA, El-Din AB, Salama M, Hashem HA (2009) Role of jasmonic acid and abscisic acid treatments in alleviating the adverse effects of drought stress and regulating trypsin inhibitor production in soybean plant. *Aust J Basic Appl Sci* 3: 904–919.

- Henry RJ, Nato A, De Buyser J (1998) Genetic fidelity of plants regenerated from somatic embryos of cereals. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (Eds.) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp 65-80.
- Henzi MX, Christey M, McNeil DL, Downs C (1998) Transgenic broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) plants containing an antisense ACC oxidase gene. *Acta Hort* 464: 147–151.
- Henzi MX, Christey MC, McNeil DL, Davies KM (1999) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) with an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene. *Plant Sci* 143: 55–62.
- Henzi MX, Christey MC, McNeil DL (2000) Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*). *Plant Cell Rep* 19: 994–999.
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux PM, Sevilla F (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ* 23: 853–862.
- Hernández JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F (2001) Antioxidant systems and O<sub>2</sub>(-)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol* 127: 817–831.
- Hernández JA, Aguilar, AB, Portillo B López-Gomez E, Beneyto JM, Garcia-Legaz MF (2003) The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants. *Funct Plant Biol.*30: 1127–1137.
- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO J* 2: 987-995.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35: 205–218.
- Hillel D (2000) Salinity management for sustainable irrigation. The World Bank, Washington DC, USA.
- Hirt H (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS* 97: 2405–2407.

- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 300-372.
- Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton MD (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol* 168: 1291-1301.
- Hord CL, Sun YJ, Pillitteri LJ, Torii KU, Wang H, Zhang S, Ma H (2008) Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Mol Plant* 1: 645–658.
- Hosoki T, Kigo T, Shiraishi K (1991) Transformation and regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *J Jpn Soc Hortic Sci* 60: 71-75.
- Hsiao TC (1973) Plant Responses to Water Stress. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 519-570.  
<https://sites.google.com/site/selectivebreedingofplants/> Sajt pregledan u martu 2015.
- Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998) Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 532–543.
- Ivanova M, van Staden J (2008) Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92: 227-231.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104–106.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol* 11: 100-105.
- Javed B, Farhatullah, Shah SH, Ali I (2012) In vitro analysis of callus induction in interspecifically hybridized F<sub>4-5</sub> populations of *Brassica*. *Pak J Bot* 44: 787-790.
- Jimenez A, Gomez JM, Navarro E, Sevilla F (2002) Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiol Biochem* 40: 515 – 520.

- Jin H, Axtell MJ, Dahlbeck D, Ekwenna O, Zhang S, Staskawicz B, Baker B (2002) NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Dev Cell* 3: 291–297.
- Jin RG, Liu YB, Tabashnik BE, Borthakur D (2000) Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 231-237.
- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defense. *J Genet* 85: 237-254.
- Jonak C, Ligterink W, Hirt H (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 55: 204–231.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 624–640.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287–291.
- Kataeva NV, Alexandrova IG, Butenko RG, Dragavtceva EV (1991) Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27: 149-154.
- Kaur ND, Vyvadilova M, Klima M, Bechyne M (2006) A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. *Czech. J Genet Plant Breed* 3: 103-110.
- Kavar T, Maras M, Kidric M, Sustar-Vozlic J, Meglic V (2007) Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Mol Breed* 21: 159–172.
- Keck AS, Finley JW (2004) Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integ Cancer Ther* 3: 5-12.
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 77: 181-191.

- Khalafalla M, Hattori K (2000) Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. *Plant Growth Regul* 32: 59–63.
- Khehra GS, Mathias RJ (1992) The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. *J Exp Bot* 256: 1413-1418.
- Kielkowska A, Adamus A (2012) An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 48:265-273.
- Kik C, Zaal MACM (1993) Protoplast culture and regeneration from *Brassica oleracea* ‘rapid cycling’ and other varieties. *Plant Cell Tiss Org Cult* 35: 107–114.
- Kim MK, Jeon JH, Fujita M, Davin LB, Lewis NG (2002) The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. *Plant Mol Biol* 49: 199-214.
- Kim J-M, Woo D-H, Kim S-H, Lee S-Y, Park H-Y, Seok H-Y, Chung W, Moon Y-H (2012) Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Rep* 31: 217–224.
- Kim SH, Woo DH, Kim JM, Lee SY, Chung WS, Moon YH (2011) Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 150–154.
- King GJ (1995) Morphological development in *Brassica oleracea* is modulated by *in vivo* treatment with 5-azacytidine. *J Horticult Sci* 70: 333-342.
- Kirti PB, Bhat SR, Kumar VD, Prakash S, Chopra VL (2001) A simple protocol for regenerating mesophyll protoplasts of vegetable *Brassicaceae*. *J Plant Biochem Biot* 10: 49–51.
- Kishore PBK, Sangam S, Amrutha RN, Sri Laxmi, P, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake, and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* 88: 424–438.
- Klíma M, Vyvadilová M, Kučera V (2004) Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. *Horticult Sci (Prague)*, 31: 119–123.
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6: 262–267.

