

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Милица Д. Богдановић

**Биосинтеза гвајанолида код цикорије  
(*Cichorium intybus* L.) - утицај  
трансформације на продукцију и  
испитивање активности гермакрен  
А-синтазе и -оксидазе коришћењем  
промоторских фузија и  
утишавања гена**

докторска дисертација

Београд, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica D. Bogdanović

**Guaianolide biosynthesis in chicory  
(*Cichorium intybus* L.) - influence of  
transformation on the production and  
study of germacrene A synthase and  
oxidase activity using promoter fusions  
and gene silencing**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**Ментори:**

др Ана Симоновић, виши научни сарадник

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Универзитет у Београду

др Ангелина Суботић, научни саветник

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Универзитет у Београду

**Чланови комисије:**

др Слађана Тодоровић, виши научни сарадник

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Универзитет у Београду

др Тијана Цветић Антић, доцент

Биолошки факултет

Универзитет у Београду

др Душица Јаношевић, ванредни професор

Биолошки факултет

Универзитет у Београду

**Датум одбране:**

Експериментални део докторске дисертације урађен је у оквиру пројеката основних истраживања Министарства просвете и науке Републике Србије (143031 и 173024) и међународног истраживачког ФП7 пројекта "*Terpmed*" (227448), у Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду и у Лабораторији за физиологију биљака Универзитета у *Wageningen*-у, Холандији.

Најдубљу захвалност дугујем својим менторкама, које су ме увек подржавале и веровале у мој успех. Др Ани Симоновић сам захвална за нову шансу и *clean slate* које ми је дала у тренутку када ми је било најтеже, за потпуно прихватање моје личности и уважавање мојих професионалних и личних квалитета, за увођење у диван свет молекуларне биологије, разложне савете и несебичну подршку целим путем, бескрајну веру у мене и оптимизам у свакој ситуацији. Др Слађани Тодоровић захваљујем што ми је обезбедила сјајан модел систем који смо заједно надградиле, за несебичну помоћ у свакој ситуацији - у лабу и ван њега, за подстицајне дискусије које су изнедриле бројне идеје и нове путеве, вечито стрпљење и подршку. Др Ангелини Суботић захваљујем за прве кораке у свету микроскопије, за зналачко вођење процедуре пријаве и одбране дисертације и залагање за што бољи квалитет написане тезе. Захваљујем се и др Тијани Цветић Антић и др Душици Јаношевић за подршку, помоћ и добру сарадњу.

Захвалност дугујем и колегама са Одељења за физиологију биљака, за савете, дискусије, позајмљене реагенсе и добру атмосферу. Посебно сам захвална др Милану Драгићевићу, за несебичну помоћ у експериментима, савете, интересантне стручне дискусије и продубљивање заједничких интересовања.

Захвална сам и колегама из Холандије: Katarina Cankar, Jules Beekwilder и Harro Bouwmeester су ми омогућили да научим нове и вредне методе у стимулативном окружењу и да упознам део њихове културе и радне етике.

Желим да изразим захвалност и Владану Милосављевићу из *Carl Zeiss*-а, који ми је омогућио да радим на флуоресцентној бинокуларној лупи *Zeiss SteREO Lumar. V12*.

Велику захвалност дугујем својим родитељима, који су ме одувек подржавали, бодрили и учили, створили подстицајну породицу пуну љубави и имали разумевања за мој животни пут. Велико хвала и мом Марку, за разумевање, толеранцију и љубав које ми пружа, и осећај да постоји нешто чаробно на овом свету.

**Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена**

**Резиме**

Цикорија (*Cichorium intybus* L.) је традиционално коришћена лековита биљка богата гвајанолидима - биоактивним сесквитерпенским лактонима. У овом истраживању цикорија је трансформисана уз помоћ *Agrobacterium rhizogenes*, ради евалуације продукције гвајанолида у трансгеним културама коренова и регенерисаним биљкама, и испитивања утицаја флоралне транзиције и експресије бактеријских онкогена на акумулацију ових једињења. *A. rhizogenes* сој *A4M70GUS* је успешно трансформисао цикорију, дајући *HR* културе из којих спонтано регенеришу изданци, а регенеранти цветају *in vitro*. Код регенерисаних трансгених биљака, гвајанолиди се акумулирају у току флоралне транзиције, што није случај у нетрансформисаним биљкама. Акумулација ових једињења била је посебно изражена у корену трансформаната, што је корелисало са повишеном експресијом *RolC* гена.

Гвајанолиди потичу од заједничког прекурсора - гермакрена А, који настаје дејством гермакрен А синтазе (*GAS*). У следећем кораку биосинтезе, гермакрен А оксидаза (*GAO*) у неколико корака преводи гермакрен А до гермакрен А киселине, од које настаје костунолид - прекурсор осталих сесквитерпенских лактона. *GAS* РНК цикорије је претходно изолована у краћој и дужој форми - *CiGASlo* (*GAS long*) и *CiGASsh* (*GAS short*). Из *BAC* библиотеке цикорије је изолован један промотор за *GAS long*, два промотора за *GAS short* и један за *GAO*, који су фузионисани са флуоресцентним репортером *GFP*. Функционалност и јачина промотора је праћена агроинфилтрацијом на зеленој салати и стабилном котрансформацијом цикорије *A4M70GUS* сојем са унетим конструктима. Као репортер за котрансформацију је коришћен други флуоресцентни маркер, *DsRED*. Услед инкомпатибилности коришћених флуоресцентних репортера *DsRED* и *GFP*, активност промотора у регенерисаним трансгеним биљкама је детектована *RT-PCR* и *qRT-PCR* техникама. Промотори су се одликовали различитом јачином и делимичном ткивном специфичношћу.

Промотор *GAS long* гена одликовао се мањом ткивном специфичношћу од *GAS short*, који је претежно био активан у корену цикорије.

Улога *GAS long* и *GAS short* гена у биосинтези гвајанолида је испитивана и утишавањем РНК интерференцом. Цикорија је стабилно трансформисана *amiRNA* конструктима дизајнираним да специфично утишавају један од ова два гена, а регенерисане трансгене биљке су тестиране на нивоу експресије гена и садржаја сесквитерпенских лактона. Утишавање гена је успешно обављено код већине добијених клонова, који су показивали смањену експресију ових гена и смањен садржај једињења низводно у путу биосинтезе - оксалата гвајанолида. Конструкти, међутим, нису били специфични за *CiGASlo* или *CiGASsh*, тако да су утишавали оба гена код већине трансгених биљака. Закључено је да су ова два гена вероватно заједно одговорна за биосинтезу гвајанолида, и да од њиховог комплексног односа експресије у различитим деловима биљке зависи и количина присутних гвајанолида и њихових деривата.

**Кључне речи:** *Cichorium intybus*, сесквитерпенски лактони, гвајанолиди, гермакрен А синтаза, гермакрен А оксидаза, *Agrobacterium rhizogenes*, промоторске фузије, РНК интерференца, DsRED, GFP

**Научна област:** Биологија

**Ужа научна област:** Физиологија биљака

**УДК број:** 581.1:582.991.4(043.3)

**Guaianolide biosynthesis in chicory (*Cichorium intybus* L.) - influence of transformation on the production and study of germacrene A synthase and oxidase activity using promoter fusions and gene silencing**

**Summary**

Chicory (*Cichorium intybus* L.) is traditionally used medicinal plant rich in guaianolides - bioactive sesquiterpene lactones. In this research, chicory was transformed with *Agrobacterium rhizogenes* in order to evaluate the production of guaianolides in transgenic root cultures and regenerated plants, and to explore the influence of floral transition and bacterial oncogene expression on guaianolide accumulation. *A. rhizogenes* strain *A4M70GUS* was successfully used for chicory transformation, producing hairy root cultures, which spontaneously regenerated shoots and plants that were flowering *in vitro*. In transgenic plants, guaianolides were accumulated during floral transition, which was not the case in untransformed plants. Accumulation of these compounds was especially significant in transformed plants' roots, which correlated with the expression of *RolC* gene.

Guaianolides originate from a common precursor - germacrene A, which is synthesized by germacrene A synthase (GAS). In subsequent steps, germacrene A is converted to germacrene A acid in a series of steps catalyzed by germacrene A oxidase (GAO), which is then converted into costunolide - precursor of other sesquiterpene lactones. Two *GAS* mRNAs have been previously isolated from chicory - *CiGASlo* (*GAS long*) and *CiGASsh* (*GAS short*). One promoter for *GAS long*, two for *GAS short* and one promoter for *GAO* have been isolated from chicory BAC library, and fused with a fluorescent reporter GFP. Strength and functionality of the promoters were characterized by lettuce agroinfiltration and by cotransformation of chicory by *A4M70GUS* strain containing the constructs. DsRED, another fluorescent reporter, was used as a marker for cotransformation. Due to incompatibility of DsRED and GFP, promoter activity was detected in regenerated transgenic plants by *RT-PCR* and *qRT-PCR*. The promoters were characterized by different strength and partial tissue specificity. *GAS long* promoter was less tissue specific than *GAS short*, which was active mainly in chicory roots.

*GAS long* and *GAS short* gene function in guaianolide biosynthesis was also studied by gene silencing through RNAi. Chicory was transformed with amiRNA constructs designed to specifically silence one of the two genes, and regenerated transgenic plants were tested for gene expression and sesquiterpene lactones content. Silencing was successful in most of the clones, which had reduced gene expression and reduced content of downstream compounds - guaianolide oxalates. However, the amiRNA constructs were not specific for *CiGASlo* or *CiGASsh*, so that both genes were silenced in most transgenic plants. It was concluded that both genes were probably involved in guaianolide biosynthesis, and that their complex pattern of expression in different parts of the plant determines the amount of guaianolides and their derivatives.

**Key words:** *Cichorium intybus*, sesquiterpene lactones, guaianolides, germacrene A synthase, germacrene A oxidase, *Agrobacterium rhizogenes*, promoter fusions, RNA interference, DsRED, GFP

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC number:** 581.1:582.991.4(043.3)



# Садржај

1. Увод.....	1
1.1 Цикорија - јестива, индустријска и лековита биљка.....	1
1.2 Секундарни метаболити - значајна биоактивна једињења.....	3
1.2.1 Сесквитерпенски лактони - подела и значај.....	3
1.2.2 Биосинтеза сесквитерпенских лактона.....	6
1.2.3 Латекс.....	11
1.2.4 Фенолна једињења.....	13
1.3 Трансформација биљака агробактеријама и биоинжењеринг.....	13
1.3.1 Утицај <i>Rol</i> гена на фенотип регенераната и секундарни метаболизам.....	15
1.3.2 Пролазна трансформација биљака агроинфилтрацијом.....	17
1.3.3 Преглед литературе о трансформацијама цикорије.....	20
1.3.4 <i>In vitro</i> култура и биоинжењеринг.....	21
1.4 Проучавање функције и експресије гена биљака.....	23
1.4.1 Праћење експресије гена <i>RT-PCR</i> и <i>qRT-PCR</i> техникама.....	24
1.4.2 Промоторске фузије и репортер гени.....	26
1.4.3 Утишавање гена РНК интерференцом.....	29
2. Циљ рада.....	33
3. Материјал и методе.....	34
3.1 Биљни материјал, успостављање <i>in vitro</i> културе и услови гајења биљака.....	34
3.2 Бактеријске културе и услови гајења бактерија.....	34
3.3 ДНК секвенце цикорије.....	37
3.4 Изолација плазмидне ДНК из бактерија - <i>mini prep</i> .....	37
3.5 Изолација геномске ДНК биљака <i>mini-prep</i> <i>СТАВ</i> методом.....	38

3.6	Изолација РНК биљака.....	39
3.6.1	Изолација РНК тризолом.....	40
3.6.2	Изолација РНК <i>CTAB</i> методом.....	41
3.7	Третман дезоксирибонуклеазом.....	41
3.8	Реверзна транскрипција.....	42
3.9	<i>PCR</i> амплификације.....	43
3.9.1	Умножавање делова промотора <i>Advantage PCR</i> -ом.....	43
3.9.2	Конструкција <i>amiRNA</i> фрагмената низом <i>Phusion PCR</i> реакција високе тачности.....	45
3.9.1	<i>PCR</i> из бактеријских колонија ( <i>colony PCR</i> ).....	48
3.9.2	<i>SuperTaq PCR</i> на плазмидној ДНК за потврду спојева вектора и инсерта.....	51
3.9.3	Геномски <i>PCR</i> и <i>RT-PCR</i> из ДНК биљака.....	52
3.10	Агарозна електрофореза нуклеинских киселина.....	53
3.11	Изолација ДНК продуката из гела.....	54
3.11.1	Изолација ДНК продуката из гела за примену у поступцима клонирања.....	54
3.11.2	Изолација <i>PCR</i> ампликона из гела за припрему стандарда за апсолутну квантификацију <i>qPCR</i> -ом.....	55
3.12	<i>Gateway</i> ® клонирање.....	55
3.12.1	Вектори коришћени за <i>Gateway</i> клонирање.....	57
3.12.2	<i>Gateway BP</i> реакција.....	60
3.12.3	<i>Gateway LR</i> реакција.....	60
3.13	Потврда интегритета секвенци директним секвенцирањем.....	61
3.14	Добијање компетентних ћелија бактерија.....	63
3.15	Трансформација бактерија.....	64
3.15.1	Трансформација бактерија топлотним шоком.....	64

3.15.2	Трансформација бактерија електропорацијом.....	64
3.16	Агроинфилтрација салате - пролазна трансформација .....	65
3.17	Трансформација цикорије .....	66
3.17.1	Трансформација биљака са <i>A. rhizogenes A4M70GUS</i> .....	66
3.17.2	Трансформација биљака са <i>A. rhizogenes MSU440</i> .....	66
3.17.3	Култура трансгених коренова и праћење прираста биомасе .....	67
3.17.4	Регенерација из културе коренова .....	67
3.18	<i>GUS</i> хистохемијска анализа.....	68
3.19	Флуоресцентна макро- и микроскопија.....	68
3.20	Квантитативни <i>PCR</i> .....	71
3.21	Екстракција и <i>LC-MS</i> анализа гвајанолида, њихових оксалата и хлорогене киселине.....	73
3.22	Статистичка и биоинформатичка обрада података и коришћени програми .....	75
3.23	Шема тока експеримената.....	77
4.	Резултати.....	78
4.1	Успостављање <i>in vitro</i> културе цикорије и протокола за генетичку трансформацију.....	78
4.1.1	Трансформација сојем <i>A4M70GUS</i> .....	79
4.1.2	Трансформација сојем <i>MSU440</i> .....	82
4.1.3	Растење и развиће трансформаната .....	83
4.1.4	Продукција гвајанолида у трансформисаним и нетрансформисаним биљкама у вегетативној и генеративној фази развића.....	85
4.1.5	Продукција хлорогене киселине .....	89
4.1.6	Експресија <i>Rol</i> гена у корену и листу трансформисаних биљака.....	89
4.2	Анализа промотора одабраних гена.....	91
4.2.1	Конструкција вектора за анализу промотора.....	91

4.2.2	Провера конструктора агроинфилтрацијом – флуоресцентна анализа и GUS бојена реакција .....	99
4.2.3	Трансформација цикорије <i>A. rhizogenes</i> сојевима који носе конструкторе за анализу промотора .....	104
4.2.4	Флуоресцентна анализа активности промотора клонова .....	112
4.2.5	<i>RT-PCR</i> и <i>qRT-PCR</i> анализа експресије <i>GFP</i> гена под контролом испитиваних промотора .....	125
4.3	Утишавање <i>GAS</i> гена .....	130
4.3.1	Конструкција вектора за утишавање гена .....	130
4.3.2	Провера конструктора агроинфилтрацијом .....	139
4.3.2.1	Ефекат пролазне трансформације агроинфилтрацијом на садржај гвајанолида и експресију <i>GAS</i> гена салате .....	140
4.3.3	Трансформација цикорије <i>A. rhizogenes</i> сојевима који носе конструкторе за утишавање гена .....	143
4.3.4	Потврда утишавања <i>GAS</i> гена мерењем нивоа експресије гена .....	145
4.3.5	Ефекат утишавања <i>GAS</i> гена на садржај секундарних метаболита .....	148
5.	Дискусија .....	154
5.1	Могућности пропације цикорије у <i>in vitro</i> условима .....	154
5.2	Подложност цикорије трансформацији сојевима <i>A. rhizogenes</i> и фенотипске одлике регенераната .....	155
5.3	Котрансформација цикорије и DsRED као репортер котрансформације .....	157
5.4	Утицај трансформације са <i>A. rhizogenes</i> и фенофазе на продукцију секундарних метаболита цикорије .....	161
5.4.1	Производња сесквитерпенских лактона .....	161
5.4.2	Производња хлорогене киселине .....	164

5.5	Проблеми детекције активности репортер гена - аутофлуоресценција и конфликт репортера.....	165
5.6	Анализа промотора <i>GAS</i> и <i>GAO</i> гена.....	174
5.7	Утишавање <i>GAS</i> гена - ефекти на експресију и биосинтезу гвајанолида .....	182
6.	Закључци.....	189
7.	Литература .....	191
8.	Прилози .....	218
8.1	Интензитет флуоресценције DsRED-а у корену клонова трансформисаних <i>DsRED+</i> , <i>GFP+</i> и конструктима са промоторима.....	218
8.2	<i>RT-PCR GFP</i> гена код регенераната клонова трансформисаних <i>GFP+</i> и конструктима са промоторима .....	238
8.3	Интензитет флуоресценције DsRED-а у корену клонова трансформисаних конструктима за утишавање гена .....	248
	Листа скраћеница са речником.....	256
	Биографија аутора.....	261
	Прилог 1 - Изјава о ауторству	
	Прилог 2 - Изјава о истоветности штапане и електронске верзије докторског рада	
	Прилог 3 - Изјава о коришћењу	

# 1. УВОД

---

## 1.1 Цикорија - јестива, индустријска и лековита биљка

Цикорија (*Cichorium intybus* L.) је вишегодишња зељаста биљка из породице *Asteraceae*, пореклом из Европе, а данас распрострањена космополитски (слика 1). У народу је позната још и као водопија, женетрга и цигура. Ово је изворно дивља врста која расте на ливадама, поред путева и на напуштеним местима. Карактеришу је светло плави, ређе бели или ружичасти цветови, висине је до један метар, са шупљом, делимично одрвенелом стабљиком, меснатим задебљалим кореном, крупним листовима у форми розете у основи стабла и ситнијим дуж цветне стабљике. Сви делови биљке садрже латекс - млечно белу до жућкасту лепљиву течност, која истиче из биљке приликом повреде. Бројни варијетети цикорије гајени су у различите сврхе: индустријска цикорија (варијетет *sativum*) се гаји ради корена (слика 1д), који се користи као замена за кафу и из кога се добија фруктозни полимер инулин. Варијетети *foliosum* и *silvestre* се користе као салатне врсте или вариво, у виду главице са добро развијеним листовима налик зеленој салати, зелене или црвенкасте боје (цикорија, *sugarloaf* и радич), или у виду етиолираних пупољака - чикона (*witloof* или белгијска ендивија, слика 1ђ). Варијетети блиски дивљој цикорији се употребљавају као сточна храна. У новије време, цикорија постаје значајна у индустрији прехранбених производа и сматра се функционалном храном - нутритивно богатом, са повољним дејством на здравствено стање људи. Због лакоће гајења и незахтевности по питању услова за раст, цикорија добија на значају, посебно у сиромашним и земљама у развоју (Wang и Cui, 2011).

Дивљи и гајени варијетети цикорије традиционално се користе за ублажавање разних здравствених тегоба. Широм ареала распрострањења, надземни део и корен цикорије су се користили за побољшање апетита и варења (Malarz и сар., 2002), чишћење од цревних паразита, лечење маларије, камена у жучи, жутице, увећане јетре, гастроентеритиса, снижавање крвног притиска, шећера у крви, лечење дијабетеса, болести бубрега, дијареје, реуматизма,

посекотина и модрица (*Street* и сар., 2013). Екстракт цикорије, посебно корена, има антибактеријско (*Petrovic* и сар., 2004; *Nandagopal* и *Kumari*, 2007), антиинфламаторно, хепатопротективно (*Zafar* и *Mujahid Ali*, 1998; *Bais* и *Ravishankar*, 2001), антимикубно, нематичидно (*Nishimura* и *Satoh*, 2006), хербицидно и алелопатско дејство (*Wang* и сар., 2010), а делује и на ћелије рака (*Conforti* и сар., 2008; *Csupor-Löffler* и сар., 2009).



Слика 1. Биљка цикорија у природи (а); фотограф *Jordi Badia*, цветови биљке (б); фотограф: *W. Arnold*, (в и г) - изглед розете биљке (<http://demeuredelarose.forum-actif.net>, <http://i57.servimg.com>), задебљали корен (д) (<http://suliekneti.lt>) и чикон (ђ) (<http://fr.wikipedia.org>).

## 1.2 Секундарни метаболити - значајна биоактивна једињења

Цикорија, као и бројне друге врсте породице *Asteraceae*, синтетише многе фармаколошки и индустријски значајне секундарне метаболите. До сада је из екстракта ове биљке изоловано преко 100 различитих једињења (*Street* и сар., 2013). Богата је инулином (до 40 % суве масе корена), који се користи као заслађивач и пребиотик (*Baert* и *Van Bockstaele*, 1992), затим ескулином, кумаринима, флавоноидима, фенолним једињењима, органским киселинама, витаминима и терпенима - посебно сесквитерпенским лактонима, присутним у мањим али значајним количинама (*Nandagopal* и *Kumari*, 2007; *Wang* и *Cui*, 2011), а садржи и бројна испарљива једињења, међу којима предњаче алкани и неки испарљиви терпени (*Street* и сар., 2013).