- Koh WL, Loh CS (2000) Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and in vitro flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Rep* 19: 1177-1183.
- Kohlenbach HW, Wenzel G, Hoffmann F (1982) Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. *Z Pflanzenphysiol* 105: 131–142.
- Kong X, Pan J, Zhang M, Xing X, Zhou Y, Liu Y, Li D (2011a) ZmMKK4, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ* 34: 1291–1303.
- Kong X, Sun L, Zhou Y, Zhang M, Liu Y, Pan J, Li D (2011b) ZmMKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 30: 2097–2104.
- Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, Colcombet J, Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Hirt H, Machida Y (2010) The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 3778–3790.
- Kovtun Y, Chiu W-L, Zeng W, Sheen J (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395: 716–720.
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* 97: 2940–2945.
- Kramer C, DiMaio J, Carswell GK, Shillito RD (1993) Selection of transformed protoplast-derived *Zea Mays* colonies with phosphinothricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red. *Planta* 190: 454-458.
- Kranz E (1988) Somatic embryogenesis in stationary phase suspension cultures derived from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss. Org Cult* 12: 141–146.
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63: 1593-1608.
- Krishnaveni S, Balasubramanian T, Sadasivam S (1984) Sugar distribution in sweet stalk sorghum. *Food Chem* 15: 229.
- Kružilin AS, Švedskaja ZM (1966) *Biologija dvuletnih rastenij*. Nauka, Moskva, Rusija.

- Kumria R, Waie B, Rajam MV (2001) Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67: 63-71.
- Kuo CG, Tsay JS (1977) Propagating chinese cabbage by axillary bud culture. *HortScience* 12: 456-457.
- Kuta DD, Tripathi L (2005) *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Afr J Biotechnol* 4: 752-757.
- Kuvshinov V, Koivu K, Kanerva A, Pehu E (2001) Transgenic crop plants expressing synthetic cry9Aa gene are protected against insect damage. *Plant Sci* 160: 341–353.
- Lall S, Nettleton D, DeCook R, Che P, Howell SH (2004) Quantitative trait loci associated with adventitious shoot formation in tissue culture and the program of shoot development in *Arabidopsis*. *Genetics* 167: 1883-1892.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F (2004) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15: 195–202.
- Lampard GR, Macalister CA, Bergmann DC (2008) *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322:1113–1116.
- Lampard GR, Lukowitz W, Ellis BE, Bergmann DC (2009) Novel and expanded roles for MAPK signaling in *Arabidopsis* stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *Plant Cell* 21:3506–3517.
- Lata C, Yadav A, Prasad M (2011) Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance. In: Shanker A (Ed.) *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 269-296.
- Lazaro A, Aguinagalde I (1998) Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (*Cruciferae*) and wild relatives ( $2n = 18$ ) using isozymes. *Ann Bot* 82: 821-828.
- Lazzeri PA, Dunwell JM (1986) *In vitro* regeneration from seedling organs of *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck cv Green Comet: I. Effects of plant growth regulators. *Ann Bot* 58: 689-697.



- Lee JS, Wang S, Sritubtim S, Chen JG, Ellis BE (2009) *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *Plant J* 57: 975–985.
- Leroy XJ, Leon K, Charles G, Branchard M (2000) Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. *Plant Cell Rep.* 19: 1102-1107.
- Leroy XJ, Leon K, Hily JM, Chaumeil P, Branchard M (2001) Detection of *in vitro* culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theor Appl Genet* 102: 885-891.
- Li S, Li W, Yang DL, Cao ZY (2003) Advance of research vitrification in plant test-tube plantlets. *J Gansu Agric Univ* 38: 1-16.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350-382.
- Lichter R (1989) Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breed* 103: 119–123.
- Lim HT, You YS, Park EJ, Song YN, Park HK (1998) High plant regeneration, genetic stability of regenerants, and genetic transformation of herbicide resistance gene (*bar*) in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Acta Hort* 459: 199-208.
- Lingling LV, Jianjun L, Ming S, Liyun L, Bihao C (2005) Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *Afr J Biotechnol* 4: 45-49.
- Liu CW, Lin CC, Yiu JC, Chen JJ, Tseng MJ (2008) Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (*cry1Ab*) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. *Theor Appl Genet* 117: 75–88.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature- responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406.

- Loh CS, Ingram DS, Hanke DE (1983) Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *New Phytol* 95: 349-358.
- Lohar DP, Schuller K, Buzas DM, Gresshoff PM, Stiller J (2001) Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance bar gene as a selectable marker. *J Exp Bot* 52: 1697–1702.
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González, J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García AA (2014) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65: 169–183.
- López-Gómez E, San Juan MA, Diaz-Vivancos P, Mataix Beneyto J, García-Legaz MF, Hernández JA (2007) Effect of rootstocks grafting and boron on the antioxidant systems and salinity tolerance of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Environ Exp Bot* 60: 151–158.
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J* 19: 6770–6777.
- Lorenz OA, Maynard DN (1988) Knott's handbook for vegetable growers. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Lu C, Han M-H, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *PNAS* 99: 15812–15817.
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116: 109–119.
- Luo Y, Koop HU (1997) Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis* ecotypes. *Planta* 202: 387-396.
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1996) Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *J Plant Physiol* 149: 186–195.
- Lutts S, Almansouri M, Kinet JM (2004) Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Sci* 167: 9–18.

- MacGillivray JH (1961) Vegetable Production. McGraw Hill Book Company Inc, London, UK.
- Machida Y, Nishihama R, Kitakura S (1997) Progress in studies of plant homologs of mitogen-activated protein (MAP) kinase and potential upstream components in kinase cascades. *Critic Rev Plant Sci* 16: 481–496.
- Machida Y, Nakashima M, Morikiyo K, Banno H, Ishikawa M, Soyano T, Nishihama R (1998) MAPKKK-related protein kinase NPK1: regulation of the M phase of plant cell cycle. *J Plant Res* 111: 243–246.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139–158.
- Mahn A, Matzk A, Sautter C, Schiemann J (1995) Transient gene expressions in shoot apical meristems of sugarbeet seedlings after particle bombardment. *J Exp Bot* 46: 1625-1628.
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158.
- Mason HS, DeWald D, Mullet JE (1993) Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promoter. *Plant Cell* 5: 241–251.
- Matzke M, Matzke A (1998) Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cell Mol Life Sci* 54: 94-103.
- Mazher AMA, El-Quesni EMF, Farahat MM (2007) Responses of ornamental and woody trees to salinity. *World J Agric Sci* 3: 386-395.
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell; suggestive of a role in intercellular communication. *PNAS* 107: 3900–3905.
- Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (Ed.) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp 155-203.
- Metwali EMR (2006) Improving abiotic stress resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) by mutagenesis and *Agrobacterium* mediated transformation. PhD thesis, University of Plymouth, UK.
- Metwali EMR, Fuller MP, Jellings AJ (2012) *Agrobacterium* Mediated Transformation of Anti-Stress Genes into Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). 2.

- Transformation and Confirmation of Stress Tolerance. Aust J Basic Appl Sci 6: 31-39.
- Metz TD, Dixit R, Earle ED (1995a) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var *capitata*). Plant Cell Rep 15: 287–292.
- Metz TD, Roush RT, Tang JD, Shelton AM, Earle ED (1995b) Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein — Implications for pest resistance management strategies. Mol Breed 1: 309–317.
- Meyer P, Heidmann I (1994) Epigenetic variations of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of hypermethylation in transgenic plants. Mol Gen Genet 243: 390- 399.
- Michalski WP (1996) Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. J Chromatogr B 684: 59 – 75.
- Mithen RF, Dekker M, Verkerk R, Rabot S, Johnson IT (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. J Sci Food Agr 80: 967–984.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2003) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. Plant Cell Environ 26: 845–856.
- Miura K, Tada Y (2014) Regulation of water; salinity and cold stress responses by salicylic acid. Front Plant Sci 5: 4.
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. Trends Biotechnol 15: 15-19.
- Moltrasio R, Robredo CG, Gomez MC, Leo AHD, Diaz DG, Rios RD, Franzone PM (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: Genetic control and introduction of favorable alleles into elite argentinean germplasm. Plant Cell Tiss Org Cult 77: 119-124.
- Moncousin C (1991) Rooting of microcuttings: general aspects. Acta Hort 289: 301-310.

- Montague A, Ziauddin A, Lee R, Ainley WM, Strommer J (2007) High-efficiency phosphinothricin-based selection for alfalfa transformation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91: 29–36.
- Mordhorst AP, Hartog MV, El Tamer MK, Laux T, de Vries SC (2002) Somatic embryogenesis from *Arabidopsis* shoot apical meristem mutants. *Planta* 214: 829–836.
- Morimoto RI, Santoro MG (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 16: 833–838.
- Moustafa K, Lefebvre-De Vos D, Leprince A-S, Savourée A, Laurière C (2008) Analysis of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase families: organ specificity and transcriptional regulation upon water stresses. *Sch Res Exch* 2008: p12.
- Moustafa K, AbuQamar S, Jarrar M, Al-Rajab AJ, Trémouillaux-Guiller J (2014) MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Rep* 33: 1217–1225.
- Mukhopadhyay A, Töpfer R, Pradhan AK, Sodhi YS, Steinbiß HH, Schell J, Pental D (1991) Efficient regeneration of *Brassica oleracea* hypocotyl protoplasts and high frequency genetic transformation by direct DNA uptake. *Plant Cell Rep* 10: 375–379.
- Müller J, Beck M, Mettbach U, Komis G, Hause G, Menzel D, Šamaj J (2010) *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J* 61: 234–248.
- Munns R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils. Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ* 16: 15-24.
- Munns R (2002a) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239-250.
- Munns R (2002b) Salinity, growth and phytohormones. In: Lauchli A, Luttge U (Eds.) *Salinity: environment – plants – molecules*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, pp 271-290.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–681.