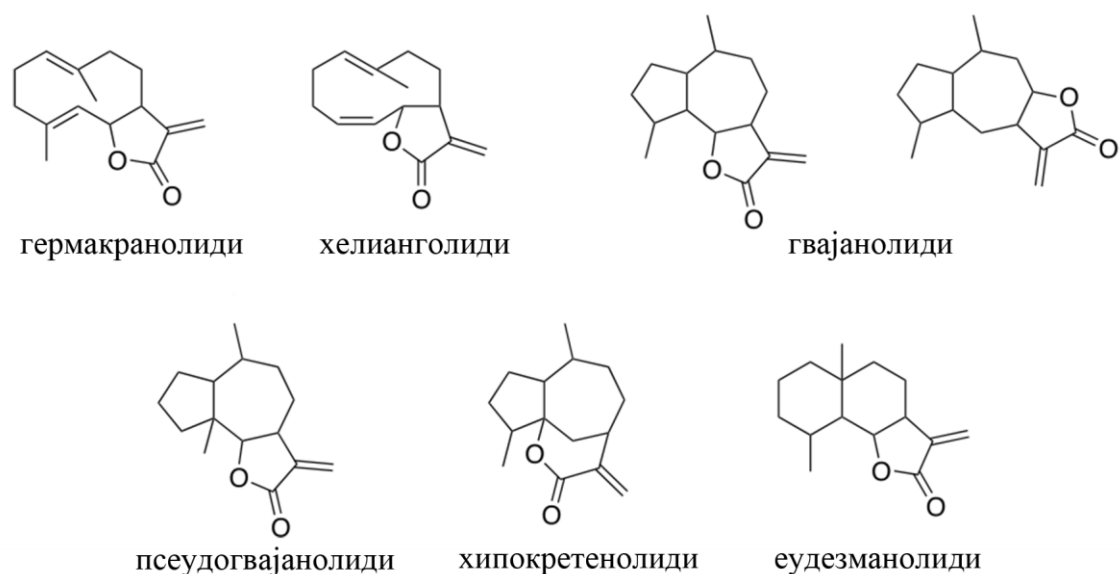
### 1.2.1 Сесквитерпенски лактони - подела и значај

Сесквитерпенски лактони (СЛ) су група једињења која припада сесквитерпеноидима, терпенима који су саграђени од три изопренске јединице ( $C_{15}H_{24}$ ). СЛ садрже и цикличну естарску групу која се најчешће састоји од 5 атома ( $\gamma$ -лактонски прстен) (*Drew* и сар., 2009). Ово је веома разноврсна група једињења, са преко 5000 представника изолованих из биљака (*Drew* и сар., 2009), у највећем броју из фамилија *Asteraceae* и *Apiaceae*. Мада постоји велика варијабилност њихове структуре, ова једињења имају основни план грађе који се базира на једном од неколико различитих угљеничних скелета. Према овом основном скелету, сесквитерпенски лактони се могу поделити у неколико главних класа: гермакранолиди, хелианголиди, гвајанолиди, псеудогвајанолиди, хипокретенолиди и еудезманолиди (слика 2).

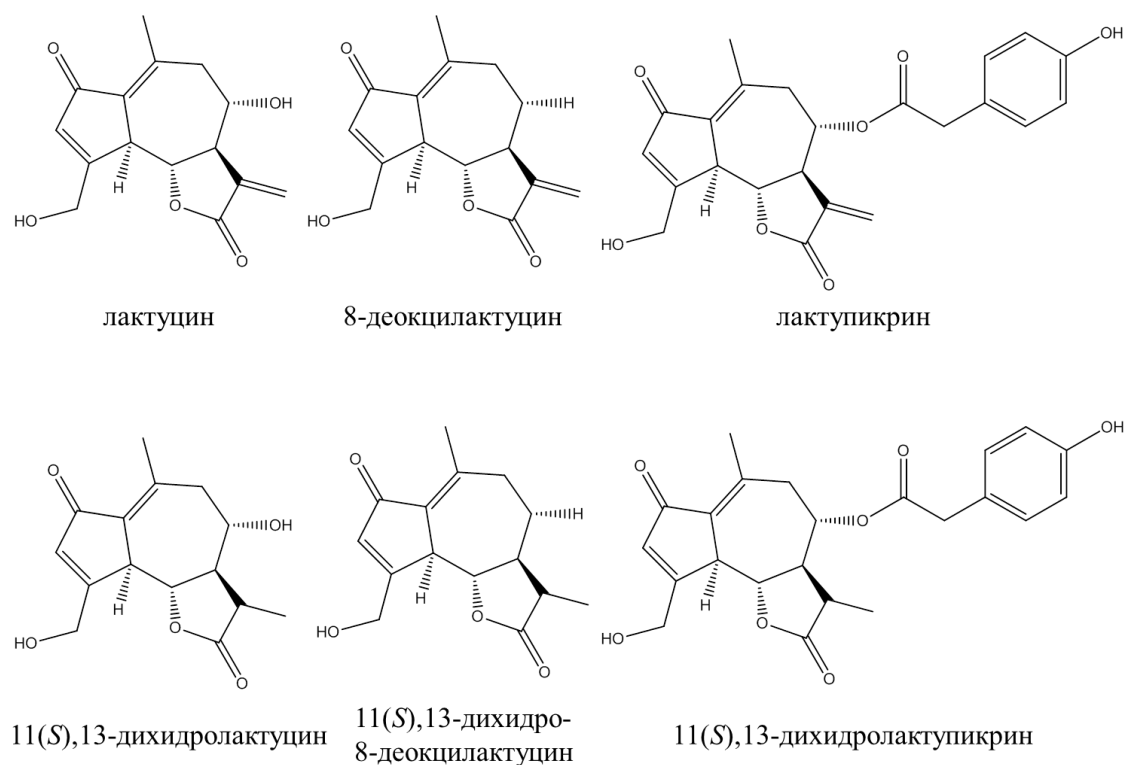
С обзиром на разноврсност, ова једињења су значајни хемотаксономски маркери. Гермакранолиди се сматрају највећом групом сесквитерпенских лактона, од које је почела диверзификација ових једињења. За разлику од других група породице *Asteraceae*, у племену *Cichorieae*, коме припадају цикорија, зелена салата и још око 100 родова, јављају се само еудезманолиди, гермакранолиди и гвајанолиди (*Christian*, 2008). Већина лековитих својстава која се приписују



цикорији, као и њен горак укус, сматра се да потичу од ових група сесквитерпенских лактона (*Rees и Harborne, 1985; Kisiel и Zielinska, 2001; de Kraker и сар., 2002*). Гвајанолиди су најразноврснија група сесквитерпеноида код цикорије (*Christian, 2008*), и њени листови, а нарочито коренови, веома су богати гвајанолидима лактуцинског типа (слика 3): лактуцином, његовим естром *p*-хидроксифенилацетатне киселине - лактупикрином (или лактукопикрином), 8-деоксилактуцином, и њиховим 11(*S*),13-дихидродериватима (*Van Beek и сар., 1990; Sessa и сар., 2000; Kisiel и Zielinska, 2001; Malarz и сар., 2002*). За гвајанолиде је до сада показано антихербиворно (*Rees и Harborne, 1985*), антифунгално (*Barrero и сар., 2000*), антипротозоално, антимальарично (*Bischoff и сар., 2004*) и цитотоксично дејство (*Fernandes и сар., 2008*). За сродну групу једињења, гермакранолиде, а посебно за костунолид, који је прекурсор гвајанолида, такође је показано антифунгално (*Barrero и сар., 2000*), антиинфламаторно и потентно антипролиферативно дејство против различитих линија ћелија рака (*Park и сар., 2001; Bocca и сар., 2004*). Осим што имају корисна дејства, сесквитерпенски лактони делују и као алергени и иританти (*Wenk, 2012*), посебно ако су присутни у великој количини. Присуство горких једињења у јестивим врстама салате и цикорије има и економски значај, јер потрошачи у зависности од тржишта и традиционалне употребе, преферирају мање или више горке варијетете (*Price и сар., 1990*).

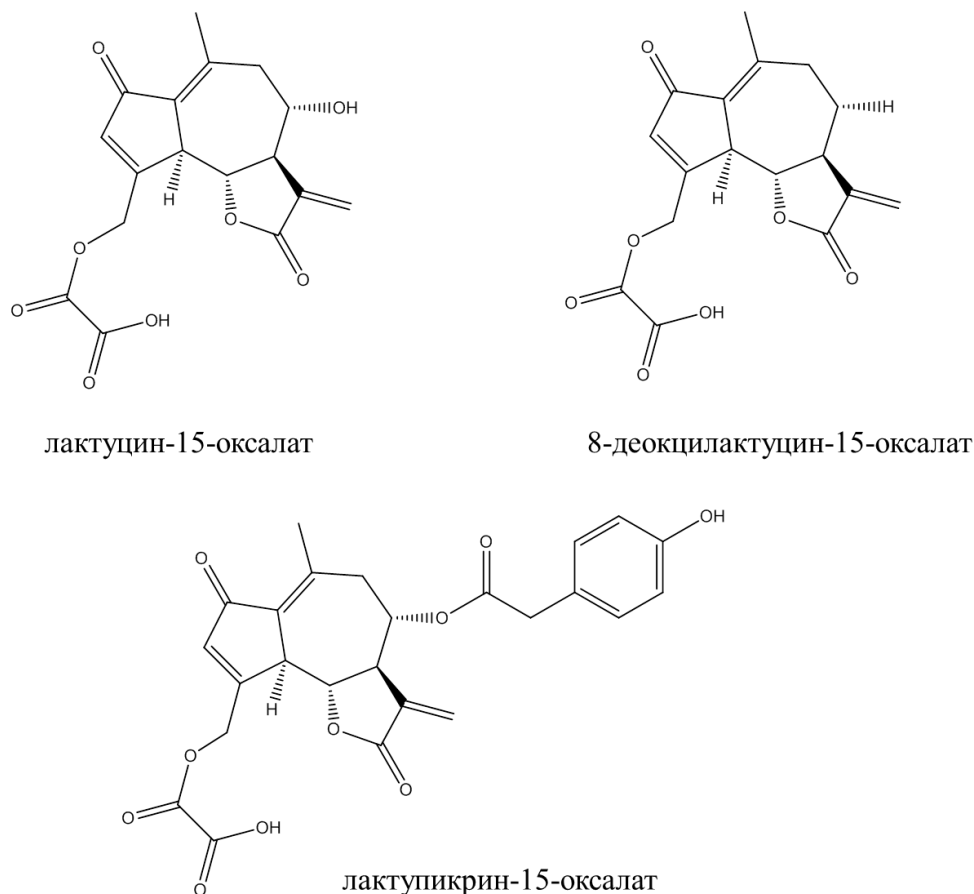


Слика 2. Класе сесквитерпенских лактона.



Слика 3. Главни сесквитерпенски лактони код цикорије - гвајанолиди лактуцинског типа.

Ова једињења се, осим у слободној форми, јављају и у виду коњугата. Код различитих врста салате (*Lactuca spp.*), пронађени су исти слободни СЛ као код цикорије, али и различите модификоване форме тих једињења - гликозиди, оксалати и сулфати (Sessa и сар., 2000). Код цикорије гајене у стаклинику, од модификованих форми присутни су само оксалати (слика 4), и то лактуцин-15-оксалат, 8-деоксилактучин-15-оксалат и лактуципкрин-15-оксалат, и они су заступљени у већој количини од слободних форми (Sessa и сар., 2000). Други аутори су детектовали веома малу количину 8-деоксилактучин-гликозида и 11,13-дихидро-8-деоксилактучин-гликозида у биљкама гајеним у стаклинику, а обилније количине 8-деоксилактучин-гликозида у трансформисаним кореновима цикорије гајеним *in vitro* (Malarz и сар., 2013).



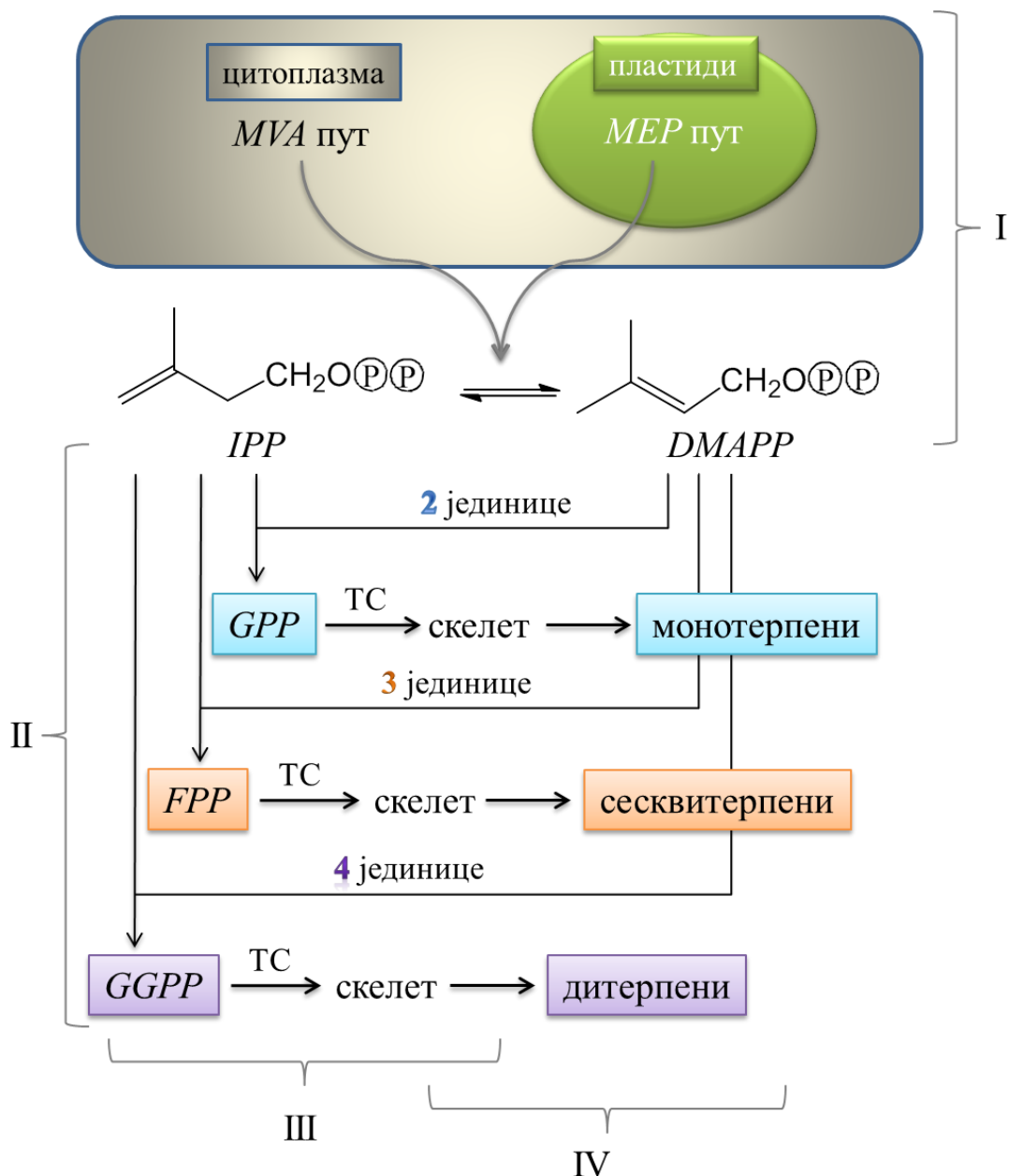
Слика 4. Оксалати сесквитерпенских лактона код цикорије.

### 1.2.2 Биосинтеза сесквитерпенских лактона

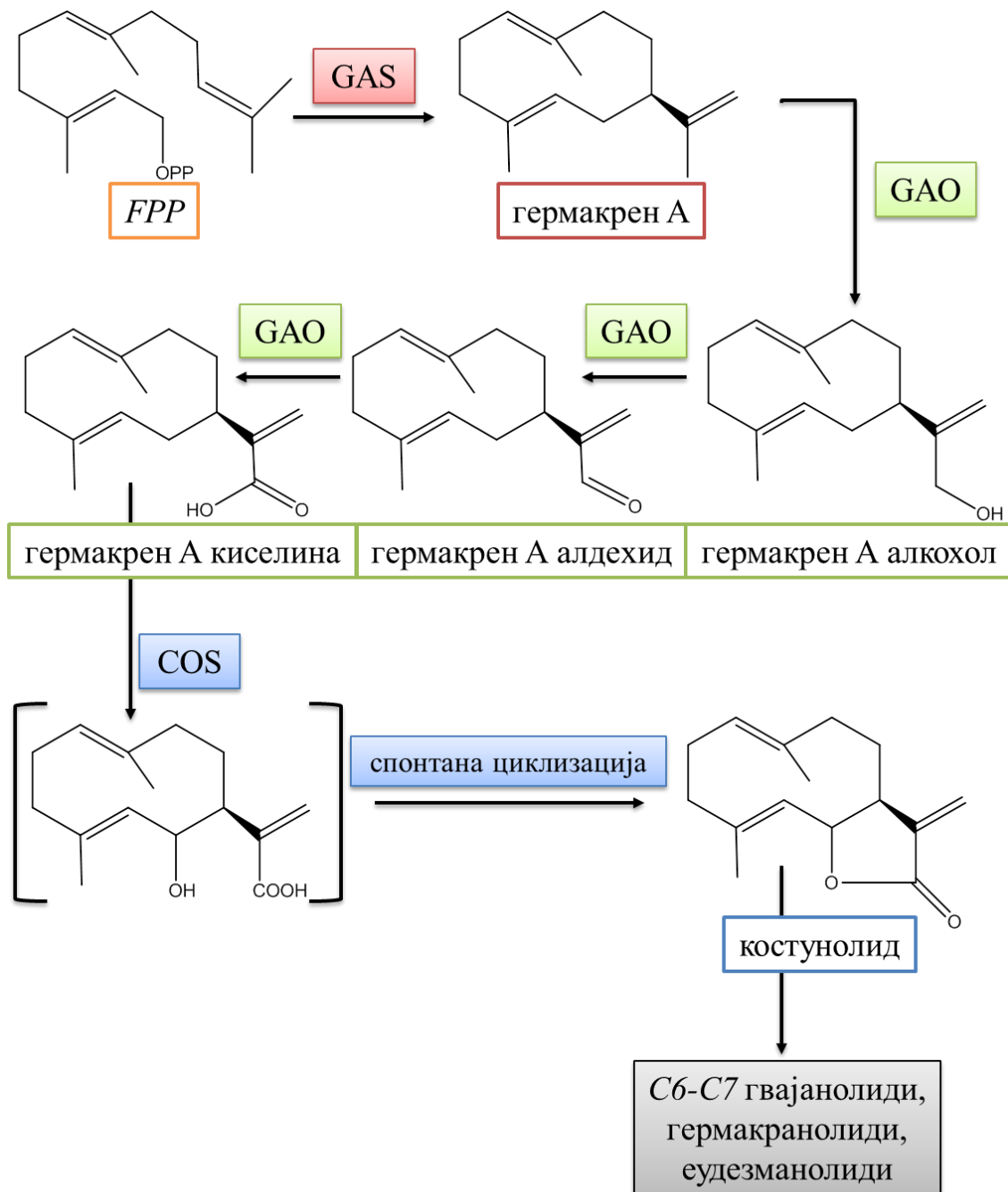
Биосинтеза терпена се може поделити у неколико фаза (*Lange* и *Ahkami*, 2013). Прва фаза се састоји у синтези изопентенил дифосфата (*IPP*) и диметилалил дифосфата (*DMAPP*) - основних градивних јединица терпена (слика 5). Код биљака, ови прекурсори се синтетишу на два начина. Први је пут мевалонске киселине (*MVA*) који функционише у цитосолу, ендоплазматичном ретикулуму и пероксизомима. Други пут се одиграва искључиво у пластидима и назива се *MEP* пут (2-*C*-метил-*D*-еритритол-4-фосфат). Којим путем ће ићи синтеза прекурсора зависи од конкретног терпеноидног продукта, биљне врсте и посматраног ткива. Следећи корак је кондензација ове две јединице у геранил дифосфат (*GPP*) - прекурсор већине монотерпена, и фарнезил дифосфат (*FPP*) додавањем још једне јединице, који је прекурсор већине сесквитерпена. Додавањем треће *IPP* јединице настаје *GGPP* (геранилгеранил дифосфат) који је

прекурсор дитерпена. Трећу фазу каталишу специфичне терпен синтазе, које склапају структурно језгро сваке од класа терпеноида. Ови ензими су одговорни за огромну разноврсност ове групе једињења, и једна терпен синтаза често каталише формирање различитих производа од истог прекурсора, захваљујући веома реактивним интермедијерима. Генерално гледано, монотерпен синтазе су локализоване у пластидима, а сесквитерпен синтазе у цитосолу, мада има изузетака (*Lange и Ahkami, 2013*). У последњој фази синтезе, терпеноидни скелети се даље модификују кроз редокс реакције, коњугацију и друге реакције, које дају још већу разноврсност финалним производима.