- Munshi MK, Roy PK, Kabir MH, Ahmed G (2007) *In vitro* regeneration of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) through hypocotyls and cotyledon culture. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 17: 131-136.
- Muoma JVO, Ombori O (2014) *Agrobacterium*-mediated transformation of selected Kenyan maize (*Zea mays* L.) genotypes by introgression of *Nicotiana* protein kinase (*npk1*) to enhance drought tolerance. *J Plant Sci* 5: 863-883.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murata M, Orton TJ (1987) Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 11:1 11-123.
- Muskens MWM, Vissers APA, Mol JNM, Kooter JM (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* 43: 243-260.
- Nakashima M, Hirano K, Nakashima S, Banno H, Nishihama R, Machida Y (1998) The expression pattern of the gene for NPK1 protein kinase related to mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) in a tobacco plant: correlation with cell proliferation. *Plant Cell Physiol* 39: 690–700.
- Neumann KH (2000) Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology. Web stranica <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>.
- Newell M, Burke J (2000) *Biotechnology-Present Position and culture developments*. Publisher Teagasc, Dublin, Ireland.
- Ni DA, Wang LJ, Ding CH, Xu ZH (2001) Auxin distribution and transport during embryogenesis and seed germination of *Arabidopsis*. *Cell Res* 11: 273-278.
- Nikolić R, Zdravković-Korać S, Ninković S, Dragičević M, Miljuš-Đukić J, Banović B, Bohanec B, Savić J, Mitić N (2013) Fertile transgenic *Lotus corniculatus* resistant to the non-selective herbicide phosphinothricin. *Ann Appl Biol* 163: 475-493.
- Ning J, Li X, Hicks LM, Xiong L (2010) A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol* 152: 876–890.
- Nishihama R, Banno H, Kawahara E, Irie K, Machida Y (1997) Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is

- related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J* 12: 39–48.
- Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y (2001) The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev* 15: 352–363.
- Nishihama R, Soyano T, Ishikawa M, Araki S, Tanaka H, Asada T, Irie K, Ito M, Terada M, Banno H, Yamazaki Y, Machida Y (2002) Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109: 87–99.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* 147: 1251–1263.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S. (2006) *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* 48: 535–547.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742.
- Niu X, Xiong F, Liu J, Sui Y, Zeng Z, Lu B-R, Liu Y (2014) Co-expression of ApGSMT and ApDMT promotes biosynthesis of glycine betaine in rice (*Oryza sativa* L.) and enhances salt and cold tolerance. *Environ Exp Bot* 104: 16–25.
- Noctor G, Foyer C (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249–279.
- Nugent GD, Coyne S, Nguyen TT, Kavanagh TA, Dix PJ (2006) Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. *Plant Sci* 170: 135-142.
- Ochoa-Alejo N, Ramirez-Malagon R (2001) *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 701–729.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 316: 810-812.
- Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T (2007) High-level overexpression of the *Arabidopsis HsfA2* gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* 58: 3373–3383.

- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) *NAC* transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci* 10: 79–87.
- Omer RA, Matheka JM, Ali AM, Machuka J (2013) Transformation of tropical maize with the *NPK1* gene for drought tolerance. *Int J Genet Eng* 3: 7-14.
- Ono Y, Takahata Y, Kaizuma N (1994) Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.) *Plant Cell Rep* 14: 13–17.
- Opabode JT (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol Mol Biol Rev* 1: 12–20.
- Ovesná J, Ptáček L, Opatrny Z (1993) Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. *Biol Plant* 35: 107–112.
- Panchuk II, Volkov RA, Schoffl F (2002) Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 838-853.
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. *Ecotox Environ Safe* 60: 324–349.
- Parida AK, Dagaonkar VS, Phalak MS, Aurangabadkar LP (2008) Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiol Plant* 30: 619–627.
- Parvaiz A, Satyawati S (2008) Salt stress and phyto-biochemical response of plants – a review. *Plant Soil Environ* 54: 89-99.
- Passelegue E, Kerlan C (1996) Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by transfer of cauliflower mosaic virus gene through cocultivation with virulent and avirulent strains of *Agrobacterium*. *Plant Sci* 113: 79-89.
- Pastori GM, Foyer CH (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “Redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol* 129:460–468.
- Pedley KF, Martin GB (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 8: 541–547.
- Peterson J, Hurlle K (2001) Influence of climatic conditions and plant physiology on glufosinate-ammonium efficacy. *Weed Res* 41: 31–39.



- Phippen C, Ockendon DJ (1990) Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Theor Appl Genet 79: 33-38.
- Pitman MG, Lauchli A (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Lauchli A, Luttge U (Eds.) Salinity: environment – plants – molecules. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherland, pp 3-20.
- Pius PK, Achar PN (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration of *Brassica oleracea* var. *capitata*. Plant Cell Rep 19: 888-892.
- Pontis HG (1989) Fructans and cold stress. J Plant Physiol 134: 148–150.
- Puddephat IJ, Riggs TJ, Fenning TM (1996) Transformation of *Brassica oleracea* L.: a critical review. Mol Breed 2: 185–210.
- Puddephat IJ, Robinson HT, Fenning TM, Barbara DJ, Morton A, Pink DAC (2001) Recovery of phenotypically normal transgenic plants of *Brassica oleracea* upon *Agrobacterium rhizogenes*-mediated co-transformation and selection of transformed hairy roots by GUS assay. Mol Breed 7: 229-242.
- Qamar Z, Nasir IA, Jahangir GZ, Husnain T (2014) *In-vitro* production of cabbage and cauliflower. Adv Life Sci 1: 112-118.
- Qasem JR (2007) Weed control in Cauliflower (*Brassica oleracea* var *Botrytis* L.) with herbicides. Crop Prot 26: 1013–1020.
- Qasem JR (2009) Weed competition in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) in the Jordan Valley. Sci Hortic 121: 255-259.
- Qin Y, Gao LH, Pulli S, Guo Y-D (2006) Shoot differentiation, regeneration of cauliflower and analysis of somaclonal variation by RAPD. Hereditas 143: 91-98.
- Qin Y, Li HL, Guo YD (2007) High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. Sci Hortic 111: 203-208.
- Radchuk VV, Ryschka U, Schumann G, Klocke E (2002) Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts. Physiol Plantarum 114: 429–438.
- Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81: 93-107.