Све три групе сесквитерпена који су присутни код цикорије - гермакранолиди, еудезманолиди и гвајанолиди, потичу од заједничког прекурсора - гермакрена А, једињења које настаје циклизацијом *FPP* (слика 5, корак 3) уз ослобађање дифосфата, дејством ензима гермакрена А синтазе (*GAS, EC 4.2.3.23*) (*de Kraker и сар., 1998; Bouwmeester и сар., 2002*) (слика 6). У следећем кораку, гермакрена А се оксидује дејством ензима гермакрена А оксидазе (*GAO, EC 1.14.13.123*; синоним: гермакрена А хидроксилаза), цитохром *P450* ензима који каталише тростепену конверзију гермакрена А у гермакрена А киселину (гермакра-1(10),4,11(13)-триен-12-оик киселина) у присуству *NADPH*,  $H^+$  и кисеоника (*de Kraker и сар., 2001*). Хидроксилацију ове киселине у нестабилан интермедијер, који затим циклизује у костунолид, формирајући лактонски прстен, обавља ензим костунолид синтаза (*COS, EC 1.14.13.120*), такође цитохром *P450* ензим (*de Kraker и сар., 2002*). Костунолид је прекурсор свих *C6-C7* гвајанолида (укључујући лактуцин, лактупикрин и деривате), еудезманолида и гермакранолида.



Слика 5. Биосинтеза терпена у четири фазе (модификовано према Lange и сар. 2013). *MVA* путем у цитосолу и *MEP* путем у пластидима настају *IPP* и *DMAPP* (I фаза), који комбиновањем граде прекурсоре терпена - *GPP*, прекурсор монотерпена настаје кондензацијом ове две јединице, *FPP* настаје комбиновањем три јединице и прекурсор је сесквитерпена, а додавањем још једне јединице настаје *GGPP* који је прекурсор дитерпена (II фаза). У трећој фази дејством терпен синтаза (ТС) од прекурсора настају основни структурни скелети сваке групе терпена, од којих даљим модификацијама (IV фаза) настају разноврсни моно, сескви и дитерпени.



Слика 6. Биосинтеза сесквитерпенских лактона (модификовано према Liu и сар. 2011). Од *FPP* дејством гермакрен А синтазе настаје гермакрен А, који кроз серију реакција које катализује гермакрен А оксидаза даје гермакрен А киселину, од које настаје (+)-костунолид, прекурсор осталих сесквитерпенских лактона, дејством костунолид синтазе и спонтаном циклизиацијом.

Сви ови ензими и гени који их кодирају су детектовани и изоловани из цикорије. GAS ензим цикорије је прво изолован и окарактерисан пречишћавањем из активне ензимске фракције корена (*de Kraker* и сар., 1998). Накнадно су изоловане две форме *mRNA* (*cDNA*) које кодирају овај ензим - *CiGASlo* (*GAS long*, дужа форма) и *CiGASsh* (*GAS short*, краћа форма) (*Bouwmeester* и сар., 2002). Ове две форме показују сличност од 72% на нивоу аминокиселина, и обе врше конверзију *FPP* у (+)-гермакрен А, што је потврђено хетерологом експресијом у бактерији *Escherichia coli*. Експресија ова два гена у биљкама цикорије се међусобно разликовала, те је утврђено да се *CiGASsh* посебно експримира у ткиву задебљалог корена и зеленим и етиолираним клијанцима, а нема експресије у развијеним листовима нити у чиконима, док је *CiGASlo* форма експримирана претежно у спољашњем делу корена, чиконима и клијанцима, али веома слабо у зеленим листовима (*Bouwmeester* и сар., 2002). Еволутивни значај присуства две форме овог ензима није јасан, како наводе исти аутори, као ни њихова диференцијална експресија и активност. Не зна се, такође, да ли се ови гени експримирају широм биљног ткива или у неким одређеним ћелијама, а до сада није проучена ни активност њихових промотора.

Гени за гермакрен А синтазу изоловани су и из сродних врста. Код зелене салате (*Lactuca sativa*) изоловане су такође две форме *mRNA* - *LTC1* и *LTC2* (*Bennett* и сар., 2002), које су имале 92% сличности у секвенци аминокиселина. И код сунцокрета (*Helianthus annuus*) пронађене су две форме GAS - *HaGAS1* и *HaGAS2* (*Göpfert* и сар., 2009), док је код *Tanacetum parthenium* (*Majdi* и сар., 2011) и *T. cinerariifolium* (*Ramirez* и сар., 2013) изолована по једна форма *GAS cDNA*, као и из артичоке (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) (*Menin* и сар., 2012).

Цитохром *P450* монооксигеназе су разноврсна група ензима, способна да каталише конверзију различитих супстрата, укључујући гермакрен А. Код цикорије су до сада изоловани гени за две врсте гермакрен А оксидазе. *GAO* ген изолован је из више врста породице *Asteraceae*: *C. intybus*, *H. annuus*, *L. sativa* и *Saussurea costus* (*Nguyen* и сар., 2010). *GAO* из ових врста, представника различитих потпородица *Asteraceae*, показује високу сличност секвенце аминокиселина (78,4-97,3%), што говори о високој еволутивној конзервираности овог

ензима (*Nguyen* и сар., 2010). Ген за другу гермакрен А оксидазу из цикорије (*CYP71AV8*) - способну такође да каталише конверзију валенсена у ноткатон, сесквитерпен значајан у индустрији, изоловали су *Cankar* и сар. (2011).

*COS* ген цикорије изоловали су и окарактерисали *Liu* и сар. (2011), који су, комбиновањем *GAS* гена из *T. cinerariifolium*, *GAO* гена из цикорије и новооткривеног *COS* гена цикорије, успели да реконструишу биосинтетски пут костунолида у квасцу и дувану (*Nicotiana benthamiana*).

*GAO* и *COS* гени изоловани су и из *T. cinerariifolium* (*Ramirez* и сар., 2013) и *L. sativa* (*Nguyen* и сар., 2010; *Ikezawa* и сар., 2011).

Даљи кораци у биосинтези главних СЛ код цикорије - лактуцина, лактупикрина и 8-деоксилактучина нису разјашњени. Од костунолида, неки гвајанолиди настају највероватније епоксидацијом, а затим отварањем епоксидног моста што омогућава стварање трицикличног скелета (*Simonsen* и сар., 2013), какав поседују главни гвајанолиди цикорије. Епоксидацијом, на пример, настаје партенолид (*de Kraker* и сар., 2002), од кога је код врсте салате (*Lactuca floridana*) предложено да настају 8-деоксилактучин и 11 $\beta$ H,13-дихидролактучин (*Qi* и сар., 1995). За друге гвајанолиде, на пример 11(S),13-дихидро-8-деоксилактучин, предложено је да настају вероватно преко 11(S),13-дихидрокостунолида, интермедијера који је детектован приликом инкубације костунолида са активном фракцијом протеинског екстракта корена цикорије. Лактуцин и лактупикрин вероватно настају директно од костунолида, без 11(S),13- интермедијера (*de Kraker* и сар., 2002).

### 1.2.3 Латекс

Сесквитерпенски лактони се акумулирају највише у латексу код врста из породице *Asteraceae* (*Sessa* и сар., 2000). Латекс је лепљива течност беличасте боје садржана у латициферама - појединачним или повезаним ћелијама које чине мрежу канала која се протеже кроз све биљне органе (*Evert* и *Eichhorn*, 2006). Код цикорије, латицифере увек прате васкуларни систем, и јављају се на периферији или унутар флоема (*Vertrees* и *Mahlberg*, 1978). Присутне су у свим биљним



органима, а повезане су и са длакама на инволукруму цвета, које представљају терминалне завршетке латицифера цикорије (*Evert и Eichhorn, 2006*).

Латекс садржи разне супстанце, растворене или у колоидној суспензији: угљене хидрате, органске киселине, соли, стероле, масти, мукозна једињења, разне терпеноиде и честице гуме (*Evert и Eichhorn, 2006*). Латекс може да садржи и алкалоиде, канабиноиде, шећере, протеине, танине, зрна скроба, кристале оксалата и малата. Секундарни метаболити садржани у латексу не учествују даље у метаболизму ћелија и нису мобилни, као ни сам латекс (*Evert и Eichhorn, 2006*). У латициферама постоји, међутим, значајан тургор који омогућава пасивно истицање латекса приликом пресецања канала у случају повреде.

Функција латицифера и латекса у биљкама није сасвим разјашњена. Будући да су многе компоненте цитотоксичне, сматра се да латицифере њиховим складиштењем штите биљна ткива од штетних ефеката (*Hagel и сар., 2008*). Сматра се и да истицање и акумулација честица латекса на месту повреде помаже у затварању рана на биљном ткиву, али и да секундарни метаболити и честице гуме садржане у њему делују против хербивора (*Evert и Eichhorn, 2006*), било хемијском и ензиматском одбраном или физичким слепљивањем усног апарата инсеката. Латекс такође садржи каталитичке ензиме и друге компоненте које делују антимикуробно (*Upadhyay, 2011*). Сесквитерпенски лактони у латексу вероватно доприносе одбрани биљке својом горчином, токсичним, седативним и антихербиворним дејствима (*Rees и Harborne, 1985; Sessa и сар., 2000; Upadhyay, 2011*).

Иако се СЛ највише акумулирају у латексу и латициферама, до сада није показано да ли се у њима и синтетишу, или ту функцију обављају неки други типови ћелија (*Sessa и сар., 2000; Hagel и сар., 2008*), а да се у латициферама само складиште. У латексу зелене салате пронађени су различити протеини везани за метаболизам терпена (*Cho и сар., 2009*), мада углавном у вези са биосинтезом изопреноидних јединица, не и сесквитерпенских лактона. Код неких биљака, терпеноидна једињења се синтетишу и акумулирају у жлезданим трихомама (*Hagel и сар., 2008; Majdi и сар., 2011; Lange и Turner, 2013*). Гени за GAS су изоловани и окарактерисани из жлезданих трихома неколико врста породице

*Asteraceae: Artemisia annua, H. annuus, Solidago canadensis* и *T. parthenium* (Lange и Turner, 2013). Код цикорије су пронађене вишећелијске механичке и жлездане трихоме (Krak и Mráz, 2008), али није познат њихов хемијски састав и биосинтетска активност.

#### **1.2.4 Фенолна једињења**

Фенолна једињења, природни антиоксиданси присутни широм биљног царства, позната су по својим лековитим својствима и значају у прехранбеној индустрији, где побољшавају боју, укус, стабилност и нутритивну вредност хране (Chen и Ho, 1997). Цикорија садржи бројна фенолна једињења. У метанолном екстракту биљке, најзаступљенија је цихоринска киселина (Street и сар., 2013). Осим ове хидроксициметне киселине, цикорија продукује и хлорогену, кафеоилтартаричну и кафеинску киселину, и флавоноиде - кверцетин, каемпферол, лутеолин и апигенин у форми гликозида (Heimler и сар., 2009).

Хлорогена киселина је присутна код великог броја биљака, а поседује значајну биолошку активност, која се вероватно базира на високом антиоксидативном потенцијалу овог једињења (Chen и Ho, 1997; Feng и сар., 2005). За хлорогену киселину је показано антимикуробно (Özçelik и сар., 2011), антиканцерогено (Feng и сар., 2005), антиинфламаторно (Francisco и сар., 2013), антивирално (Özçelik и сар., 2011), хипогликемијско (Meng и сар., 2013) и радиопротективно дејство (Cinkilic и сар., 2013).

### **1.3 Трансформација биљака агробактеријама и биоинжењеринг**

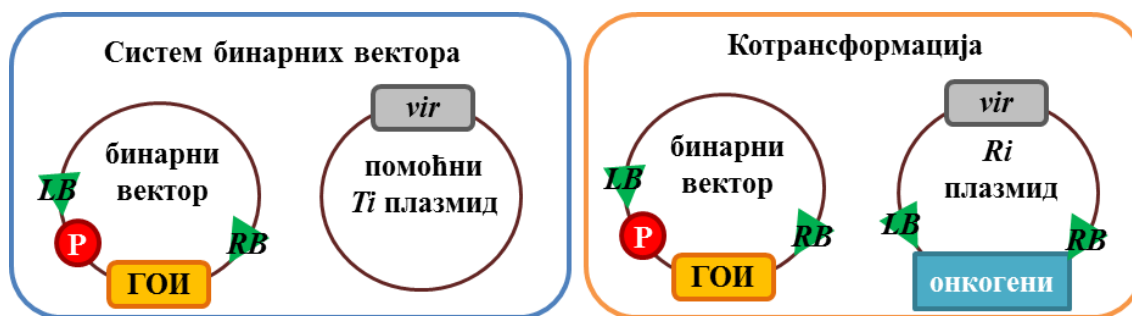
Трансформација биљака агробактеријама представља основ за проучавање различитих процеса у биљци и важан метод модификације и унапређивања особина биљака важних у индустрији, пољопривреди и фармацији. *Agrobacterium* генетички трансформише биљку домаћина убацивањем дефинисаног дела ДНК са свог *Ti* (енг. *tumor inducing* код *Agrobacterium tumefaciens*) или *Ri* (енг. *root inducing* код *Agrobacterium rhizogenes*) плаزمида у геном ћелије домаћина, изазивајући у природи поремећаје налик туморима код биљака - калусне туморе

(*A. tumefaciens*) или длакаве коренове (енг. *hairy-root*, *HR* код *A. rhizogenes*). Део ДНК који се убацује - Т-ДНК (енг. *transfer DNA*), ограничен је секвенцама дугим 24-25 базних парова, које су означене као *LB* (енг. *left border*) и *RB* (енг. *right border*) (Gelvin, 2003). У природи, Т-ДНК носи сет бактеријских гена - онкогене, гене за синтезу биљних хормона који модификују метаболизам и развиће домаћина, и гене за синтезу опина, једињења које бактерије користе као извор азота и енергије (Gelvin, 2003). Транспорт Т-ДНК у цитоплазму а затим и у геном биљне ћелије, омогућавају бактеријски фактори вируленције (*vir* гени) и протеини ћелије домаћина (Pitzschke, 2013). Инфекција започиње експресијом *vir* гена у одговору на примљени сигнал фенолних једињења које лучи повређена биљка. *Vir* протеини се затим везују за једноланчану Т-ДНК синтетисану са плаزمидом чинећи Т-комплекс. Овај комплекс се убацује у цитоплазму ћелије домаћина, а затим уз помоћ бактеријских и биљних протеина, у једру ћелије, где се уграђује у геном биљке, а затим експримира (Pitzschke, 2013).

Било која ДНК секвенца, смештена између *LB* и *RB* граничника, може такође бити интегрисана у биљни геном, што омогућава примену овог природног процеса у биотехнологији. Ради олакшања конструкције вектора који носе стране гене, данас се претежно користи систем бинарних вектора (слика 7), у којем се гени од интереса смештају у вештачки *Ti* плазмид *A. tumefaciens*, између *LB* и *RB* граница, избацивањем свих бактеријских гена, док се вирулентни гени налазе на другом, помоћном плазмиду (Komori и сар., 2007). Осим овог приступа, могуће је користити нетакнут бактеријски плазмид, на пример *Ri* плазмид *A. rhizogenes*, заједно са вештачким бинарним вектором (слика 7), па тако приликом трансформације долази до уграђивања Т-ДНК са оба плаزمидом у геном домаћина, што се означава као котрансформација (Tzfira и Citovsky, 2008).

Овакви сојеви *A. tumefaciens* код којих су уклоњени онкогени, називају се разоружани (енг. *disarmed*), и трансформација овим сојевима не изазива појаву тумора код биљака. У случају немодификованих сојева (који садрже онкогене), добијају се трансформисане ћелије (калуси, тумори) које се умножавају без егзогена додатих регулатора раста, али често врло слабо регенеришу изданке (Chawla, 2000). Разоружани сојеви дају трансформисане ћелије којима је потребно

додавати ауксине и цитокидине у одређеном односу, да би се индуковала регенерација изданака и оживљавање. На овај начин, *A. tumefaciens* трансформацијом могу се добити биљке нормалне морфологије. У случају котрансформације биљака *A. rhizogenes* сојевима, експримирају се онкогени са *Ri* плаزمида, али они не представљају препреку за регенерацију – у *HR* културама се често спонтано регенеришу изданци. У случају да изостане спонтана регенерација изданака на *HR*, исечци коренова се пребацују на медијум са регулаторима растења у циљу индукције регенерације (Veena и Taylor, 2007). Биљке регенерисане из *HR* култура, често показују промењен фенотип (због експресије онкогена) - наборане листове, скраћене интернодије, слабију апикалну доминацију, смањену фертилност, промене времена цветања и гранате коренове редукованог геотропизма (Christey, 2001; Casanova и сар., 2004). Понекад се регенерацијом добију и биљке нормалног фенотипа, што се углавном објашњава утишавањем бактеријских гена.



Слика 7. Два система трансформације агробактеријама: систем бинарних вектора са геном од интереса (ГОИ) и репортер геном (P) смештеним између *LB* и *RB* граничника на бинарном плазмиду, док се вирулентни гени (*vir*) налазе на помоћном плазмиду без Т-ДНК; и котрансформација - систем у коме се Т-ДНК са бинарног вектора (ГОИ и репортер) преноси заједно са Т-ДНК са *Ri* плаزمида (онкогени), који садржи и вирулентне гене.

### 1.3.1 Утицај *Rol* гена на фенотип регенераната и секундарни метаболизам

Онкогени *A. rhizogenes* на Т-ДНК *Ri* плазмида означени су као *Rol* гени (енг. *root locus*) (Nilsson и Olsson, 1997). За ове гене показано је да су одговорни за индукцију *HR* фенотипа, који подразумева врло гранате длакаве коренове који брзо расту и не показују изражен гравитропизам, али и да утичу на бројне

биохемијске и физиолошке промене код трансформисаних биљака, мењајући различите аспекте растења, развића и хормонског метаболизма биљке (*Bulgakov*, 2008).

Функције појединачних *Rol* гена нису у потпуности разјашњене. *RolA* ген кодира протеин са ДНК-везујућим доменом, чија функција није позната (*Bulgakov*, 2008). До сада је показано да код неких биљака овај ген утиче на формирање коренова, увијање листова, скраћивање интернодија, промену изгледа и броја цветова, касније цветање, одложену сенесценцију, патуљаст раст, повећану осетљивост на ауксин и поремећен метаболизам полиамина (*Casanova* и сар., 2005; *Veena* и *Taylor*, 2007). Експримира се претежно у стаблу, а слабије у корену и листу. *RolB* ген кодира протеин са активношћу тирозин фосфатазе, те вероватно учествује у трансдукцији сигнала. *RolB* утиче на формирање меристема, гранатих коренова, мења морфологију листа и цвета, смањује дужину интернодија, апикалну доминацију, вијабилност полена и повећава осетљивост на ауксин (*Casanova* и сар., 2005). Његова самостална експресија је довољна за индукцију *HR* (*Georgiev* и сар., 2007), али је потребан одређен ниво експресије за наставак раста коренова, будући да његова оверекспресија смањује формирање адвентивних коренова и изазива некрозу калуса и листова (*Veena* и *Taylor*, 2007). *RolC* ген кодира синтезу протеина цитокинин-*N*-глукозидазе, ензима за који се сматра да доводи до локализованог ослобађања цитокинина из неактивних форми. На тај начин, експресија овог гена утиче на хомеостазу биљних хормона у ћелијама, али та функција до данас није потврђена. Код трансформисаних биљака *RolC* ген утиче на патуљаст раст, смањену апикалну доминацију, изазива обилније гранање, промену морфологије листа, повећање броја цветова, индукује раније цветање, смањену продукцију полена и семена, стерилитет, а утиче и на метаболизам цитокинина и осетљивост на ауксин (*Casanova* и сар., 2005). У биљкама трансформисаним само *RolC* геном, овај ген се експримира претежно у корену, мање у листу, док у присуству осталих *Rol* гена, највише се експримира у листовима (*Veena* и *Taylor*, 2007). *RolD* ген кодира орнитин циклодеаминазу - ензим који конвертује орнитин у пролин. Сматра се да учествује у издуживању коренова и изазива раније и интензивније цветање (*Casanova* и сар., 2005).

Сви *Rol* гени утичу на цветање, често антагонистички. За *RolA* је показано да одлаже цветање дувана када се експримира са нативним промотором, а потпуно га инхибира ако се експримира конститутивно са *35S* промотором (*Bais* и *Ravishankar*, 2001). *RolB* такође инхибира цветање, смањујући величину и број цветова, и вијабилност полена (*Casanova* и сар., 2005). *RolC*, са друге стране, узрокује раније цветање код неких врста, као и *RolD* (*Casanova* и сар., 2005; *Veena* и *Taylor*, 2007).

*RolA*, *RolB* и *RolC* гени утичу и на секундарни метаболизам биљке. Њихове улоге су се показале у неким случајевима инхибиторне на биосинтезу посматраних метаболита, али у највећем броју случајева, трансформација неким од ових гена или њиховом комбинацијом, повећавала је биосинтезу секундарних метаболита вишеструко (од 2 до 300 пута у односу на нетрансформисане биљке), у зависности од биљне врсте и конкретног метаболита (*Bulgakov*, 2008). Експресија *RolA* гена стимулисала је продукцију антраквина у култури калуса *Rubia cordifolia* (*Shkryl* и сар., 2008), и никотина код дувана (*Palazón* и сар., 1997). *RolC* ген стимулисао је продукцију гинсенозида у трансформисаним кореновима женшена (*Bulgakov* и сар., 1998), тропанских алкалоида код *Atropa belladonna* (*Bonhomme* и сар., 2000), антраквина (код *R. cordifolia*), али је инхибиторно деловао на синтезу рабдозина и рузмаринске киселине у трансформисаним ћелијама *Eritrichium sericeum* и *Lithospermum erythrorhizon* (*Bulgakov* и сар., 2005). *RolB* је показао најјаче стимулаторно дејство на секундарни метаболизам, повећавајући продукцију ресвератрола код калуса *Vitis amurensis* 100 пута у односу на контролу (*Kiselev* и сар., 2007), и антраквина код *R. cordifolia* 15 пута у односу на нетрансформисани калус (*Shkryl* и сар., 2008). Улога *RolD* гена у секундарном метаболизму до сада није утврђена (*Bulgakov*, 2008).