- Rafat A, Aziz MA, Rashid AA, Abdullah SNA, Kamaladini H, Sirchi MHT, Javadi MB (2010) Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and shoot regeneration after co-cultivation of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. *capitata*) cv. KY Cross with *AtHSP101* gene. *Sci Hortic* 124: 1-8.
- Rai MK, Jaiswal VS, Jaiswal U (2010) Regeneration of plantlets of guava (*Psidium guajava* L.) from somatic embryos developed under salt-stress condition. *Acta Physiol Plant* 32: 1055–1062.
- Ravanfar SA, Aziz MA, Kadir MA, Rashid AA, Sirchi MHT (2009) Plant regeneration of *Brassica oleracea* subsp. *italica* (broccoli) cv Green Marvel as affected by plant growth regulators. *Afr J Biotechnol* 11: 2523–2528.
- Ravanfar SA, Aziz MA, Kadir MA, Rashid AA, Haddadi F (2011) *In vitro* adventitious shoot regeneration and acclimatisation of *Brassica oleracea* subsp. *italica* cv. Green Marvel. *Afr J Biotechnol* 10: 5614-5619.
- Ravanfar SA, Aziz MA, Rashid AA, Salim S (2014) *In vitro* adventitious shoot regeneration from cotyledon explant of *Brassica oleracea* subsp. *italica* and *Brassica oleracea* subsp. *capitata* using TDZ and NAA. *Pak J Bot* 46: 329-335.
- Ray AK, Choudhary AK, Jha S, Mishra I (2012) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Biotechnol Bioinf Bioeng* 2: 580-583.
- Reichheld J-P, Vernoux T, Lardon F, Montagu MV, Inze D (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J* 17: 647–656.
- Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57: 1017–1023.
- Reinert J (1958) Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71: 15.
- Rhodes D, Handa S, Bressan RA (1986) Metabolic changes associated with adaptation of plant-cells to water-stress. *Plant Physiol* 82: 890–903.
- Rhodes D, Samaras Y (1994) Genetic control of osmoregulation in plant. In: Strange K (Ed.) *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, CRC Press, Boca Raton, USA pp 347–361.

- Rihan HZ, Al-Issawi M, Burchett S, Fuller MP (2011) Encapsulation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) microshoots as artificial seeds and their conversion and growth in commercial substrates. *Plant Cell Tiss Org Cult* 107: 243-250.
- Rodriguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnol Aplic* 22: 1–10.
- Rozeff N (1995) Sugarcane and salinity – A review paper. *Sugarcane* 5: 8–19.
- Rubatzky VE, Yamaguchi M (1997) *World vegetables. Principles, production, and nutritive values.* Chapman & Hall, New York, USA.
- Saha P, Chatterjee P, Biswas AK (2010) NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian J Exp Biol* 48: 593–600.
- Sairam R, Deshmukh P, Saxena DC (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol Plantarum* 41: 387 – 394.
- Samuel MA (2002) Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14: 2059–2069.
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan NB (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium* mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 188: 439-456.
- Santos MO, Barros EVSA, Tinoco MLP, Brasileiro ACM, Aragão FJM (2002) Repetitive somatic embryogenesis in cacao and optimization of gene expression by particle bombardment. *J Plant Biotechnol* 4: 71-76.
- Sarikamis G, Balkaya A, Yanmaz R (2009) Glucosinolates within a collection of white head cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* sub. var. *alba*) from Turkey. *Afr J Biotechnol* 8: 5046-5052.
- Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Sonobe S, Igarashi H, Itoh TJ, Hidaka M, Machida Y (2006) Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev* 20: 1004–1014.
- Sasaki H (2002) Brassinolide promotes adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 111-116.

- Sato T, Nishio T, Hirai M (1989) Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis*). *Plant Cell Rep* 8: 486–488.
- Schöffl F, Prandl R, Reindl A (1998) Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol* 117: 1135–1141.
- Seckin B, Sekmen AH, Turkan I. (2009) An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in root of wheat under salt stress. *J Plant Growth Regul* 28: 12 – 20.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31: 279–292.
- Seki M, Kamei A, Satou M, Sakurai T, Fujita M, Oono Y, Yamaguch-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Transcriptome analysis in abiotic stress conditions in higher plants. *Top Curr Genet* 4: 271–295.
- Sellers BA, Smeda RJ, Li J (2004) Glutamine synthetase activity and ammonium accumulation is influenced by time of glufosinate application. *Pestic Biochem Phys* 78: 9–20.
- Sharma SD (2005) Cryopreservation of somatic embryos. *Ind J Biotech* 4: 47-55.
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SB (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hortic Rev* 2: 268-310.
- Sheen J (1993) Protein phosphatase activity, is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J* 12: 3497-3505.
- Sheng X, Zhao Z, Yu H, Wang J, Xiaohui Z, Gu H (2011) Protoplast isolation and plant regeneration of different doubled haploid lines of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 107: 513-520.
- Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M, Sakagami Y, Machida Y (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic action of phenolic signal molecules and monosaccharides. *PNAS* 87: 6684–6688.

- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress tolerance and response. *JExp Bot* 58: 221-227.
- Shou H, Bordallo P, Fan J-B, Yeakley JM, Bibikova M, Wang K (2004a) Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *PNAS*, 101: 3298-3303.
- Shou H, Bordallo P, Wang K (2004b) Expression of the *Nicotiana* Protein Kinase (*NPKI*) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J Exp Bot* 55: 1013-1019.
- Shou H, Frame BR, Whitham SA, Wang K (2004c) Assessment of Transgenic Maize Events Produced by Particle Bombardment or *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Mol Breed* 13: 201-208.
- Silveira JAG, Viegas RA, Rocha IMA, Moreira ACOM, Moreira RA, Oliveira JTA (2003) Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *J Plant Physiol* 160: 115–123.
- Singh J, Upadhyay AK, Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M (2006) Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata*). *Sci Hortic* 108: 233-237.
- Singh VV, Verma V, Pareek AK, Mathur M, Yadav R, Goyal P, Thakur A K, Singh YP, Koundal KR, Bansal KC, Mishra AK, Kumar A, Kumar S (2009) Optimization and development of regeneration and transformation protocol in Indian mustard using lectin gene from chickpea [*Cicer arietinum* (L.)]. *J Plant Breed Crop Sci* 1: 306-310.
- Siong PK, Taha RM, Rahiman FA (2011) Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls and leaf explants of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower). *Acta Biol Cracov* 53: 26-31.
- Siong PK, Mohajer S, Taha RM (2012) Production of artificial seeds derived from encapsulated *in vitro* micro shoots of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Biotechnol Lett* 17: 7549-7556.
- Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bögre L, Hussey PJ (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci* 119: 3227–3237.

- Smith DL, Krikorian AD (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Am J Bot* 76: 1832-1843.
- Smith DL, Krikorian AD (1990) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormonefree medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep* 9: 34-37.
- Song Y, Jing SJ, Yu DQ (2009) Overexpression of the stress-induced *OsWRKY08* improves osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Chinese Sci Bull* 54: 4671—4678.
- Song SY, Chen Y, Chen J, Dai XY, Zhang WH (2011) Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta* 234: 331–345.
- Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K, Ishikawa M, Machida Y (2003) NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev* 17: 1055–67.
- Sparrow PAC, Dale PJ, Irwin JA (2004a) The use of phenotypic markers to identify *Brassica oleracea* genotypes for routine high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 23:64-70.
- Sparrow PAC, Townsend T, Morgan CL, Arthur AE, Dale PJ, Irwin JA (2004b) Genetic analysis of *in vitro* shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108: 1249-1255.
- Sparrow PAC, Townsend T, Arthur AE, Dale PJ and Irwin JA (2004c) Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108: 664-650.
- Sparrow PAC, Dale PJ, Irwin JA (2006) *Brassica oleracea*. In: Wang K (Ed.) *Agrobacterium* Protocols, Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp 155-203.
- Spoel SH, Tad Y, Loake GJ (2010) Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. *New Phytol* 186: 333–339.
- Spoel SH, Loake GJ (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 358–364.

- Sretenović-Rajičić T, Stevanović D, Đorđević R, Veličković M, Sušić Z (2002) Maintenance of prospective cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) lines by micropropagation. *Acta Hort* 579: 193-195.
- Sretenović-Rajičić T, Ninković S, Vinterhalter B, Miljuš-Djukić J Vinterhalter D (2004) Introduction of resistance to herbicide Basta<sup>®</sup> in Savoy cabbage. *Biol Plantarum* 48: 431-436.
- Sretenović-Rajičić T, Ninković S, Miljuš-Djukić J, Vinterhalter B, Vinterhalter D (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Brassica oleracea* var. *sabauda* and *B. oleracea* var. *capitata*. *Biol Plantarum* 50: 525-530.
- Srivastava V, Reddy AS, Guha-Mukherjee S (1988) Transformation of *Brassica oleracea* mediated by oncogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 7: 504-507.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am J Bot* 45: 705–708.
- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill S, Zhang ZS (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59: 448-460.
- Sumithra K, Jutur PP, Carmel BD, Reddy AR (2006) Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regul.* 50: 11–22.
- Svensson AS, Johnsson FI, Moller IM, Ramsusson AG (2002) Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. *FEBS Lett* 517: 79-82.
- Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15: 89–97.
- Šamajová O, Plíhal O, Al-Yousif M, Hirt, H, Šamaj J (2013) Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnol Adv* 31: 118–128.
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc, New York, USA.
- Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, Sasabe M, Machida Y (2010) HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and

- activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51: 1766–1776.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics* 284: 173–183.
- Taylor NJ, Fauquet CM (2002) Microprojectile bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol* 21: 963-977.
- Tebbe CC, Reber HH (1991) Degradation of [<sup>14</sup>C] phosphinothricin (glufosinate) in soil under laboratory conditions: effects of concentration and soil amendments on <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production. *Biol Fert Soils* 11: 62–67.
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Roczi F, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 15: 141–152.
- Tepfer D (1989) Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology, and evolution. In: Kosuge T, Nester EW (Eds.) *Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives*. McGraw-Hill, New York, USA, pp 294-342.
- Thompson CK, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6: 2519-2523.
- Ting P, Tu Y, Lin C, Chang H, Chen L, Chan L (2014) Reproductive fitness of outcrossed hybrids between transgenic Broccoli (*Brassica oleracea*) carrying the ipt transgene and conventional varieties of kale, broccoli and cauliflower. *Pak J Bot* 46: 1437-1444.
- Toriyama K, Stein JC, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1991) Transformation of *B. oleracea* with an S-locus gene from *B. campestris* changes the self-incompatibility phenotype. *Theor Appl Genet* 81: 769-776.
- Tripathi BN, Gaur JP (2004) Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus sp.* *Planta* 219: 397–404.