### **1.3.2 Пролазна трансформација биљака агроинфилтрацијом**

Осим стабилне трансформације, могућа је и пролазна трансформација (енг. *transient expression assay*) биљке, где не долази до обавезне интеграције страних гена у геном домаћина. Применом методе пролазне трансформације долази до трансфера и привремене експресије страних гена у биљној ћелији, без селекције за

стабилну интеграцију трансгена. Овакав метод трансформације је врло брз и не зависи од позиционих ефеката интеграције страних гена у геном, који доводе до варијација у генској експресији и могућег утишавања гена, те је погодан за брзу проверу функционалности конструктора (*Simonović, 2011*). Како овај метод не захтева селекцију трансформисаних ћелија и регенерацију целих трансгених биљака, погодан је за трансформацију биљних врста које тешко дају стабилне трансформанте и регенеранте (*Kapila и сар., 1997*). Овај систем трансформације је веома користан и за истраживање унутарћелијске локализације експримираних протеина, одређивање функционалних делова промотора, испитивање ефеката утишавања гена, функционалну карактеризацију гена и друге намене (*Lee и Yang, 2006*). На овај начин могу се трансформисати биљни органи, суспензије ћелија или протопласти. Гени од интереса и други ДНК молекули, могу се директно убацивати у биљне ћелије, електропорацијом, биолистичком трансформацијом (енг. *particle bombardment*), микроињектирањем, ултразвучном трансформацијом, трансформацијом уз помоћ PEG-а (полиетилен-гликол), вирусним векторима и другим начинима (*Kapila и сар., 1997*). Све ове методе су варијабилне ефикасности, а захтевају скупу опрему или компликовану процедуру (*Yang и сар., 2000*). Биолистичком трансформацијом се трансформишу само малобројне ћелије, а убачена ДНК мора да се допреми до једра да би дошло до транскрипције. Када су у питању вирусни вектори, ниво експресије трансгена је висок али време које протекне од трансформације биљке до формирања зрелог протеина је релативно дуго (до четири недеље), што не погодује експериментима у којима је потребна брза експресија, и не могу се експримирати велики протеини, због мале величине вируса (*Negrout и сар., 2005*).

Једноставнији, јефтинији и бржи метод пролазне трансформације је агроинфилтрација, где се у листове биљака убризгава или вакуум инфилтрира суспензија *A. tumefaciens* сојева које носе одређене конструкте, а модификованих да имају високу ефикасност пролазне трансформације (*Wroblewski и сар., 2005*). Ова метода је знатно бржа, једноставнија а често и знатно ефикаснија што се тиче нивоа експресије трансгена, у односу на стабилну трансформацију код већине биљака (*Kapila и сар., 1997; Wroblewski и сар., 2005*). Велики број ћелија листа бива истовремено трансформисан, трансген се брзо експримира (3-5 дана после

инфилтрације могуће је детектовати протеински продукт), на тај начин се добија већа количина протеина за даља испитивања и не постоји ограничење у величини протеина, што омогућава синтезу великих протеинских комплекса, као што су антитела (*Negroutk и сар.*, 2005). Агроинфилтрацијом се у листове биљака убацују живе агробактерије, а експресија трансгена се детектује у року од пар дана, без антибиотске селекције. Да би се спречила експресија трансгена у бактеријским ћелијама, и стога лажно позитивна реакција, трансгени се модификују тако да садрже интроне који спречавају експресију у бактеријама, или се стављају под контролу еукариотских промотора (*Ohta и сар.*, 1990).

Употреба ове методе омогућава да се сојеви са различитим конструктима могу комбиновати, ради експресије више различитих трансгена истовремено (*Tzfira и Citovsky*, 2008). На овај начин *Liu и сар.* (2011) су успешно реконструисали биосинтетски пут костунолида цикорије у биљкама дувана (*Nicotiana benthamiana*). Осим на биљкама дувана, агроинфилтрацију је могуће вршити и на зеленој салати, парадајзу, *Arabidopsis*-у и другим биљкама (*Joh и сар.*, 2005; *Wroblewski и сар.*, 2005), што омогућава испитивање гена укључених у различите биосинтетске путеве. Различите биљке пружају разнолик ћелијски контекст, па је избором одговарајуће врсте могуће смањити број конструката које је неопходно инфилтрирати у циљу реконструкције неког биосинтетског пута.

С обзиром на брзину и једноставност, агроинфилтрација постаје преференцијална метода за прелиминарна истраживања - тестирање нових конструката, варијанти репортера, испробавање секвенци за усмеравање протеина у различите ћелијске компартменте и друго.



### 1.3.3 Преглед литературе о трансформацијама цикорије

Цикорија је до сада трансформисана различитим сојевима *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens* (табела 1).

Табела 1. Преглед литературних података о генетичким трансформацијама цикорије. *BAP* - бензиламинопурин, *NAA* – нафтил сирћетна киселина, *IBA* - индол-3-бутерна киселина, *IAA* - индол-3-сирћетна киселина, *KIN* - кинетин.

сврха	тип	вектор/трансген	регенерација	референца
трансформација	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>wild-type pRiA4 TL-DNA</i>	спонтана, цветање <i>in vitro</i>	(Sun и сар., 1991)
испитивање утицаја <i>Rol</i> гена на цветање	стабилна - <i>A. rhizogenes</i> , <i>A. tumefaciens</i>	<i>pRiA4</i> , <i>pRi15834</i> , <i>pRi8196</i> плаزمиди, <i>rolC</i> ген	индукована са <i>BAP</i> , цветање <i>in vitro</i>	(Kamada и сар., 1992)
резистенција на сулфониуреа хербицид	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	<i>acetolactate synthase gene (csr1-1)</i>	индукована	(Vermeulen и сар., 1992)
трансформација лисних експлантата	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	разоружани <i>Ti</i> плазмид, <i>nptII</i> и <i>uidA</i> гени	индукована са <i>BAP</i>	(Genga и сар., 1994)
испитивање утицаја <i>Rol</i> гена на цветање	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>pRiA4</i>	индукована са <i>BAP</i> и <i>NAA</i> , цветање <i>in vitro</i>	(Inoguchi и сар., 1995)
трансформација пупољака	стабилна - <i>A. tumefaciens</i> , и пролазна	бинарни плазмид, <i>nptII</i> и <i>uidA</i> гени	индукована са <i>BAP</i>	(Frulleux и сар., 1997)
испитивање функције гена	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	<i>fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT)</i> из јечма	спонтана	(Sprenger и сар., 1997)
оверпродукција кумарина	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>Ri (LMG 150 сој)</i>	нема	(Bais и сар., 1999)
испитивање регенерације и цветања	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>Ri (LMG 150 сој)</i>	индукована хормонима, <i>BAP</i> и <i>IAA</i> , цветање индуковано путресцином и <i>AgNO<sub>3</sub></i>	(Bais и сар., 2001a; Bais и сар., 2001b)
испитивање морфогенезе нодула	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	фузија промотора калмодулин гена код јабуке са <i>GUS</i>	индукована са <i>BAP</i> и <i>IBA</i>	(Piéron и Watillon, 2001)
оверпродукција сесквитерпенских лактона	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>pRi1855</i>	нема	(Malarz и сар., 2002; Malarz и сар., 2013)
испитивање микоризе и продукције стерола	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>pRi (strain 2659)</i>	нема	(Fontaine и сар., 2004)

анализа промотора	пролазна - биолистичка	фузија промотора <i>1-FEH IIa</i> гена, (фруктан 1-егзохидролаза) са луциферазом	-	( <i>Michiels и сар.</i> , 2004)
оверпродукција инулина	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	<i>hpRNA</i> конструкт за утишавање <i>1-FEH</i> гена	-	( <i>Asad</i> , 2006)
испитивање гена	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	<i>γ-tocopherol methyltransferase (γ-TMT)</i> ген <i>Arabidopsis-a</i>	индукована са <i>BAP</i> , <i>IBA</i> и <i>AgNO<sub>3</sub></i>	( <i>Hwang и сар.</i> , 2009)
продукција интерферона	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	<i>interferon-a2b</i> ген	индукована са <i>KIN</i> и <i>NAA</i>	( <i>Matvieieva и сар.</i> , 2009)
продукција интерферона и антигена	стабилна - <i>A. rhizogenes</i>	<i>interferon-a2b</i> ген, <i>ESAT6</i> и <i>Ag85B</i> антигени <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	спонтана, спонтано цветање <i>in vitro</i>	( <i>Matvieieva и сар.</i> , 2011)
продукција полинезасићених масних киселина дугог ланца	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	гени за различите елонгазе и десатуразе	индукована са <i>BAP</i> и <i>IAA</i> , цветање у стакленику	( <i>Mekky и сар.</i> , 2011)
повећање толеранције на висок салинитет	стабилна - <i>A. tumefaciens</i>	<i>TaNHX2</i> вакуоларна <i>Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup></i> пумпа	спонтана	( <i>Zhang и сар.</i> , 2011)

Цикорија је лако трансформисана различитим сојевима *A. rhizogenes* (табела 1), између осталог у сврху евалуације продукције сесквитерпенских лактона у *HR* културама. Добијене културе су садржале врло мало слободних (негликозилованих) сесквитерпенских лактона, али су у односу на корен нетрансформисаних биљака, биле богате гликозилованим формама (*Malarz и сар.*, 2002; *Malarz и сар.*, 2013). До сада није истраживан ниво СЛ у регенерисаним биљкама цикорије, нити је покушана манипулација генима из биосинтетског пута СЛ ради промене нивоа ових једињења.

#### 1.3.4 *In vitro* култура и биоинжењеринг

Бројни секундарни метаболити биљака, значајни у фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији, продукују се у специјализованим ћелијама и ткивима биљке, често у малим количинама. У већини случајева, њихова хемијска синтеза није исплатива, захваљујући комплексној структури и

специфичној активности, те се индустрија углавном ослања на екстракцију жељених једињења из биљака гајених у пољу. У односу на овај начин гајења, *in vitro* култура биљних ћелија, ткива и органа има бројне предности у производњи секундарних метаболита. Те предности обухватају контролисане и лако прилагодљиве услове гајења, независне од географских и климатских фактора, и лишене штеточина и патогена (Georgiev и сар., 2012). *In vitro* технике омогућавају бољу контролу синтезе и квалитета жељених метаболита, што помаже уједначености квалитета производа тражених на тржишту (Talano и сар., 2012).

Додатну флексибилност у овој области омогућавају технике генетичке трансформације, чијом применом се повећава могућност добијања специфичних секундарних метаболита за које у контролисаним *in vitro* условима важи слободнија законска регулатива него за гајење у пољу. Трансформација биљака уз помоћ *A. tumefaciens* омогућила је циљани метаболички инжењеринг и стварање стабилно трансформисаних линија које је могуће умножавати готово неограничено (De La Riva и сар., 1998; Lessard и сар., 2002), док је трансформацијом са *A. rhizogenes* било могуће стварање *HR* култура, који су, захваљујући активности бактеријских гена, показивали генерално виши ниво секундарног метаболизма (Saito и сар., 1992; Sujatha и сар., 2013). Додатна предност *HR* култура је и могућност њиховог гајења у биореакторима, са високим степеном продукције биомасе и зарад изолације велике количине жељених једињења (Srivastava и Srivastava, 2007). Осим брзог растења без присуства егзогена додатих хормона, *HR* културе имају и друге предности у производњи секундарних метаболита, као што су шири дијапазон присутних једињења, захваљујући биосинтетичким могућностима диференцираних ткива, генетичка и биохемијска стабилност трансформисаних линија (Rhodes и сар., 1994; Bais и сар., 2000a; Veena и Taylor, 2007). До сада је показана успешна продукција различитих метаболита у *HR* културама већег броја биљних врста, трансформисаним уз помоћ дивљег типа *Ri* плаزمида (Giri и Narasu, 2000; Srivastava и Srivastava, 2007; Zhou и сар., 2011; Georgiev и сар., 2012; Talano и сар., 2012). Иако је регенерација трансгених биљака из *HR* култура могућа, често и без додавања регулатора растења у подлогу (Momčilović и сар., 1997; Sretenović-Rajičić и сар., 2006; Vinterhalter и сар., 2006; Subotić и сар., 2009), слабо је познато каква је продукција

секундарних метаболита у регенерисаним биљкама (*Chaudhuri* и сар., 2006), и да ли на њу утичу различите фенофазе биљака *in vitro*, на пример цветање у култури.

#### 1.4 Проучавање функције и експресије гена биљака

За било коју врсту манипулисања метаболизмом биљака, важно је утврдити како гени и њихови продукти функционишу у врсти из које потичу. Након секвенцирања генома или транскриптома одабране врсте, утврђује се претпостављена функција гена, поређењем секвенце са познатим генима и протеинима. Затим се приступа изолацији тих гена и њихових продуката, и експресији у хетерологим домаћинима, на пример бактеријама или квасцима, где се синтетишу генски продукти чије се особине анализирају и утврђује се коју врсту реакције катализују, уколико се ради о ензимима. Осим тога, посматра се експресија и функција гена у изворним биљкама. Може се пратити експресија великог броја гена истовремено *microarray* техникама, или детектовати експресија одређеног гена *northern* хибридизацијом, *RT-PCR*-ом и *qRT-PCR* техникама (*Meyers* и сар., 2004). Да би се локализовала експресија испитиваног гена у одређеном ткиву или ћелијама биљке, користе се технике *in situ* хибридизације специфичних проба према *mRNA* гена, или трансформације биљака конструктима који носе фузије репортер гена и испитиване секвенце. Репортер ген може бити фузионисан за ген од интереса (транслациона фузија), или за промотор и друге регулаторне секвенце гена (транскрипциона фузија). Експресија гена се визуелизује детекцијом продуката репортер гена, најчешће преко флуоресценције или ензиматске реакције. Испитивање функције гена у биљци врши се проучавањем фенотипа који се добија када ген недостаје - мутаната добијених насумичном или циљаном мутагенезом (интродуковањем и експресијом мутираних верзија гена). Сличан фенотип, или низ његових блажих варијанти, може се добити и утишавањем гена преко РНК интерференце (енг. *RNA interference*, *RNAi*) (*Alberts* и сар., 2002). Други начин испитивања њихове функције представља оверекспресија циљних гена и праћење њених ефеката на

биљку. Ове методе су важне и у биотехнологији, када се манипулише нивоом неког секундарног метаболита ради повећања или смањења његове продукције.

За добијање рекомбиноване ДНК која би се користила у наведене сврхе, употребљавају се технике клонирања, где се пажљивим избором репортер гена, маркера за селекцију, промотора и других регулаторних секвенци, као и дела ДНК који се испитује, склапа конструктор - вектор, који се уводи, интегрише а затим експримира у циљном организму. Код биљака, најуспешније су се показале трансформације сојевима агробактерија, па се у ту сврху најчешће конструишу бинарни вектори. Склапање вектора одређених карактеристика посебно је олакшано коришћењем техника *Gateway*<sup>®</sup> (*Invitrogen, Gaithersburg, MD, САД*) клонирања, где се у рутинским експериментима ДНК фрагмент (ген од интереса, промотор или *RNAi* конструктор) место-специфичном рекомбинацијом убацује у одабрани вектор, који већ садржи остале елементе. Овај приступ је знатно једноставнији, бржи и ефикаснији од класичног клонирања уз помоћ рестрикционих ензима, а фрагмент је могуће брзо, по потреби, пребацити и у другу врсту вектора, што доприноси значајној флексибилности система (*Simonović, 2011*). Избор *Gateway* вектора за примену у биљкама је врло велики и могуће је одабрати векторе за циљану експресију испитиваних гена под контролом конститутивних или индуцибилних промотора, анализу субћелијске локализације протеина фузијом са репортер генима на *C*- или *N*- термину, анализу активности испитиваног промотора фузијом са репортерима, анализу комплементације мутантних линија биљака, експресију конструктора за посттранскрипционо утишавање гена и друге намене (*Karimi* и сар., 2002; *Curtis* и *Grossniklaus, 2003*).

#### **1.4.1 Праћење експресије гена *RT-PCR* и *qRT-PCR* техникама**

Детекција и одређивање нивоа експресије гена *northern* и *PCR* техникама захтева претходну изолацију РНК из биљке и њено превођење у једноланчану *cDNA* реверзном транскрипцијом. Реверзном транскрипцијом може се превести читав спектар присутних РНК молекула (коришћењем *poly(dT)<sub>n</sub>* прајмера или смеше хексамера), или само анализирани транскрипт (коришћењем специфичних

прајмера). У поређењу са *northern blot* анализом, *PCR* технике су брже, једноставније, осетљивије и захтевају мању количину изоловане РНК, што је посебно важно приликом анализе експресије трансгена код трансформисаних биљака, када је потребно анализирати врло велики број клонова у раној фази развића (*Toplak* и сар., 2004). Једноланчани *cDNA* молекули се затим амплификују *PCR* техникама, било *end-point* или квантитативним *PCR*-ом, користећи прајмере специфичне за жељени транскрипт. *End-point PCR* пружа квалитативну информацију о томе да ли је одређени транскрипт присутан у датој *cDNA* колекцији, визуелизацијом траке одређене величине на агарозном гелу после амплификације, али не даје информацију о почетном броју транскрипата присутних у *cDNA*. Зато се употребљава квантитативни *PCR* (*qRT-PCR*) који омогућава праћење умножавања транскрипта кроз циклусе *PCR*-а у реалном времену (енг. *real-time*) (*Wong* и *Medrano*, 2005). Праћење количине синтетисане ДНК омогућава коришћење флуоресцентних репортер-боја, на пример *SYBR Green* (*Zipper* и сар., 2004), које се везују за дволанчани ДНК продукт у сваком од циклуса амплификације, а пораст флуоресценције као мерило пораста количине ампликона детектује се у сваком циклусу. Подаци о порасту броја ампликона прикупљају се у експоненцијалној фази амплификације, када је ефикасност реакције највећа (*Nestorov* и сар., 2013). Квантификација у *real-time* експерименту се може вршити апсолутно или релативно. Релативна квантификација пореди експресију гена у контроли и третираном узорку (или трансформисаном) и одређује колико пута се мења експресија тог гена у поређењу са контролом (*Livak* и *Schmittgen*, 2001). Апсолутна квантификација подразумева прављење серијских разблажења познате концентрације посматраног фрагмента ДНК (*cDNA* или плазида) чијом амплификацијом се конструише стандардна крива. Оваква квантификација омогућава одређивање почетног броја транскрипата у узорку, поређењем са стандардном кривом (*Bustin*, 2000). Осим циљних, потребно је пратити и ендogene референтне гене, чија експресија треба да буде стабилна у коришћеној експерименталној поставци, те се уз помоћ њих нормализују резултати добијени за испитивани ген, ради смањивања експерименталних грешака (*Jin* и сар., 2004; *Nestorov* и сар., 2013). *PCR* технике су корисне како за

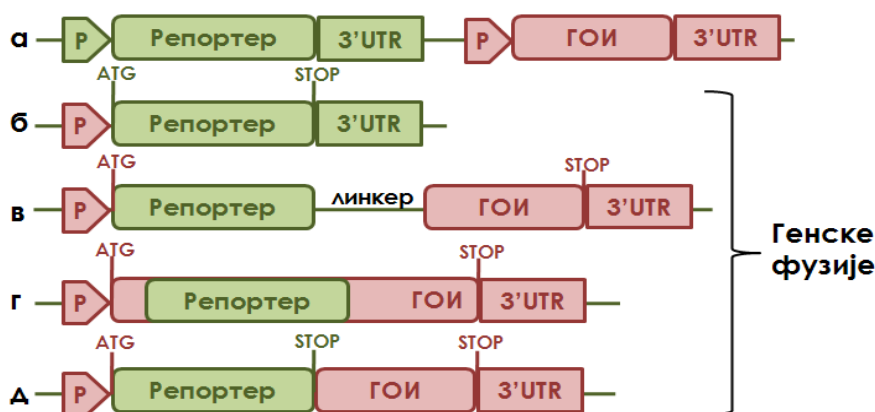
праћење експресије гена ендогено присутних у биљци, тако и за евалуацију успешности експресије интродукованих трансгена или ефеката утишавања гена.

#### **1.4.2 Промоторске фузије и репортер гени**

Зарад визуелизације активности промотора одређеног гена у биљци, конструишу се вектори у којима је испитивани промотор фузионисан са репортер геном, тако да репортер ген долази на место оригиналног гена, чиме се добија транскрипциони репортер (слика 8). На овај начин, могуће је испитивати који делови секвенце узводно од гена су одговорни за, на пример, ткивну специфичност промотора, и колики део промотора је довољан да би он био функционалан. Биљке се затим трансформишу конструисаним векторима, под претпоставком да интродукована фузија промотора и репортера, стављена у одговарајући ћелијски контекст, одговара, по нивоу експресије, временској и ткивној специфичности, оригиналној комбинацији гена и промотора која постоји у биљци (*Alberts и сар.*, 2002). Захваљујући томе, уз помоћ ових фузија могуће је праћење начина експресије посматраног гена, његове локализације у ткивима биљке или ћелијском компартменту, времена експресије у току развића и индуцибилности експресије спољашњим факторима. Будући да је стабилна трансформација биљака дуготрајан и напоран процес, а експресија трансгена често варијабилна међу различитим линијама трансформаната, за брзу евалуацију активности промотора и других регулаторних секвенци погодна је пролазна експресија, а пре свега агроинфилтрација као најједноставнија метода. Ова метода, међутим, не омогућава визуелизацију ткивне специфичности промотора, али се лако комбинује са биотичким и абиотичким третманима, ради утврђивања индуцибилности промотора. Са стандардизацијом процедуре за сваку биљну врсту и сој бактерије, могуће је постићи репродуцибилне резултате са малом варијабилношћу ефикасности трансформације, па је овај есеј погодан и за квантитативну анализу активности промотора (*Yang и сар.*, 2000).