- Tseng M-J, Yang M-T, Chu W-R, Liu C-W (2014) Plastid Transformation in Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by the Biolistic Process. In: Maliga P (Ed.) Chloroplast Biotechnology methods and protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, USA, pp 355-366.
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K (1999) A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11: 195–1206.
- Turan S, Tripathy BC (2012) Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation. *Protoplasma* 250: 209-222.
- Turgut K, Barghchi M, Scott R (1998) Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breed* 117: 503-504.
- USSL (2005) George E. Brown, Jr Salinity Laboratory. US Dep Agric Res Serv Riverside, CA, USA, USDA-ARS (<http://www.ussl.ars.usda.gov>).
- van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vremsen AWM, van der Plas LHW, van der Krol AR (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J Exp Bot* 52: 949-959.
- Vandemoortele JL, Billard JP, Boucaud J, Gaspar T (1998) Evidence for an interaction between basal medium and plant growth regulators during adventitious or axillary shoot formation of cauliflower. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 13-17.
- Vandemoortele JL (1999) A procedure to prevent hyperhydricity in cauliflower axillary shoots. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56: 85-88.
- Vandemoortele JL, Kevers C, Billard JP, Gaspar T (2001) Osmotic pretreatment promotes axillary shooting from cauliflower curd pieces by acting through internal cytokinin level modifications. *J Plant Physiol* 158: 221-225.
- Varshney RK, Bansal KC, Aggarwal PK, Datta SK, Craufurd PQ (2011) Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype? *Trends Plant Sci* 16:363-71.
- Vatsya B, Bhaskaran S (1982) Plant regeneration from cotyledonary protoplasts of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *Protoplasma* 113: 161-163.

- Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-659.
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753–759.
- Villemont E, Dubois F, Sangwan RS, Vasseur G, Bourgeois Y, Sangwan NB (1997) Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201: 160-172.
- von Koskull-Doring P, Scharf KD, Nover L (2007) The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci* 12: 452–457.
- Vranová E, Van Breusegem F, Dat J, Belles-Boix E, Inzé D (2002) The role of active oxygen species in plant signal transduction. In: Scheel D, Wasternack C (Eds.) *Plant Signal Transduction: Frontiers in Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 45–73.
- Walia A, Lee JS, Wasteneys G, Ellis B (2009) *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *Plant J* 59: 565–575.
- Walker L, Estelle M (1998) Molecular mechanisms of auxin action. *Curr Opin Plant Biol* 1: 434–439.
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 63–73.
- Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S (2008) Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *Plant Cell* 20: 602–613.
- Waterer D, Lee S, Scoles G (2000) Field evaluation of herbicide-resistant transgenic Broccoli. *Hortic Sci* 35: 930-932.
- Weaver SE (1984) Critical period of weed competition in three vegetable crops. *Weed Res.* 24: 317–325.

- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J* 16: 4806–4816.
- Willemsen V, Scheres B (2004) Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annu Rev Genet* 38: 587-614.
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57: 443-462.
- Wilson A, Jonathan R, Latham R, Steinbrecher AR (2006) Transformation-induced mutations in transgenic plants: Analysis and biosafety implications. *Biotechnol Genet Eng* 23: 209-234.
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322: 681–692.
- Wu H, Wu X, Li Z, Duan L, Zhang M (2012) Physiological Evaluation of Drought Stress Tolerance and Recovery in Cauliflower (*Brassica oleracea* L.) Seedlings Treated with Methyl Jasmonate and Coronatine. *J Plant Growth Regul* 31:113–123.
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L (2007) Characterization of stressresponsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol* 144: 1416–1428.
- Xin Z, Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* 23: 893–902.
- Xiong L, Ishitani M, Zhu JK (1999) Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 119: 205–212.
- Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M (2005) Transcription factors in rice: a genome wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Mol Biol* 59: 191-203.
- Xu ZH, Davey MR, Cocking, EC (1982) Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Sci Lett* 24: 117–121.
- Xu H, Sun X, Yang X, Shi Q, Wang X (2013) Physiological responses to nitrate stress of transgenic tobacco plants harbouring the cucumber mitogen-activated protein kinase gene. *Turk J Bot* 37: 130-138.