Репортер ген који се користи у промоторским фузијама треба да кодира за фенотип који не постоји код организма домаћина, а његова активност, најчешће у виду флуоресценције или ензиматске реакције, треба да се лако детектује и

квантификује (*Simonović, 2011*). У зависности од тога где су позиционирани на вектору и за шта су фузионисани, репортери се могу користити у сврху провере функционалности конструисаних вектора (на пример агроинфилтрацијом), тестирања ефикасности трансформације приликом разраде протокола трансформације или тестирања новог соја агробактерија, као маркери за визуелну селекцију и потврду трансформаната (када поседују засебни промотор), као репортери активности промотора (фузионисани за промотор) или локализације продукта другог гена (фузионисани за ген) (*Simonović, 2011*).



Слика 8. Типови генских фузија (*Simonović, 2011*). (а) - репортер ген и ген од интереса на истом плазмиду, али са различитим промоторима, (б) - транскрипциони репортер где је испитивани промотор фузионисан са репортер геном, (в) - транслациони репортер где су оба гена под контролом истог промотора, а раздвојени линкером, (г) - транслациона фузија где је секвенца репортера унутар секвенце гена од интереса, тако да оквир читања није промењен, (д) - транслациона фузија гена и репортера са *STOP* кодоном између, тако да се транслацијом преводи само репортер ген.

Познати репортер ген са ензиматском активношћу који се користи у биљкама, је ген за  $\beta$ -глукуронидазу (GUS) - *UidA* ген (*Vitha* и сар., 1995). GUS ензим врши хидролизу различитих  $\beta$ -глукуронида, који том приликом постају обојени или флуоресцирају, па се активност ензима визуелизује спектрофотометријски, флуориметријски или хистохемијски, додатком супстрата у протеински екстракт или на пресек биљног ткива. Хистохемијски есеј (GUS бојење) се користи у сврху потврде трансформације, али и за одређивање ткивне локализације активности промотора. Ово је углавном деструктивна техника која захтева жртвовање материјала, па се не препоручује у раним фазама трансформације (*Cervera, 2004*).



Флуоресцентни репортери омогућавају недеструктивну визуелизацију експресије трансгена. Оригинални флуоресцентни протеини, изоловани из животиња које се одликују биолуминисценцијом, модификовани су у смислу спектралних карактеристика, броја субјединица и величине молекула, ради што лакшег коришћења у различитим експерименталним поставкама. Данас постоји велики број флуоресцентних репортера, са веома разноврсним спектралним карактеристикама, па је могуће и њихово комбиновање.

Најчешће коришћени флуоресцентни маркер је зелени флуоресцентни протеин (енг. *green fluorescent protein*, GFP), изолован из медузе *Aequorea victoria*. Овај мономерни протеин са флуорофором има низ предности (Simonović, 2011): мали је и прости структуре, па је једноставан за клонирање и прављење фузија; флуорофора је стабилна и формира се спонтано; протеин није токсичан за ћелије а стабилан је у различитом ћелијском окружењу; може се визуелизовати недеструктивно, осветљавањем биљке плавом или УВ светлошћу (Halfhill и сар., 2005), али и на нефиксираним пресецима биљног ткива, због чега је погодан као репортер трансформације али и за коришћење у фузијама са промоторима или генима. GFP је доживео бројне модификације и данас су у употреби разни варијетети, а најчешће коришћени је eGFP (енг. *enhanced GFP*). GFP се може детектовати макроскопски, и флуоресцентном и конфокалном микроскопијом, коришћењем одговарајуће комбинације осветљења и филтера који елиминишу другу врсту флуоресценције. Резолуција и осетљивост детекције, међутим, зависе у великој мери од структуре посматраног биљног узорка (De Ruijter и сар., 2003).

За макроскопско посматрање флуоресценције, посебно важно приликом детекције трансформаната, погоднији су неки други флуоресцентни протеини, на пример DsRED, који имају већу релативну јачину флуоресценције у односу на eGFP (<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>). DsRED је флуоресцентни протеин изолован из корала *Discosoma striata*. Овај маркер, за разлику од GFP-а, има тетрамерну структуру, хромофору која спорије сазрева и има тенденцију да формира протеинске агрегате, што отежава његову примену у експериментима генских фузија, али не и као репортера експресије трансгена. Новије варијанте овог маркера превазилазе ове проблеме, али имају и смањени

интензитет флуоресценције. Код примене DsRED-а у биљним ткивима, значајно је мањи проблем аутофлуоресценције биљног ткива у односу на eGFP (Wenck и сар., 2003).

### 1.4.3 Утишавање гена РНК интерференцом

Утишавање гена (енг. *gene silencing*) преко *RNAi* је феномен природно присутан у биљкама и другим организмима, као механизам за спречавање вирусне инфекције, уклањање аберантних транскрипата и регулацију генске експресије. Откриће детаљних механизма који учествују у утишавању, омогућило је његово коришћење у сврху функционалне анализе гена и биотехнолошко унапређивање корисних врста (Jagtap и сар., 2011). Гени се могу утишавати на транскрипционом (енг. *transcriptional gene silencing, TGS*) или на посттранскрипционом нивоу (енг. *posttranscriptional gene silencing, PTGS*) (Kabir и сар., 2008). Утишавање гена на посттранскрипционом нивоу може се вршити уз помоћ *antisense* једноланчане РНК која се спарује са циљаном секвенцом и спречава њену транслацију, или дволанчане РНК, која садржи секвенцу гена у *sense* и *antisense* оријентацији. Механизам који укључује дволанчане РНК (*dsRNA*) се означава као РНК интерференца (*RNAi*) и знатно је ефикаснији у утишавању гена него присуство једноланчаних РНК, па је само неколико молекула по ћелији довољно да изазове снажан ефекат смањења експресије (Kusaba, 2004). *RNAi* доводи до утишавања гена како на посттранскрипционом нивоу, везивањем за *mRNA* што спречава транслацију и индукује деградацију, али и на транскрипционом нивоу, променама на ДНК молекулу - метилацијом и кондензацијом (Simonović, 2011). За разлику од класичног приступа анализи функције гена - добијања мутантних линија биљака за одређени ген, *RNAi* приступ пружа једноставнију, бржу и јефтинију алтернативу за добијање мутантних фенотипова, без промене секвенце гена (Small, 2007). Предности коришћења *RNAi* за одређивање функције гена обухватају високу специфичност према жељеној секвенци, доминантан фенотип без обзира на број копија гена у геному, добијање линија са различитим нивоом утишавања гена, што омогућава проучавање гена чија потпуна инактивација доводи до леталности или драстичних плејотропних ефеката, утишавање сродних гена истовремено базирањем конструката на конзервираним деловима секвенце и

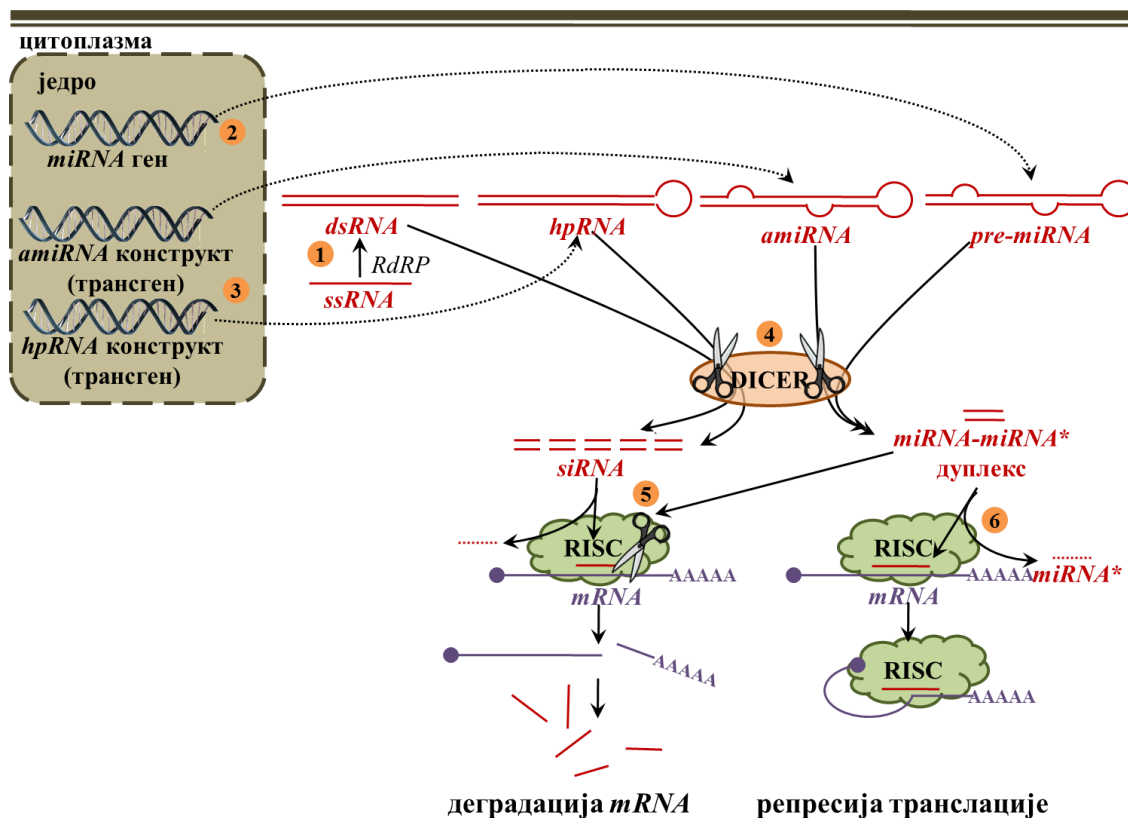
могућност проучавања утишавања гена за слабије истражене врсте, код којих не постоје колекције мутаната (*Small, 2007; Ossowski и сар., 2008*).

Дволанчани молекули РНК који се интродукују у биљку, најчешће се састоје из потпуно комплементарних инверзних секвенци дугих између 300 и 700 нуклеотида у низу раздвојених петљом (*Preuss и Pikaard, 2003*), па по заузимању правилне конформације подсећају на облик укоснице (енг. *hairpin, hpRNA*). Петља може бити насумична секвенца или интрон неког гена.

Осим дужих *hpRNA* молекула, утишавање гена је могуће постићи и коришћењем веома кратких РНК секвенци (најчешће дужине 21 нуклеотид), које се називају микро РНК (*miRNA*). Ове секвенце могу настајати природно, транскрипцијом биљних гена, или бити убачене у биљку трансформацијом. У случају природних *miRNA*, примарни транскрипт гена (*pre-miRNA*) се скраћује и обрађује да заузме специфичну структуру укоснице са испупчењима - неспареним нуклеотидима у дволанчаном делу, док се у случају синтетичких конструката (енг. *artificial micro RNA, amiRNA*), ови нуклеотиди интродукују приликом конструкције трансгена који ће бити експримиран у биљној ћелији. За разлику од животињских, биљне *miRNA* су веома сличне циљној секвенци, са максимално 5 различитих нуклеотида (*Schwab и сар., 2006*), па су веома специфичне и ретко утишавају друге гене.

Механизам обраде природних и синтетичких дволанчаних РНК је сличан (*Kusaba, 2004*). Дужи молекули се скраћују на дволанчане секвенце дуге 21 нуклеотид (енг. *small interfering RNA, siRNA*) уз помоћ DICER-like групе ензима са *RNA*-зном активношћу, док сличан ензим обрађује *miRNA* уклањањем петљи те настаје *miRNA-miRNA\** дуплекс (слика 9). Од дужих *hpRNA* молекула настаје велики број *siRNA* разноврсне секвенце, па оне иницирају деградацију циљаног транскрипта на више места (*Ossowski и сар., 2008*), али су истовремено и извор потенцијалних неспецифичних ефеката - утишавање других, непредвиђених гена. Од *miRNA* настаје само једна специфична секвенца - *miRNA-miRNA\** дуплекс, која по спаривању са циљаном *mRNA*, доводи до сечења секвенце на предвидљивом месту. *Antisense* део *siRNA* дуплекса, односно *miRNA* део микро РНК (водећи ланац), везује се даље за RISC комплекс (енг. *RNA-induced silencing complex*), а

затим спарује са комплементарном *mRNA*, што доводи до деградације дате *mRNA* и утишавања гена.



Слика 9. Шема поједностављеног механизма *RNAi* према *Simonović* (2011), модификована уз сагласност аутора. Посттранскрипционално утишавање гена започиње настанком *dsRNA* (дволанчаних РНК) од аберантних једноланчаних РНК дејством РНК-зависне РНК полимеразе (*RdRP*) (1), транскрипцијом *pre-miRNA* (примарни транскрипт микро РНК гена) са биљних гена (2), или интродукцијом синтетичких *hpRNA* (*hairpin RNA*) и *amiRNA* (вештачких микро РНК) конструката (3). Све ове форме се обрађују *DICER* ензимима (4), где од дужих *dsRNA* настаје више кратких *siRNA* (*small interfering RNA*) (5), док од *miRNA* (микро РНК) настаје само један *miRNA-miRNA\** дуплекс (6). Један ланац бива интегрисан у *RISC* комплекс, који се затим везује за циљну *mRNA*, што код биљака доводи до њене разградње и, у случају неких *miRNA*, инхибиције транслације.

Конструкти који експримирају ове секвенце се могу убацили у ћелију биљке агроинфилтрацијом, што омогућава краткотрајно праћење ефеката утишавања гена (*Watson* и сар., 2005), понекад довољно да се утврди његова функција. Ова техника је корисна за тестирање конструката и секвенци које успешно смањују експресију гена, пре него што се приступи стабилној трансформацији (*Schöb* и сар., 1997). Када је потребно проучавати дуготрајне

ефекте утишавања на фенотип биљке, конструкти се уводе стабилном трансформацијом, а коришћењем јаког конститутивног промотора за експресију трансгена, могуће је постићи веома изражен *knockdown* ефекат на експресију циљаног гена. Коришћењем ткивно специфичног или индуцибилног промотора, *silencing* ефекте је могуће локализовати просторно и временски, што даје флексибилан модел за проучавање експресије и функције гена (*Small, 2007*). *RNAi* показује потенцијал и у метаболичком инжењерству секундарних метаболита, где је, утишавањем једног дела пута, могуће преусмерити биосинтезу ка већој продукцији једињења са корисним својствима (*Mansoor и сар., 2006*).

Трансформација биљака вештачким *miRNA* конструктима све више добија на популарности, у односу на дуге *hpRNA* конструкте, за које је показано да понекад изазивају утишавање неподвижених гена и ширење ефекта *silencing*-а на друге гене (*Schwab и сар., 2006; Small, 2007*). *AmiRNA* су се показале као најуспешније у утишавању биљних гена када имитирају специфичну структуру природних микро РНК. То подразумева потпуну комплементарност циљаној секвенци на позицијама 2-12, уридин и аденин на позицијама 1 и 10, разлику у секвенци *sense* и *antisense* ланца на 5'-крају ради боље селективности ланца и 1 до 3 *missmatch*-а према циљној секвенци на 3' крају, што смањује ширење *silencing* сигнала на друге гене (*Schwab и сар., 2006*). Задржавање ових важних карактеристика омогућено је синтезом *amiRNA* са постојећег прекурсора - природне *miRNA Arabidopsis*-а, где се секвенца која одређује специфичност према транскрипту замењује серијом преклапајућих *PCR* реакција, док остатак секвенце који носи структурне специфичности остаје исти (*Schwab и сар., 2006*). До сада, овим приступом успешно су конструисане *amiRNA* за утишавање неколико гена *Arabidopsis*-а, парадајза и дувана (*Ossowski и сар., 2008*). У односу на *hpRNA* конструкте, *amiRNA* омогућавају бољу контролу над циљаним утишавањем гена - одабиром високо специфичних секвенци које утишавају само један ген, или хомологих секвенци које омогућавају утишавање фамилије гена (*Ossowski и сар., 2008*). Будући да је у питању кратка секвенца, претрагом у базама транскриптома и *EST* секвенци, могуће је предвидети или избећи са високом сигурношћу неспецифичне ефекте. Оваква врста специфичности вероватно омогућава и одвојено утишавање различитих алела гена или сплајсинг варијанти.

## 2. ЦИЉ РАДА

---

Основни циљеви истраживања докторске дисертације су:

- Генетичка трансформација цикорије уз помоћ *A. rhizogenes*; успостављање *hairy root* култура и регенерација трансгених биљака.
- Испитивање утицаја флоралне транзиције на акумулацију гвајанолида у различитим органима трансформисаних и нетрансформисаних регенераната.
- Испитивање утицаја експресије *Rol* гена на акумулацију гвајанолида у различитим органима регенераната.
- Праћење експресије *GAS long*, *GAS short* и *GAO* гена уз помоћ промоторских фузија са репортер геном.
- Испитивање улоге *GAS long* и *GAS short* гена кроз њихово утишавање РНК интерференцом.

## 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

---

### 3.1 Биљни материјал, успостављање *in vitro* културе и услови гајења биљака

За све експерименте трансформације *in vitro*, коришћена је цикорија (*Cichorium intybus* L. варијетет *Blue*). Семена цикорије су набављена од *Samen Mauser, Winterthur*, Швајцарска. За експеримент агроинфилтрације, коришћена је зелена салата (*Lactuca sativa* L. cv. *Olof*). Семена су добијена са Одељења *Plant Breeding PRI* центра Универзитета у *Wageningen*-у.

Семена цикорије су површински стерилисана раствором 20% (v/v) варикине (0,8% активног хлора) у трајању од десет минута, а затим испрана стерилном дестилованом водом пет пута. Стерилисана семена су исклијавана на чврстом *MS* базалном медијуму (*Murashige* и *Skoog*, 1962), без сахарозе а са додатком 0,6% агара. Клијанци су пребачени на *MS* подлогу са 2% сахарозом и гајени до потпуног формирања биљке. Све биљке, укључујући и трансформисане, гајене су на *MS* подлози у присуству 2% сахарозе, у условима дугог дана (16 h светла / 8 h мрака), на температури од  $25 \pm 2$  °C, релативној влажности ваздуха 60 - 70% и флуксу фотона од  $32 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  на нивоу култура.

За проверу функционалности конструктора агроинфилтрацијом, семена салате су посејана у пластичне саксије испуњене земљом, прекривена танким слојем песка, а затим заливена водом. Проклијале биљке су расле у стакленику, у условима дугог дана, при температури од  $25 \pm 2$  °C.

### 3.2 Бактеријске културе и услови гајења бактерија

У овом раду су за конструкцију вектора и за трансформацију биљака коришћени различити сојеви *E. coli*, *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens* (табела 2).

Неколико хранљивих подлога је коришћено за гајење бактерија:

- *LB* подлога је коришћена за гајење свих сојева *E. coli* и *A. tumefaciens*, а садржала је  $10\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  *NaCl*,  $10\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  триптона,  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  екстракта квасца, и 1,5% агара,
- *YEB* подлога је коришћена за гајење свих сојева *A. rhizogenes*, а састојала се од  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  говеђег екстракта,  $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  екстракта квасца,  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  пептона,  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  сахарозе,  $0,5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  *MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O*, и 1,5% агара,
- *SOC*, подлога за регенерацију бактерија после трансформације, садржала је  $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  триптона,  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  екстракта квасца,  $10\text{ mM NaCl}$ ,  $2,5\text{ mM KCl}$ ,  $10\text{ mM MgCl}_2$ ,  $10\text{ mM MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и  $20\text{ mM}$  глукозу.
- Течне *LB* и *YEB* подлоге биле су истог састава као и чврсте подлоге, али без додатка агара. Течне културе су мућкане на шејкеру са  $250\text{ rpm}$ .

За трансформацију цикорије и успостављање *hairy-root* култура коришћени су сојеви *A. rhizogenes MSU440* и *A4M70GUS*. *MSU440* сој садржи *wt* (енг. *wild-type*, дивљи тип) *pRiA4* плазмид (*Limpens* и сар., 2004), док *A4M70GUS* поседује *pRiA4* плазмид са *GUS* ( $\beta$ -глукуронидаза) касетом интегрисаном у  $T_L$  регион, између *RolC* и *RolD* гена (*Tepfer* и *Casse-Delbart*, 1987). *GUS* касета има *UidA* ген, који је контролисан дуплим *35SCaMV* промотором, и завршава се *nos* (нопалин синтаза) сигналом за полиаденилацију. За агроинфилтрацију салате коришћен је сој *A. tumefaciens C58C1* (*Valvekens* и сар., 1988; *Wroblewski* и сар., 2005). У ове сојеве су електропорацијом убачени готови бинарни конструкти. Ради умножавања и селекције правилно клонираних вектора, коришћен је стандардни лабораторијски сој *E. coli XL-1 Blue* (*Stratagene, La Jolla, CA, САД*). Празни *Gateway* вектори су умножавани у *E. coli DB3.1* соју. Детаљи о природи бактеријских сојева и условима гајења су дати у табели 2.

Битни бактеријски сојеви чувани су у виду глицерол штока. Ови штокови су направљени мешањем  $300\ \mu\text{l}$  80% стерилног глицерола са  $700\ \mu\text{l}$  течне преконоћне културе бактерија. Мешавина је вортексована, замрзнута у течном азоту и чувана на  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  до коришћења.



Табела 2: Коришћени сојеви бактерија и услови за њихово гајење. Мапе вектора коришћених у клонирању су приказане у поглављима 3.9.2 и 3.12.1.

бактерија	конструкт или природан плазмид	подлога	коришћени антибиотик	$T \text{ } ^\circ\text{C}$	намена
<i>A. rhizogenes</i> <i>MSU440</i>	<i>pRiA4</i>	<i>LB</i>	-	28	трансформација биљака
<i>A. rhizogenes</i> <i>A4M70GUS</i>	<i>pRiA4GUS</i>	<i>YEB</i>	неомицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	28	трансформација биљака
<i>A. tumefaciens</i> <i>C58C1</i>	<i>pGSFR1161</i>	<i>LB</i>	рифампицин 34 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	28	агроинфилтрација салате
<i>E. coli</i> <i>DB3.1</i>	<i>miniF</i> <i>plasmid</i>	<i>LB</i>	-	37	умножавање <i>Gateway</i> вектора
<i>E. coli</i> <i>DB3.1</i>	<i>pDONR207</i>	<i>LB</i>	гентамицин 15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	<i>Gateway</i> , дозор вектор
<i>E. coli</i> <i>DB3.1</i>	243 <i>pKGW-</i> <i>GRR - C</i>	<i>LB</i>	спектиномицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	<i>Gateway</i> , анализа промотора
<i>E. coli</i> <i>DB3.1</i>	242 <i>pKGW-</i> <i>RR -MGW</i>	<i>LB</i>	спектиномицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	<i>Gateway</i> , оверекспресија, кичма вектора
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	<i>F plasmid</i>	<i>LB</i>	-	37	<i>Stratagene</i> , клонирање
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	365 <i>pENTR</i> <i>p4p1r 35S</i> <i>MCS</i>	<i>LB</i>	канамицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	<i>Gateway</i> , оверекспресија, 35S промотор
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	373 <i>pENTR</i> <i>p2rp3 MCS</i> <i>Stop-Term</i>	<i>LB</i>	канамицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	<i>Gateway</i> , оверекспресија, 35S терминатор
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	<i>pRS300</i>	<i>LB</i>	ампицилин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	вектор за синтезу <i>amiRNA</i>
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	<i>DsRED+</i>	<i>LB</i>	спектиномицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	контролни <i>DsRED</i> вектор
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	<i>GFP+</i>	<i>LB</i>	канамицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	контролни <i>GFP</i> вектор
<i>E. coli</i> <i>XLI</i> <i>Blue</i>	<i>pBIN</i>	<i>LB</i>	канамицин 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	37	контролни празан вектор

Сви сојеви бактерија (осим *A4M70GUS*) и вектори коришћени у клонирању и трансформацијама добијени су из Лабораторије за физиологију биљака, Лабораторије за молекуларну биологију и Одељења за бионауке *PRI* центра *Wageningen* Универзитета, Холандија. *A4M70GUS* сој је добијен са Одељења за физиологију биљака Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић".

Контролни вектор *DsRED+* добијен је од *Dr. René Geurts*, Лабораторије за молекуларну биологију *Wageningen* Универзитета. Вектор је базиран на

*pK7GWIWG2\_II-RedRoot* ([http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pK7GWIWG2\\_II-RedRoot/search/index/](http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pK7GWIWG2_II-RedRoot/search/index/)), бинарном вектору који је модификован исецањем касете за утишавање гена, те садржи DsRED маркер под контролом убиквитинског промотора *Arabidopsis*-а.

Контролни вектори *GFP+* и *pBIN*, добијени су из Лабораторије за физиологију биљака *Wageningen* Универзитета. Вектор *GFP+* се базира на *pBIN* (*Impact*) вектору, а *GFP* маркер је под контролом *35S* промотора (*Ting* и сар., 2013).

### 3.3 ДНК секвенце цикорије

Делови генома цикорије, смештени као ДНК секвенце у *BAC* (*bacterial artificial chromosome*), добијени су од Одељења за бионауке *PRI* центра Универзитета у *Wageningen*-у. *BAC* библиотеке цикорије су претходно конструисане (*Gonthier* и сар., 2010), а *PRI* лабораторија је урадила секвенцирање ДНК смештене у *pIndigoBAC-5* векторима, и утврдила присуство и позицију *GAS* и *P450* гена у њима.

Секвенце *mRNA GAS* гена изолованих из цикорије, коришћене за дизајн *amiRNA* конструктора, присутне су у *GenBank* бази секвенци као *CiGASlo* (*AF497999*) и *CiGASsh* (*AF498000*).

### 3.4 Изолација плазмидне ДНК из бактерија - *mini prep*

Плазмидна ДНК бактерија изолована је помоћу *QIAprep Spin Miniprep Kit* комплета (#27106, *Qiagen*, *Hilden*, Немачка) по упутству произвођача. Бактеријска култура је инокулирана у 5 ml течног *LB* медијума са одговарајућим антибиотиком, и гајена преко ноћи на шејкеру на температури од 28 или 37 °C, зависно од соја бактерија. Преконоћна култура је центрифугирана 7 минута на 10000 *rpm* у стерилним микротубама од 2 ml, течност је одбачена а перципитат ћелија ресуспендован у 250  $\mu$ l пуфера *P1* (са додатом рибонуклеазом А). Након потпуне ресуспензије, узорцима је додато 250  $\mu$ l пуфера *P2* (раствор за лизу ћелија) и течности су измешане окретањем туба неколико пута. Реакција је

прекинута додатком 350  $\mu\text{l}$  пуфера за неутрализацију ( $N_3$ ) и темељним мешањем окретањем туба више пута. Узорци су затим центрифугирани 10 минута на 13000  $\text{rpm}$ . Супернатант је пребачен у колоне за центрифугирање, које су центрифугиране 30  $s$ . Течност је одбачена, а ДНК везана на колони испрана додавањем 0,5  $\text{ml}$  пуфера  $PB$  и центрифугирањем 30  $s$ . Течност је одбачена, а празна колона центрифугирана још 30  $s$  ради потпуног уклањања пуфера. Колона је пребачена у нову микротубу од 1,5  $\text{ml}$ , а ДНК елуирана додатком 50  $\mu\text{l}$  пуфера за елуцију ( $EB$ ) и центрифугирањем 1 минут. Концентрација ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) и чистоћа плазмидне ДНК одређене су спектрофотометријски уз помоћ *NanoDrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД*). Узорци су чувани на  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  до коришћења.

### **3.5      Изолација геномске ДНК биљака *mini-prep* СТАВ методом**

Геномска ДНК биљака изолована је модификованом *СТАВ* методом (*Haymes, 1996*). За изолацију је коришћена мала количина биљног материјала (10 до 40  $\text{mg}$ ), односно један лист младе биљке, који је претходно узоркован у пластичној микротуби од 1,5  $\text{ml}$  и замрзнут у течном азоту. Залеђено ткиво је хомогенизовано расхлађеним пластичним тучком, а потом је додато 400  $\mu\text{l}$  изолационог пуфера (100  $\text{mM}$  *Tris-HCl*,  $\text{pH}$  8, 20  $\text{mM}$  *Na-EDTA*, 1,4  $\text{M}$  *NaCl*, 1% ( $w/v$ ) поливинилпиролон, 2% ( $w/v$ ) цетилтриметиламонијум-бромид и 0,1% ( $v/v$ )  $\beta$ -меркаптоетанол) и хомогенизација је настављена још 5  $s$ , након чега су узорци вортексовани 10  $s$ , па инкубирани 60 минута у воденом купатилу на  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Након инкубације, сваком узорку је додато по 400  $\mu\text{l}$  раствора хлороформ-изоамил алкохол (24:1  $v/v$ ), узорци су вортексовани 30  $s$ , центрифугирани 5 минута на 15000  $g$ , а затим је горња, водена фаза (250-300  $\mu\text{l}$ ) сваког узорка пребачена у нови сет стерилних микротуба. Перципитација ДНК из раствора постигнута је додавањем 600  $\mu\text{l}$  охлађеног апсолутног етанола, и хлађењем узорака 30 минута на  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Узорци су затим центрифугирани 10 минута на 15000  $g$ , при  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Супернатант је одбачен, а ДНК талог испран са 100  $\mu\text{l}$  70% етанола. Након кратког центрифугирања (30  $s$ ), етанол је уклоњен, а перципитат осушен у ламинару под струјом стерилног ваздуха и растворен у 30  $\mu\text{l}$  стерилне воде (вода

за ињекције, Галеника АД, Београд, Србија). Контаминирајућа РНК уклоњена је додавањем  $1 \mu\text{l}$  ( $10 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) рибонуклеазе А (*RNase A*, #EN0531, *Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД*) на  $100 \mu\text{l}$  узорка и инкубацијом на  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  током сат времена. Квалитет изоловане ДНК проверен је електрофорезом на 1% агарозним геловима, а концентрација ДНК у сваком узорку одређена је спектрофотометријски (спектрофотометар: *Agilent 8453, Agilent Technologies, Waldbronn, Немачка*), разблаживањем 1:100 у  $10 \text{ mM Tris-HCl}$  пуферу,  $\text{pH } 7,5$ . Квалитет ДНК потврђен је и на основу односа апсорбанци (А) узорака на  $260$  и  $280 \text{ nm}$ , где су прихватљиве вредности односа  $A_{260/280}$  биле  $1,8 - 2,1$ . Концентрација ДНК одређена је на основу апсорбанце на  $260 \text{ nm}$ , према формули:

$$\text{ДНК концентрација } [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = A_{260} \cdot 50 \cdot 100 \text{ (фактор разблажења)}$$

пошто средњи екстинкциони коефицијент за дволанчану ДНК износи  $0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (*Sambrook и Green, 2012*). ДНК узорци су чувани на  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  до коришћења.

### 3.6 Изолација РНК биљака

РНК из биљака изолована је најпре тризолом, а касније је утврђено да је *CTAB* метод погоднији. Све изолације су извођене у стерилним условима. Коришћене су *RNase-free* микротубе и наставци. Дејонизована вода коришћена за припрему свих раствора третирана је  $0,05\%$  ( $v/v$ ) диетилпирокарбонатом (*DEPC*), иреверзибилним инхибитором рибонуклеаза. Авани, тучкови и кадица за електрофорезу су третирани  $30$  минута са  $3\%$  водоник пероксидом. Авани, тучкови и сви раствори сем фенола су аутоклавирани на  $114 \text{ }^\circ\text{C}$  током  $25$  минута.

Биљни материјал је хомогенизован у течном азоту помоћу авана и тучка, а затим је додаван екстракциони пуфер.

Квалитет добијене РНК проверен је електрофорезом на  $1,5\%$  агарозним геловима, а потврда квалитета и концентрација РНК одређена је спектрофотометријски, после разблажења 1:100 у  $10 \text{ mM Tris-HCl}$  пуферу,  $\text{pH } 7,5$ . Квалитет РНК је одређен на основу односа апсорбанци узорака на  $260$  и  $280 \text{ nm}$ ,

где су прихватљиве вредности односа  $A_{260/280}$  биле 1,8 - 2,1. Концентрација РНК одређена је на основу апсорбанце на 260 nm, према формули:

РНК концентрација [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] =  $A_{260} \cdot 40 \cdot 100$  (фактор разблажења)

пошто средњи екстинкциони коефицијент за једноланчану РНК износи  $0,025 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Sambrook и Green, 2012). РНК узорци су чувани на  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  до коришћења.

### 3.6.1 Изолација РНК тризолом

РНК из биљака цикорије и салате је изолована по упутству произвођача *TRIzol* реагенса (*Invitrogen, Carlsbad, CA, САД*). Тризол реагенс је припремљен у лабораторији.

На сваких 400 - 500 mg хомогенизованог биљног ткива додато је 1 ml тризола (0,8 M гуанидин-тиоцијанат, 0,4 M амонијум-тиоцијанат, 0,1 M натријум-ацетат, pH 5,0, 5% (v/v) глицерол и 38% (v/v) фенол еквилибрисан у *Tris-HCl* пуферу, pH 8, у *DEPC* третираној дејонизованој води) и хомогенизација је настављена до отапања. Хомогенати су пребачени у стерилне микротубе (*RNase-free, Eppendorf, Hamburg, Немачка*), и додато им је по 200  $\mu\text{l}$  раствора хлороформ-изоамил алкохол (24:1, v/v). Узорци су вортексовани 20 s и инкубирани 3 минута на собној температури, а затим центрифугирани 10 минута на 12000 g. Супернатант је пребачен у нови сет микротуба, и додато му је 250  $\mu\text{l}$  изопропанола и 250  $\mu\text{l}$  раствора за перципитацију РНК (0,4 M NaCl, 0,8 M натријум-цитрат, 0,8 M HCl у *DEPC* третираној води). Узорци су потом вортексовани 5 s, инкубирани 30 минута на  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  ради перципитације РНК, а затим центрифугирани 10 минута на 12000 g и  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Супернатант је уклоњен, а перципитат испран са 1 ml 75% етанола. Након 10 минута центрифугирања, етанол је уклоњен а перципитат осушен у ламинару под струјом стерилног ваздуха, а затим растворен у 30  $\mu\text{l}$  *DEPC* воде.

### 3.6.2 Изолација РНК СТАВ методом

РНК из цикорије изолована је употребом СТАВ пуфера (Gasic и сар., 2004). Реагенси су припремљени у лабораторији.

На сваких 400 - 500 mg хомогенизованог биљног ткива додато је 650  $\mu$ l екстракционог пуфера (100 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM Na-EDTA, 2 M NaCl, 0,5 g/l спермидин, 2% (w/v) поливинилпирилодон, 2% (w/v) цетилтриметиламонијум-бромид) и хомогенизација је настављена до отапања. Хомогенати су пребачени у стерилне микротубе (RNase-free, Eppendorf), и додато им је по 15  $\mu$ l  $\beta$ -меркаптоетанола. Узорци су вортексовани 20 s, а затим инкубирани 15 минута у воденом купатилу на 60 °C. Након инкубације, сваком узорку је додато по 650  $\mu$ l раствора хлороформ-изоамил алкохол (24:1 v/v), узорци су вортексовани 20 s, центрифугирани 10 минута на 10000 g и 4 °C, а затим је горња, водена фаза (600  $\mu$ l) сваког узорка пребачена у нови сет микротуба. Узорцима је додато по 600  $\mu$ l раствора хлороформ-изоамил алкохол, и поновљено је вортексовање и центрифугирање. У нове микротубе пребачено је 500  $\mu$ l водене фазе, којој је додато 166  $\mu$ l 7,5 M литијум-хлорида, уз мешање окретањем. Узорци су инкубирани током ноћи на 4 °C. После инкубације, узорци су центрифугирани 45 минута на 12000 g и 4 °C, а супернатант је одбачен. Узорцима је затим додато по 1 ml 70% етанола ради испирања. После центрифугирања од 10 минута, етанол је уклоњен, а перципитат осушен 5 минута у ламинару. РНК је растворена у 100  $\mu$ l DEPC воде, а затим је додато 10  $\mu$ l 3 M натријум-ацетата pH 5,5 и 275  $\mu$ l 70% етанола. Узорци су промешани окретањем и инкубирани на -70 °C преко ноћи. По инкубацији, поновљено је центрифугирање 45 минута на 12000 g и 4 °C, а супернатант је одбачен. Перципитат је поново испран 70% етанолом, и осушен у ламинару. РНК је растворена у 30  $\mu$ l DEPC воде.

### 3.7 Третман дезоксирибонуклеазом

Остаци геномске ДНК уклоњени су из изолата РНК третманом дезоксирибонуклеазом I (DNase I, #EN0521, Fermentas) према упутству произвођача. Састав реакционе смеше је приказан у табели 3.

Након инкубације у *PCR* машини од 30 минута на 37 °C, реакције су прекинуте додатком 1  $\mu\text{l}$  25 mM *EDTA* и додатном инкубацијом на 65 °C током 10 минута. На овај начин добијено је 11  $\mu\text{l}$  третиране РНК по узорку, што је даље коришћено у реакцији реверзне транскрипције.

Табела 3: Састав реакционе смеше за третман дезоксирибонуклеазом.

компонента	запремина [ $\mu\text{l}$ ]
РНК (1 $\mu\text{g}$ )	7,75
<i>DEPC</i> вода	
10x реакциони пуфер	1
<i>DNAse I</i> , 1 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (#EN0521, <i>Fermentas</i> )	1
<i>RiboLock</i> <sup>TM</sup> , 40 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (#EO0381, <i>Fermentas</i> )	0,25
укупна запремина	10

### 3.8 Реверзна транскрипција

Синтеза комплементарне ДНК (*cDNA*) изведена је помоћу *Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* комплекта (#K1622, *Fermentas*) по упутству произвођача. Компоненте реакционе смеше приказане су у табели 4.

Реакције су инкубиране у *PCR* машини 60 минута на 42 °C, а заустављене инкубацијом на 70 °C у трајању од 5 минута, ради деактивације реверзне транскриптазе.

Табела 4: Састав реакционе смеше за реверзну транскрипцију.

компонента	запремина [ $\mu\text{l}$ ]
РНК третирана дезоксирибонуклеазом (1 $\mu\text{g}$ )	11
олиго ( <i>dT</i> ) <sub>18</sub> прајмер или рандом хексамер прајмер	1
5x реакциони пуфер	4
<i>RiboLock</i> <sup>TM</sup> , 20 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	1
10 mM <i>dNTP</i>	2
реверзна транскриптаза, 200 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ( <i>RevertAid</i> <sup>TM</sup> , <i>M-MuLV</i> )	1
укупна запремина	20

### 3.9 PCR амплификације

PCR амплификација је коришћена у различите сврхе током експеримената. Смеше реагенса и програми амплификације су се разликовали у зависности од експеримента, а прајмери коришћени у реакцијама су дати у табелама 6, 11, 12, 15 и 16.

#### 3.9.1 Умножавање делова промотора *Advantage PCR*-ом

Зарад умножавања делова промотора смештених у *BAC*, а у сврху клонирања у векторе, коришћен је *Advantage PCR* (#639206, *Clontech*, *Mountain View*, *CA*, *САД*) комплет. Овај комплет садржи *TITANIUM Taq* ДНК полимеразу, модификовану полимеразу са повећаном осетљивошћу и робусношћу, и мање количине *proofreading* полимеразе за исправљање евентуалних грешака током амплификације. Захваљујући овим компонентама, *Advantage* комплет омогућава веома прецизно умножавање великих фрагмената ДНК, као што су промотори, са високим приносом и специфичношћу. Смеша компоненти за реакцију садржала је стандардне компоненте *Clontech* протокола (табела 5), 6 ng *BAC* ДНК и 0,5  $\mu\text{M}$  специфичне прајмере са накаченим *attB* местима за рекомбинацију (табела 6), у 50  $\mu\text{l}$  реакције. Програм амплификације је дат у табели 7.

Табела 5. Састав реакционе смеше за *Advantage PCR* реакцију.

компонента	запремина [ $\mu\text{l}$ ]
вода	31
10x реакциони пуфер	5
10 mM dNTP	1
прајмер F (5 $\mu\text{M}$ )	5
прајмер R (5 $\mu\text{M}$ )	5
<i>Advantage</i> полимераза	1
<i>BAC</i> ДНК	2
укупна запремина	50



Табела 6. Прајмери коришћени при амплификацији делова промотора. Приказане су дужине ампликона (*bp*). Температура хибридизације за све парове прајмера била је 57 °C. Прајмери су коришћени и за секвенцирање фрагмената промотора и *colony PCR* бактерија за потврду присуства ампликона. Малим словима представљена су додата *attB* места за *Gateway* рекомбинацију, а великим словима приказана је секвенца прајмера специфична за ДНК матрицу.

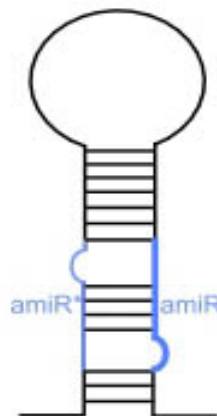
назив	секвенца (5'→3')	(bp)	ДНК матрица
<i>ProGasL_R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctTTTTTCGGATTG GATGATCTTTAATG	1798	105O22 <i>chicory</i> BAC
<i>ProGasL_F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttgTTACCAAACCT GTGGTAGTTTGT	1798	105O22 <i>chicory</i> BAC
<i>ProGasS29_R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctTTCCTGAAGGT GAAAGGATATAG	2008	29O10 <i>chicory</i> BAC
<i>ProGasS29_F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttgGTACAACCGT TGCTTCTG	2008	29O10 <i>chicory</i> BAC
<i>ProGasS83_R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctTTCCTGAAGAT GAAAGGATATAGC	1453	83A09 <i>chicory</i> BAC
<i>ProGasS83_F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttgGACTAATCTC GTCCACATGA	1453	83A09 <i>chicory</i> BAC
<i>ProP450_R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctTGTTGGAATTG GGGAAAAGT	1234	59A14 <i>chicory</i> BAC
<i>ProP450_F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttgAAGTCTGTCC ACATACAAAC	1234	59A14 <i>chicory</i> BAC

Табела 7. Програм инкубације за *Advantage PCR* реакцију.