- Xu J, Zhang S (2015) Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci* 20: 56-64.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2007) Improving Plant Drought, Salt and Freezing Tolerance by Gene Transfer of a Single Stress-Inducible Transcription Factor, in *Novartis Foundation Symposium 236 - Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality* (eds J. A. Goode and D. Chadwick), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Chang YY, Cheng HL (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 49-58.
- Yang Q, Chauvin JE, Hervé Y (1992) A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 28: 289-296.
- Yeo A (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49: 913-929.
- Yi D-X, Cui L, Liu Y-M, Zhuang M, YZhang Y-Y, Fang Z-Y, Yang L-M (2011) Transformation of Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) with *Bt cry1Ba3* Gene for Control of Diamondback Moth. *Agric Sci China* 10: 1693–1700.
- Yu Y, Liu LS, Zhao YQ, Zhao B, Guo YD (2010) A highly efficient in vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *N Z J Crop Hort Sci* 38: 235-245.
- Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, Kyriakis JM (1998) Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem* 273: 22681–22692.
- Yussof AIM, Wafa SNA, Taha RM (2012) Plant regeneration and synthetic seeds production of *Brassica oleracea* var. *italica*. *Acta Hort* 958: 179-186.
- Zdravković-Korać S, Milojević J, Tubić Lj, Čalić-Dragosavac D, Mitić N, Vinterhalter B (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101: 237-244.

- Zegzouti R, Arnould MF, Favre JM (2001) Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. *Ann For Sci* 58: 681-690.
- Zeng Q, Chen JG, Ellis BE (2011) AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 67: 895–906.
- Zhang J, Klueva N, Wang Z, Wu R, David-Ho T, Ngulen H (2000) Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:108–114.
- Zhang FL, Takahata Y, Xu JB (1998) Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 17: 780-786.
- Zhang L, Xi D, Li S, Gao Z, Zhao S, Shi J, Wu C, Guo X (2011) A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol* 77: 17–31.
- Zhang S, Klessig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809–824.
- Zhang Y, Bhalla PL (2004) *In vitro* shoot regeneration from commercial cultivars of Australian canola (*Brassica napus* L.). *Crop Pasture Sci* 55: 753–756.
- Zhao JZ, Collins HL, Tang JD, Cao J, Earle ED, Roush RT, Herrero S, Escriche B, Ferré J, Shelton AM (2000) Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of *Cry1C*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3784-3789.
- Zhou J, Xia X-J, Zhou Y-H, Shi K, Chen Z, Yu J-Q (2014) RBOH1-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. *J Exp Bot* 65: 595–607.
- Zhou X, Cao G, Lin R, Sun Y, Li W (1994) A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. In: Javornik B, Bohanec B, Kreft I. Proceedings of impact of plant biotechnology on agriculture. Biotechnical Faculty, Ljubljana, pp 171-175.
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.

Zong XJ, Li DP, Gu LK, Li DQ, Liu LX, Hu XL (2009) Abscisic acid and hydrogen peroxide induce a novel maize group C MAP kinase gene, ZmMPK7, which is responsible for the removal of reactive oxygen species. *Planta* 229: 485–495.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Suzana Pavlović je rođena 20.04.1978. godine u Smederevskoj Palanci, gde je i završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 1997. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Diplomski rad pod nazivom „Polimorfizmi promotorske sekvence interleukina-10 kod bolesnika sa B ne-Hoćkinovim limfomom“ odbranila je 2006. godine.

Doktorke studije je upisala 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru studijskog programa Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

Zaposlena je u Institutu za povrtarstvo d.o.o. u Smederevskoj Palanci od 2008. Godine gde je u januaru 2011. godine izabrana u zvanje istraživač – saradnik. Angažovana je u okviru nacionalnog projekta TR-310059: Novi koncept oplemenjivanja sorti i hibrida povrća namenjenih održivim sistemima gajenja uz primenu biotehnoških metoda (2011-2015). U prethodnom radu bila je angažovana i na projektu TR–20072-A: Istraživanja povrtarskih vrsta u cilju poboljšanja biološke i zdravstvene vrednosti svežeg povrća i njegovih prerađevina povećanjem sadržaja biovalidnih antioksidanata (2008-2010).

Govori engleski jezik.

Objavila je dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21-prvi i treći autor) i pet rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M23-dva puta prvi autor, jednom treći, jednom četvrti i jednom šesti autor). Takođe je objavila jedan rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51), jedan rad u časopisu nacionalnog značaja (M52) i jedan rad u naučnom časopisu (M53).

Učesnik je 4 nacionalna i 4 međunarodna naučna skupa. Objavila je 6 rada i 4 saopštenja u zbornicima međunarodnih naučnih skupova (M30), i 1 rad i 5 saopštenja u zbornicima skupova nacionalnog značaja (M60).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Сузана М. Павловић

број уписа Б3301/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (*NPK1*) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*.

- 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, 01.06.2015.

C. Trabnović



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Сузана М. Павловић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ Б3301/2009 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Физиологија и молекуларна биологија биљака \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (*NPK1*)  
код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на  
развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*.

Ментор \_\_\_\_\_ др Невена Митић \_\_\_\_\_

Потписана \_\_\_\_\_ Сузана М. Павловић \_\_\_\_\_

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, \_\_\_\_\_ 01.06.2015. \_\_\_\_\_

C. Trabnovich

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Ефекат експресије гена за протеин-киназу 1 дувана (NPK1) код трансформисаних биљака карфиола (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) на развој толеранције према повишеним концентрацијама NaCl *in vitro*.

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 одлучио/ла.

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, \_\_\_\_\_ 01.06.2015. \_\_\_\_\_

C. Trabnovich

1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.