корак	T (°C)	време	број циклуса
иницијална денатурација	94	1 min	1
денатурација	94	30 s	
хибридизација	57	30 s	30
екстензија	72	2 min	
чување	10	∞	1

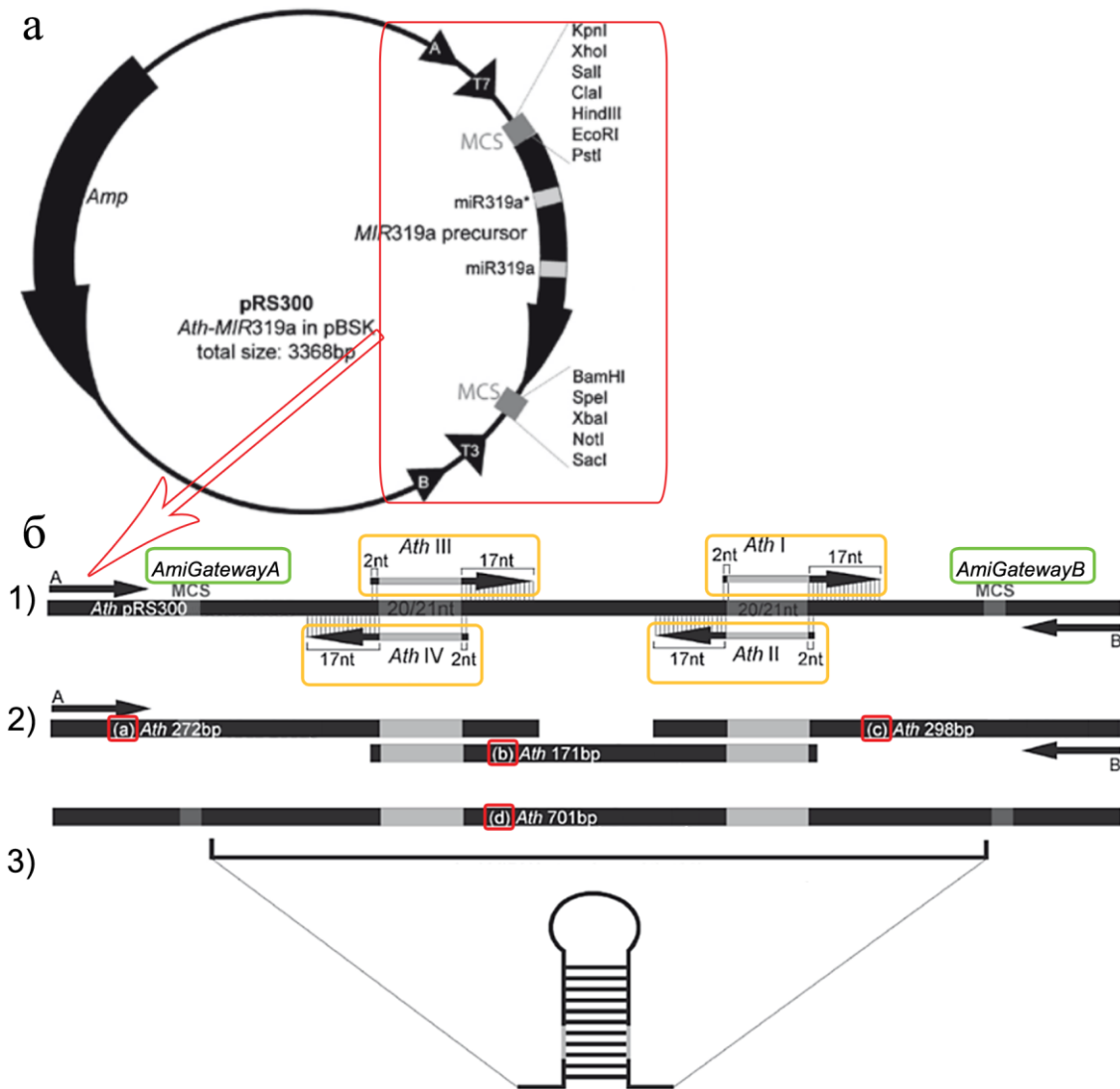
### 3.9.2 Конструкција *amiRNA* фрагмената низом *Phusion PCR* реакција високе тачности

*AmiRNA* су ДНК конструкти намењени за посттранскрипционо утишавање гена у биљци, састављени од секвенце која се специфично везује за *mRNA* одређеног гена, и тиме спречава њену транслацију, и "кичме" конструкта која му помаже да правилно заузме конформацију облика укоснице (слика 10). Конструкт *amiRNA* се прави по угледу на структуру природних микро РНК конструката који изазивају утишавање гена у биљци. Секвенца специфична за транскрипт, дуга 21 *bp*, се у конструкту налази у *sense* и *anti-sense* оријентацији, а садржи и неколико мисмечева који су важни за правилно функционисање конструкта.



Слика 10. *AmiRNA* конструкт у конформацији укоснице. Секвенца специфична за транскрипт у *sense* и *anti-sense* оријентацији приказана је плавом бојом, док је "кичма" конструкта приказана црном. Мисмечеви су приказани као полукружна испупчења.

Синтеза *amiRNA* конструкта се врши амплификацијом са *pRS300* вектора-матрице (слика 11а), који садржи целу природну микро РНК *Arabidopsis*-а (*miR319a stemloop*), чија се специфична секвенца (*miR319a* и *miR319a\**) замењује жељеном секвенцом кроз серију преклапајућих *PCR* реакција, према шеми датој на слици 11б и у табели 8.



Слика 11. (а) - *pRS300* вектор (*Addgene*) за синтезу *amiRNA* са природном микро-РНК *Arabidopsis*-а (*Ath-MIR319a*) према Schwab и сар. (2010). Вектор садржи ген за резистенцију бактерија на ампицилин (*Amp*), вишеструка рестрикциона места - *MCS* (енг. *multiple cloning site*), места везивања *A*, *B*, *T3* и *T7* прајмера и *miR319a stemloop* - микро РНК која се користи као матрица у синтези *amiRNA*. Матрица садржи заменљиву секвенцу у *sense* и *anti-sense* оријентацији, дугу 21 bp (*miR319a* и *miR319a\**, сиво) и "кичму" конструкта (црно). (б) - Увећан део вектора од *A* до *B* и шема *PCR* реакција којима се склапа *amiRNA* прекурсор. 1) - Везивна места прајмера - *A* и *B* су универзални прајмери, док су *AmiGatewayA* и *B* (зелено) дизајнирани у *MCS* делу вектора и модификовани додавањем *attB* места. Прајмери обележени римским бројевима *Ath* I-IV (жуто) представљају групе прајмера са деловима специфичним за вектор (црно) и за секвенцу којом се жели заменити оригинална секвенца (сиво). 2) - Ампликони *a*), *b*), *c*) и *d*) (црвено) који настају у преклапајућим реакцијама (табела 8). 3) - Изглед готовог *amiRNA* конструкта са замењеним секвенцама (сиво).

Табела 8. Комбинација прајмера и ДНК матрица у четири преклапајуће *PCR* реакције *a) - d)* са дужинама ампликона.

реакција	<i>forward</i> прајмер	<i>reverse</i> прајмер	ДНК матрица	дужина ампликона
<i>a)</i>	<i>AmiGatewayA</i>	IV група	<i>pRS3000</i>	155 <i>bp</i>
<i>b)</i>	III група	II група	<i>pRS3000</i>	175 <i>bp</i>
<i>c)</i>	I група	<i>AmiGatewayB</i>	<i>pRS3000</i>	226 <i>bp</i>
<i>d)</i>	<i>AmiGatewayA</i>	<i>AmiGatewayB</i>	ампликони <i>a) + b) + c)</i>	507 <i>bp</i>

За амплификацију *amiRNA* фрагмената преклапајућим *PCR* реакцијама, коришћена је веома прецизна *Phusion High-Fidelity* полимераза (#M0531S, *New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, САД*). Смеша компоненти за реакцију садржала је 200 *ng* ДНК *pRS3000* вектора (слика 11), 0,4  $\mu\text{M}$  прајмере и стандардне компоненте *Biolabs* протокола (табела 9), у 50  $\mu\text{l}$  реакције. Програм амплификације је дат у табели 10.

Табела 9. Састав реакционе смеше за *Phusion PCR* реакцију.

компонента	запремина [ $\mu\text{l}$ ]
вода	27
5x реакциони пуфер	10
10 <i>mM dNTP</i>	1
<i>DMSO</i>	1,5
<i>forward</i> прајмер (5 $\mu\text{M}$ )	4
<i>reverse</i> прајмер (5 $\mu\text{M}$ )	4
<i>Phusion</i> полимераза	0,5
ДНК матрица	2
укупна запремина	50

Табела 10. Програм инкубације за *Phusion PCR* реакције *a)* до *d)*, дате у табели 8.

корак	реакција	T (°C)	време	број циклуса
иницијална денатурација		98	45 s	1
денатурација		98	10 s	
хибридизација	<i>a), c) и d)</i>	55	30 s	30
	<i>b)</i>	52		
екстензија	<i>a), b) и c)</i>	72	15 s	
	<i>d)</i>		40 s	
финална екстензија		72	5 min	1
чување		10	∞	1

Дизајн прајмера уз помоћ којих је могуће амплификовати кичму *amiRNA* са *pRS3000* вектора, заменити специфичну секвенцу на њему жељеном секвенцом, и додати *attB* места за рекомбинацију, обављен је уз помоћ интернет сервиса "*WMD3 - Web app for the automated design of artificial microRNAs*" (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdwmd>).

Метод за одабир прајмера описан је детаљно у *Schwab* и сар. (2010). Секвенце прајмера су дате у табели 11.

### 3.9.1 PCR из бактеријских колонија (*colony PCR*)

За проверу бактеријских колонија након трансформације векторима коришћен је *colony PCR* метод са *SuperTaq* полимеразом (#AM2052, *Applied Biosystems, Foster City, CA, САД*). Бактеријска колонија је стерилном чачкалицом инокулирана у 7  $\mu$ l воде за *PCR*, а томе је додата смеша компоненти која је садржала 0,5  $\mu$ M прајмере (из табела 6, 11 и 12) и стандардне компоненте *Applied Biosystems* протокола (табела 13), у 25  $\mu$ l реакције. Програм амплификације је дат у табели 14. Чачкалица је затим убачена у бочицу са 5 ml течног медијума зарад умножавања тестиране колоније у преконоћној култури.

Табела 11. Секвенце прајмера у групама I-IV за конструкцију *amiRNA* фрагмената. Малим словима представљене су секвенце специфичне за вектор, а великим словима приказане су секвенце којима се замењује оригинална микро-РНК секвенца. \* - прајмери са додатим *attB* местима за *Gateway* рекомбинацију (мала слова) и секвенцом специфичном за вектор (велика слова), коришћени су и за секвенцирање и *colony PCR*.

назив	секвенца (5'→3')
<i>GasL1_ami_I</i>	gaTATCTAAGATATCTTCACCGTctctcttttgattcca
<i>GasL1_ami_II</i>	agACGGTGAAGATATCTTAGATAAtcaaagagaatcaatga
<i>GasL1_ami_III</i>	agACAGTGAAGATATGTTAGATTtcacaggtcgtgatg
<i>GasL1_ami_IV</i>	gaAATCTAACATATCTTCACTGTctacatatattccta
<i>GasL2_ami_I</i>	gaTAATCCATAGGTATATCTCCGctctcttttgattcca
<i>GasL2_ami_II</i>	agCGGAGATATACCTATGGATTAtcaaagagaatcaatga
<i>GasL2_ami_III</i>	agCGAAGATATACCTTTGGATTTtcacaggtcgtgatg
<i>GasL2_ami_IV</i>	gaAAATCCAAAGGTATATCTTCGctacatatattccta
<i>GasS1_ami_I</i>	gaTAATAGTTTGTCAAGCTGCGCctctcttttgattcca
<i>GasS1_ami_II</i>	agGCGCAGCTTGACAAACTATTAAtcaaagagaatcaatga
<i>GasS1_ami_III</i>	agGCACAGCTTGACATACTATTTtcacaggtcgtgatg
<i>GasS1_ami_IV</i>	gaAAATAGTATGTCAAGCTGTGCctacatatattccta
<i>GasS2_ami_I</i>	gaTTCTTAATCTCAATTGTGCAGctctcttttgattcca
<i>GasS2_ami_II</i>	agCTGCACAATTGAGATTAAGAAAtcaaagagaatcaatga
<i>GasS2_ami_III</i>	agCTACACAATTGAGTTTAAGATtcacaggtcgtgatg
<i>GasS2_ami_IV</i>	gaATCTTAAACTCAATTGTGTAGctacatatattccta
<i>GasL&amp;Sm_ami_I</i>	gaTAGGTGTCTGAAAACCTTGGAActctcttttgattcca
<i>GasL&amp;Sm_ami_II</i>	agTTCCAAGTTTTTCAGACACCTAAtcaaagagaatcaatga
<i>GasL&amp;Sm_ami_III</i>	agTTACAAGTTTTTCACACACCTTtcacaggtcgtgatg
<i>GasL&amp;Sm_ami_IV</i>	gaAAGGTGTGTGAAAACCTTGTAActacatatattccta
<i>GasL&amp;Sfuse_ami_I</i>	gaTATCTAAGATATCTTCACCGTTAATAGTTTGTCAAGCTGCGCctctcttttgattcca
<i>GasL&amp;Sfuse_ami_II</i>	agGCGCAGCTTGACAAACTATTAACGGTGAAGATATCTTAGATAtcaaagagaatcaatga
<i>GasL&amp;Sfuse_ami_III</i>	agGCACAGCTTGACATACTATTTACAGTGAAGATATGTTAGATTtcacaggtcgtgatg
<i>GasL&amp;Sfuse_ami_IV</i>	gaAATCTAACATATCTTCACTGTAAATAGTATGTCAAGCTGTGCctacatatattccta
<i>AmiGatewayA*</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttGGAATTCCTGCAGCCCCAAAC
<i>AmiGatewayB*</i>	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcGGCCGCTCTAGAACTAGTGG

Табела 12. Прајмери коришћени у *colony PCR* реакцијама. Дужина ампликона је зависила од тога који инсерт се налази у вектору.

назив	секвенца (5'→3')	(°C)	секвенца према којој су дизајнирани прајмери	намена
<i>pDONR207For</i>	GTTAACGCTAG CATGGATCT	57	<i>pDONR207</i> вектор	<i>colony PCR</i> , секвенцирање
<i>pDONR207Rev</i>	GAGATTTTGAG ACACGGG	57	<i>pDONR207</i> вектор	<i>colony PCR</i> , секвенцирање

Табела 13. Састав реакционе смеше за *colony PCR* реакцију.

компонента	запремина [ $\mu$ l]
вода	10
10x реакциони пуфер	2,5
10 mM dNTP	0,5
<i>forward</i> прајмер (5 $\mu$ M)	2,5
<i>reverse</i> прајмер (5 $\mu$ M)	2,5
<i>SuperTaq</i> полимераза	0,2
вода + колонија	7
укупна запремина	25,2

Табела 14. Програм инкубације за *colony PCR* реакцију. \* - температура зависи од прајмера, дата у табелама 6, 10 и 12, \*\* - 1-2 min зависно од дужине фрагмента.

корак	T (°C)	време	број циклуса
иницијална денатурација	94	1 min	1
денатурација	94	30 s	
хибридизација	*	30 s	30
екстензија	72	**	
финална екстензија	72	5 min	1
чување	10	$\infty$	1

### 3.9.2 *SuperTaq* PCR на плазмидној ДНК за потврду спојева вектора и инсерта

*SuperTaq* PCR на изолованој плазмидној ДНК је коришћен за проверу правилне клонираности вектора амплификацијом секвенци на спојевима вектора и инсерта. Коришћене су исте компоненте и програм инкубације као за *colony PCR* (поглавље 3.9.1), с тим што је уместо бактеријске колоније додато 1  $\mu$ l плазмидне ДНК, и воде укупно 15,8  $\mu$ l, у 25  $\mu$ l реакције. Прајмери за потврду спојева су дати у табели 15.

Табела 15. Прајмери коришћени у *SuperTaq* PCR реакцијама. Приказане су дужине ампликона (*bp*) и температуре хибридизације прајмера. 243\_F\_6355\* прајмер се комбинује са прајмерима обележеним "+" знаком, дајући четири различита продукта чија је дужина зависила од инсерта у вектору.

назив	секвенца (5'→3')	(bp)	(°C)	секвенца према којој су дизајнирани прајмери	намена
242_F_78 13	TGTCGCGTAA CTTAGGACTT	477	58	242 вектор - кичма	потврда споја
242_R_82 89	CATGGTATCGT CACCTTCTC	477	58	35S промотор	потврда споја
242_F_88 87	GAAGGTGGCA CCTACAAATG	1004	58	35S промотор	потврда споја
242_R_98 90	CCCTTATCTGG GAACTACTC	1004	58	35S терминатор	потврда споја
242_F_98 04	GTCCGCAAAA ATCACCAGTC	406	58	35S терминатор	потврда споја
242_R_10 209	GAGGCTGTGG AAGAACAGAA	406	58	242 вектор - кичма	потврда споја
243_F_63 55*	AGCTTGAGCT CTCCATA	+	58	243 вектор - кичма	потврда споја
243_GasL _6642	GACGGTAGCC ATTGGATT	+288	58	<i>ProGasL</i> инсерт	потврда споја
243_GasS 29_6647	GCAGTGGAAG GAGAATATGC	+293	58	<i>ProGasS29</i> инсерт	потврда споја
243_GasS 83_6474	ACGTCCACCG TAAGGTTT	+120	58	<i>ProGasS83</i> инсерт	потврда споја
243_P450_ 6617	ATGCTATGGC GGGTGTAT	+263	58	<i>ProP450</i> инсерт	потврда споја



### 3.9.3 Геномски PCR и RT-PCR из ДНК биљака

Геномски PCR и RT-PCR на ДНК биљака обављен је употребом *Taq DNA Polymerase, Recombinant* (#EP0401, *Fermentas*). Смеша реагенаса је садржала 100 ng геномске ДНК или *cDNA* која одговара 100 ng РНК, 1  $\mu$ M специфичне прајмере (табела 16) и стандардне компоненте према *Fermentas* протоколу (табела 17), у 25  $\mu$ l реакције. Програм амплификације је дат у табели 18.

Табела 16. Прајмери коришћени у *Taq PCR* реакцијама. Приказане су дужине ампликона (*bp*) и температуре хибридизације прајмера. \* - публикувано у *Vinterhalter* и сар. (2011).

назив	секвенца (5'→3')	(bp)	(°C)	секвенца према којој су дизајнирани прајмери	намена
<i>GUS_F</i>	CCTGTAGAA ACCCCAACC CGTG	366	56	<i>E.coli uidA=beta- glucuronidase</i> (GenBank S69414.1)	PCR, RT-PCR
<i>GUS_R</i>	CCCGGCAAT AACATACGG CGTG	366	56	<i>E.coli uidA=beta- glucuronidase</i> (GenBank S69414.1)	PCR, RT-PCR
<i>rolB_F*</i>	AAAGTCTGC TATCATCCTC CTATG	348	61	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain</i> (GenBank K03313),	PCR
<i>rolB_R*</i>	AAAGAAGGT GCAAGCTAC CTCTCT	348	61	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain</i> (GenBank K03313),	PCR
<i>DsRED2_F</i>	TCGTTTGTGG GAGGTGATG TCCA	349	56	<i>cds DsRED</i> са вектора 242 <i>pKGW-RR -MGW</i>	PCR
<i>DsRED2_R</i>	CTTCAAGTG GGAGCGCGT GA	349	56	<i>cds DsRED</i> са вектора 242 <i>pKGW-RR -MGW</i>	PCR
<i>GFP3-F</i>	GTCCATGCC GAGAGTGAT CC	246	59	<i>cds GFP</i> са вектора 243 <i>pKGW-GGRR - C</i>	PCR, RT-PCR
<i>GFP3-R</i>	ATGGCCGAC AAGCAGAAG AA	246	59	<i>cds GFP</i> са вектора 243 <i>pKGW-GGRR - C</i>	PCR, RT-PCR

Табела 17. Састав реакционе смеше за *Taq* PCR реакцију.

компонента	запремина [ $\mu$ l]
вода	15,26
10x реакциони пуфер са $(NH_4)_2SO_4$	2,5
10 mM dNTP	0,5
25 mM $MgCl_2$	2
<i>forward</i> прајмер (15 $\mu$ M)	1,67
<i>reverse</i> прајмер (15 $\mu$ M)	1,67
<i>Taq</i> полимераза	0,4
ДНК матрица	1
укупна запремина	25

Табела 18. Програм инкубације за геномски PCR и PCR реакције после реверзне транскрипције. \* - температура зависи од прајмера, дата у табели 16.

корак	T ( $^{\circ}$ C)	време	број циклуса
иницијална денатурација	95	5 min	1
денатурација	95	30 s	
хибридизација	*	30 s	40
екстензија	72	30 s	
финална екстензија	72	10 min	1
чување	10	$\infty$	1

### 3.10 Агарозна електрофореза нуклеинских киселина

Провера квалитета изоловане ДНК и РНК, и раздвајање продуката PCR реакција обављено је хоризонталном електрофорезом (кадице: *BlueMarine*<sup>TM</sup> 200 или *BlueMarine*<sup>TM</sup> 100, *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg*, Немачка; извор напајања: *Standard Power Pack P25, Biometra*®, *Goettingen*, Немачка) на 1 - 1,5% агарозним геловима у TBE пуферу (89 mM Tris, 89 mM борна киселина, 2 mM EDTA) коме је додат етидијум бромид у финалној концентрацији од 1  $\mu$ M. Електрофорезе су извођене при константном напону од 100 V током 1 - 1,5 сата. У узорке, пре nanoшења на гел, додавана је боја у односу 1:6 (6X DNA Loading Dye, #R0611, *Fermentas*). Након електрофорезе ДНК је визуелизована на UV

трансилуминатору (*ST4 3026-WL/26M, Vilber Lourmat, Torcy, Француска*). За утврђивање величине фрагмената коришћени су ДНК маркери *O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (#SM1153, Fermentas)* или *GeneRuler 50 bp DNA Ladder (#SM0371, Fermentas)*.

### **3.11 Изолација ДНК продуката из гела**

#### **3.11.1 Изолација ДНК продуката из гела за примену у поступцима клонирања**

ДНК продукти амплификовани у *PCR* реакцијама пречишћени су после агарозне електрофорезе уз помоћ *QIAquick Gel Extraction Kit (#28706, Qiagen)* по упутству произвођача. Траке на гелу после електрофорезе су визуелизоване под *UV* светлом и исечене стерилним скалпелом. Комади гела су убачени у стерилне микротубе од  $2\text{ ml}$ , измерени и додата им је три пута већа запремина раствора *QG* ( $100\text{ mg} \sim 100\ \mu\text{l}$ ). Гел је растворен инкубацијом 10 минута на  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , уз повремено вортексовање. Узорцима је затим додата запремина изопропанола еквивалентна почетној количини гела. После краћег мешања, узорак је пребачен у колону за центрифугирање и центрифугиран 1 минут на  $13000\text{ rpm}$ . Течност је одбачена, а колони је додато  $0,5\text{ ml}$  раствора *QG* да би се уклонили сви трагови агарозе. Након једноминутног центрифугирања, ДНК везана на колони испрана је додатком  $0,75\text{ ml}$  раствора *PE*. Центрифугирање је поновљено, течност је одбачена, а празна колона је ради сушења центрифугирана још једном 1 минут. Потом је колона пребачена у нову микротубу од  $1,5\text{ ml}$ , додато је  $35\ \mu\text{l}$  пуфера за елуцију (*EB*), а колона центрифугирана 1 минут. Концентрација ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) и чистоћа ДНК одређени су спектрофотометријски, уз помоћ *NanoDrop 1000*. Узорци су чувани на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до коришћења.

### 3.11.2 Изолација *PCR* ампликона из гела за припрему стандарда за апсолутну квантификацију *qPCR*-ом

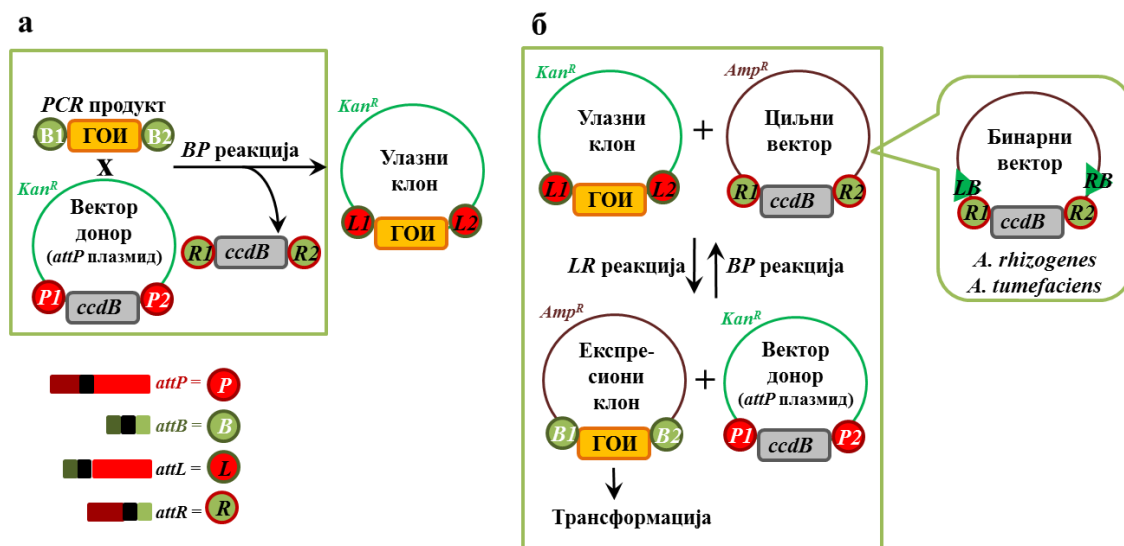
Стандарди за квантитативни *PCR* (*qPCR*) припремљени су пречишћавањем раздвојених *PCR* продуката након гел електрофорезе. Изолација и пречишћавање продуката са гела обављени су коришћењем *GeneJET Gel Extraction Kit* (#K0691, *Fermentas*) комплекта према упутству произвођача. Траке на гелу после електрофорезе су визуелизоване под *UV* светлом и исечене стерилним скалпелом. Комади гела су убачени у стерилне микротубе од 1,5 ml, измерени и додата им је једнака запремина везивног пуфера (*binding buffer*). Гел је растворен инкубацијом у воденом купатилу на 60 °C око 10 минута. Узорцима је затим додата једнака количина изопропанола, вортексовани су 5 s, нанесени на колоне за пречишћавање (*purification column*) и центрифугирани 1 минут на 10000 g. Филтрат је одбачен, а на колоне је додато по 700 µl раствора за испирање (*wash buffer*) и центрифугиране су 1 минут на 10000 g. Филтрат је одбачен и колоне су осушене додатним центрифугирањем 1 минут. ДНК фрагменти су елуирани са колоне додавањем 50 µl елуционог пуфера (*elution buffer*) и центрифугирањем 1 минут на 10000 g. Концентрација ДНК *PCR* фрагмената измерена је спектрофотометријски (поглавље 3.5).

## 3.12 *Gateway*® клонирање

*Gateway*® технологија клонирања је метода клонирања која се базира на место-специфичној рекомбинацији (енг. *site-specific recombination*) присутној код ламбда вируса. Ова техника клонирања представља брз и високоефикасан метод убацивања ДНК секвенци у векторе са различитом наменом (*Hartley* и сар., 2000). Намене обухватају експресију протеина и функционалну анализу, анализу промотора фузијом са маркерима, утишавање гена *anti-sense* секвенцама и друге.

Ламбда систем рекомбинације омогућава специфичну рекомбинацију ламбда бактериофага и интеграцију у хромозом домаћина - бактерије *E.coli*. Ова рекомбинација је високо специфична и конзервативна - не долази до измена у секвенци нуклеотида, што је чини погодном за методе клонирања. Главне

компоненте овог система чине ДНК секвенце (ампликона и вектора) са *att* местима за рекомбинацију, које се рекомбинују у присуству модификованих рекомбинационих протеина бактериофага и *E.coli* (*Clonase*® *Enzyme Mix*, *Invitrogen*). Рекомбинација је специфична између ових места, тако да оријентација ДНК фрагмента после клонирања остаје иста. Клонирање се врши у два корака. У *BP* реакцији (слика 12а), ДНК ампликони ограничени *attB* местима, рекомбинују се са дозор вектором са *attP* местима, и резултат је улазни (*entry*) клон који садржи ДНК инсерг. У овој реакцији настају *attL* места, која омогућавају рекомбинацију *entry* клона са циљним (*destination*) вектором и *attR* местима у *LR* реакцији (слика 12б), када настаје експресиони (*expression*) клон, односно готов вектор са ДНК инсертом. У експресионом клону настају поново *attB* места, па се он може изнова рекомбиновати са дозор вектором, ради премештања инсерта у вектор друге намене, што овај систем чини веома флексибилним. *BP* реакцију каталишу ензим интегграза, пореклом од бактериофага, и *IHF* протеин (енг. *integration host factor*) из *E.coli*. *LR* реакцију каталишу иста два ензима, заједно са ексцизионазом бактериофага.

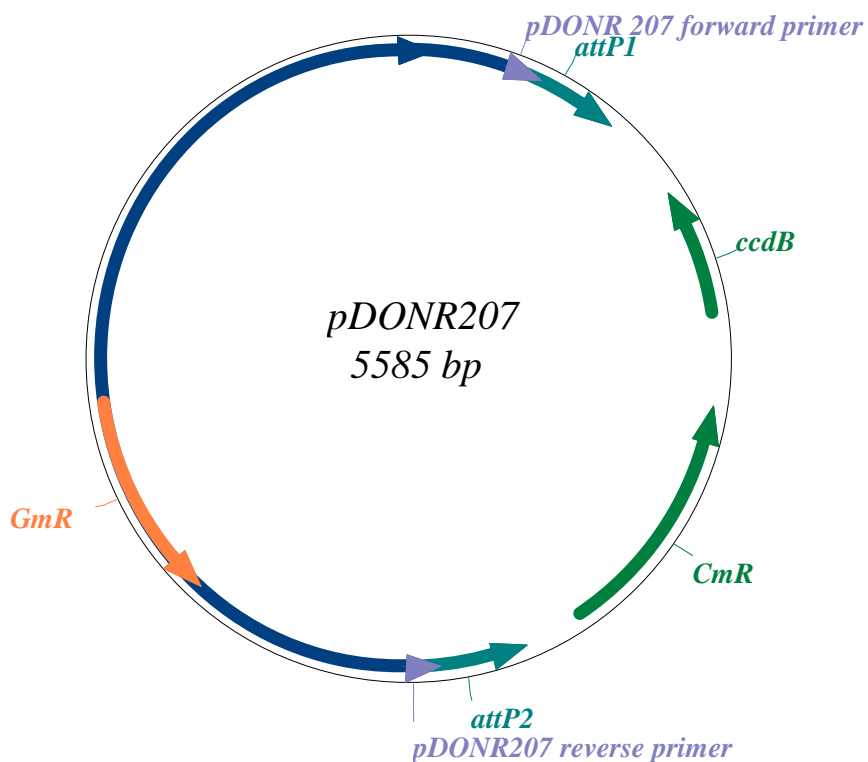


Слика 12. Шема Gateway рекомбинација према *Simonović* (2011) модификована уз сагласност аутора. ГОИ - ген од интереса. (а) - *BP* реакција катализована са *Gateway*® *BP Clonase*® *Enzyme Mix*, (б) - реверзибилне *BP* и *LR* реакције каталисане *Gateway*® *LR Clonase*® *Enzyme mix*-ом. У случају трансформације биљака сојевима агробактерија, циљни вектор је бинарни вектор са Т-ДНК смештену између леве (*LB*) и десне (*RB*) границе.

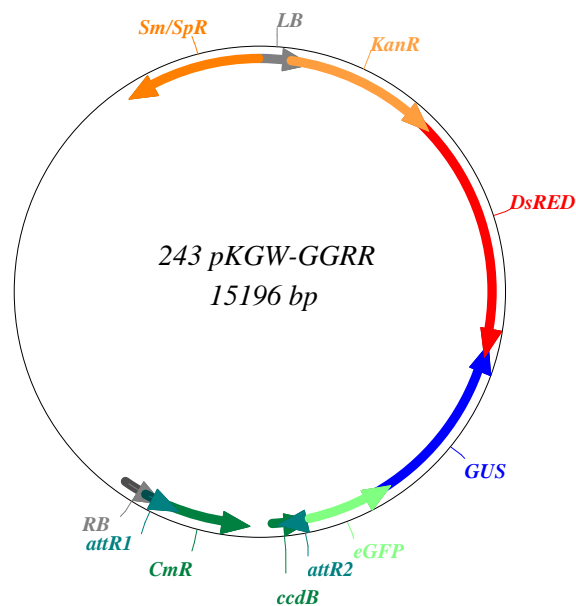
### 3.12.1 Вектори коришћени за *Gateway* клонирање

Празни *Gateway* вектори су умножавани у *E. coli* DB3.1 (табела 2), соју који је отпоран на дејство *ccdB* гена, присутног у празним векторима. *CcdB* ген интерагује са ДНК жиразом код стандардних сојева *E. coli* и спречава њихов раст, али не и раст отпорног соја. Приликом клонирања, овај ген бива уклоњен рекомбинацијом, па *E. coli* трансформисане правилно рекомбинованим конструктима настављају да расту, за разлику од оних које носе неуспешно клониране конструкте (празне векторе).

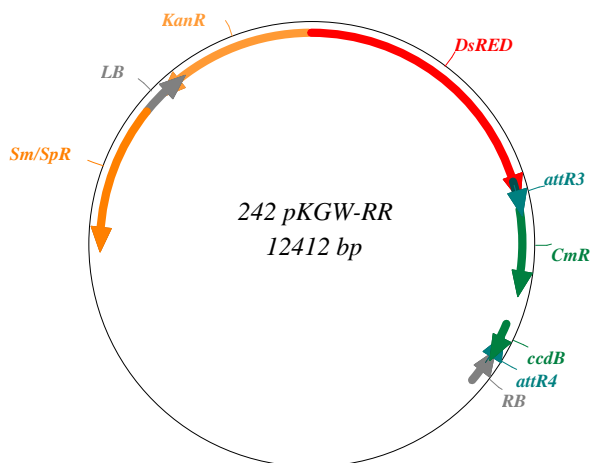
Мапе вектора коришћених у клонирању приказане су на сликама 13-17.



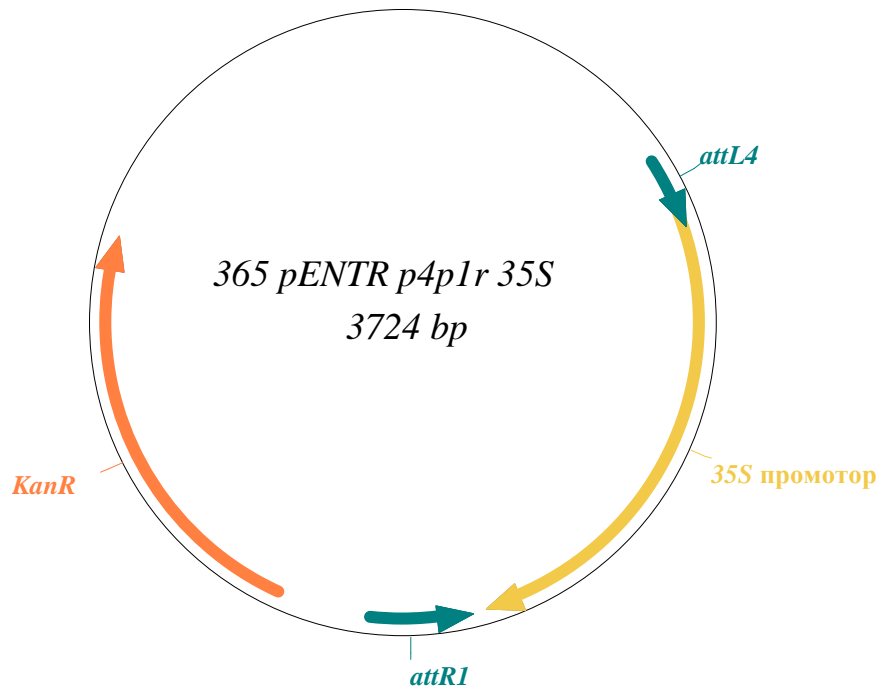
Слика 13: *pDONR207* вектор (*Invitrogen*), донор вектор за прављење *entry* клона. Вектор поседује ген за резистенцију бактерија на гентамицин (*GmR*), *attP* места за рекомбинацију, *ccdB* ген и ген за резистенцију на хлорамфеникол (*CmR*), који се исецају приликом рекомбинације. Назначена су и места везивања *pDONR207* прајмера.



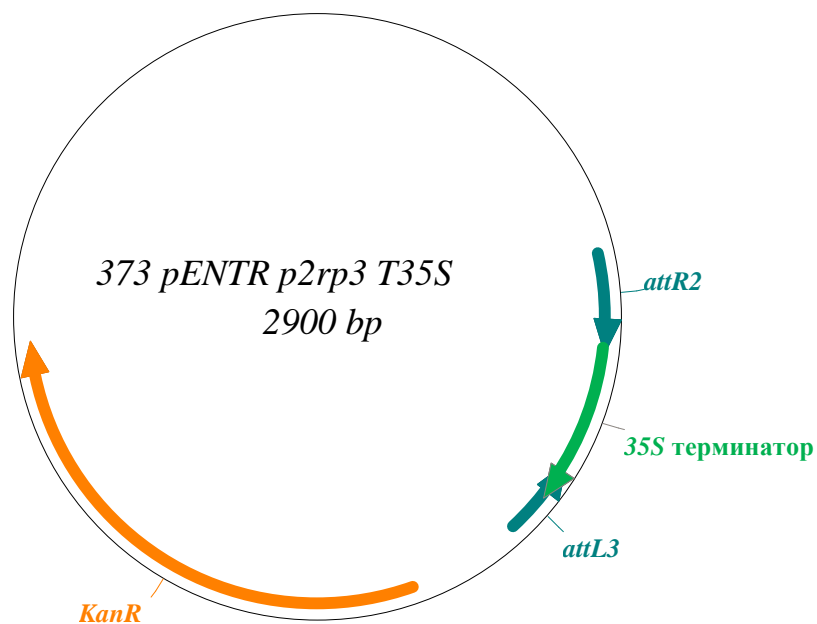
Слика 14: 243 pKGW-GGRR - *C destination* вектор за анализу промотора (*Op den Camp* и сар., 2011). Поседује ген за резистенцију бактерија на стрептомицин или спектиномицин (*Sm/SpR*), ген за резистенцију биљака на канамицин (*KanR*), *attR* места за рекомбинацију и *ccdB* и *CmR* гене, на чије место долази инсерат са промотором. После места за рекомбинацију налазе се гени за маркере за активност промотора - *eGFP* и *GUS*. *DsRED* је ген за црвени флуоресцентни протеин - маркер за селекцију трансформисаних биљних ткива, фузионисан са *AtUBQ10* промотором (убиквитински промотор из *Arabidopsis*-а). *LB* и *RB* представљају леву и десну границу Т-ДНК, која се пребацује у биљке приликом трансформације.



Слика 15: 242 pKGW-RR -*MGW* кичма *destination* вектора за експресију у биљкама (*Op den Camp* и сар., 2011). Вектор поседује ген за резистенцију бактерија на стрептомицин или спектиномицин (*Sm/SpR*), ген за резистенцију биљака на канамицин (*KanR*), *attR* места за рекомбинацију, са *ccdB* и *CmR* генима између. *DsRED* је маркер за селекцију трансформисаних биљних ткива. *LB* и *RB* представљају леву и десну границу Т-ДНК.



Слика 16: 365 *pENTR p4p1r 35S MCS* вектор који носи 35S промотор (*Op den Camp* и сар., 2011). Поседује ген за резистенцију бактерија на канамицин (*KanR*) и *att* места за рекомбинацију.



Слика 17: 373 *pENTR p2rp3 MCS Stop-Term* вектор који носи 35S терминатор (*Op den Camp* и сар., 2011). Поседује ген за резистенцију бактерија на канамицин (*KanR*) и *att* места за рекомбинацију.



### 3.12.2 Gateway BP реакција

Продукти реакција *Advantage PCR* (за промоторе) и *Phusion PCR* (за *amiRNA*), након пречишћавања из гела, клонирани су у *pDONR207* вектор коришћењем *Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix (#11789-013, Invitrogen)*, чиме су добијени улазни клонови.

У реакцији је употребљена еквимоларна концентрација *pDONR207* вектора и *PCR* продукта (*50 fM*), а потребна количина (у *ng*) добијена је према формули:

$$\text{количина ДНК [ng]} = \text{концентрација [fM]} \cdot \text{величина ДНК [bp]} \cdot 660 \cdot 10^{-6}.$$

Даље је из измерене концентрације ДНК [*ng·μl<sup>-1</sup>*] добијено колико *μl* треба употребити у реакцији за дату количину ДНК изражену у *ng*.

ДНК вектора и *PCR* продукт су помешани у израчунатој количини и разблажени у *TE* пуферу (*10 mM Tris- HCl, pH 8.0, 1 mM Na-EDTA*) до запремине од *8 μl* у микротубама од *1,5 ml*. Потом је у сваки узорак додато *2 μl BP Clonase* ензимског микса, узорци су кратко вортексовани (два пута по *2 s*), оборени у центрифуги, и инкубирани *1,5 h* на *25 °C*. Као негативна контрола, постављена је реакција која је садржала само ДНК вектора и *TE* пуфер, без *PCR* продукта и ензимског микса. Реакција рекомбинације је заустављена додавањем *1 μl* раствора протеиназе *K* у сваки узорак и инкубацијом *10* минута на *37 °C*. Продукти *BP* реакције су даље трансформисани у компетентне ћелије *E. coli* (поглавље 3.15) ради селекције и умножавања.

### 3.12.3 Gateway LR реакција

Након селекције, умножавања и потврде секвенцирањем *entry* клонова, инсерт је из *pDONR207* вектора пребачен у *destination* вектор за трансформацију биљака (*243 pKGW-GGRR - C* - за анализу промотора, и *242 pKGW-RR -MGW + 365 pENTR p4p1r 35S MCS + 373 pENTR p2rp3 MCS Stop-Term* - за експресију *amiRNA*), коришћењем *Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (#11791-100, Invitrogen)*, чиме су добијени готови вектори - експресиони клонови, за трансформацију биљака.

У *LR* реакцију је додато по 150 *ng* одговарајућег *entry* клона и *destination* вектора, прерачунато према концентрацији ДНК ( $ng \cdot \mu l^{-1}$ ), а затим разблажено *TE* пуфером до запремине од 8  $\mu l$  у микротубама од 1,5 *ml*. За *three-way Gateway LR* реакцију, у којој се рекомбинују три вектора и *PCR* продукт, употребљено је 20 *fM* вектора 242 *pKGW*, и по 10 *fM* вектора 365 *pENTR*, 373 *pENTR* и одговарајућег *entry* клона. Потребна количина ДНК у *ng*, а затим у  $\mu l$  узорка, добијена је као у поглављу 3.12.2. Затим је у сваки узорак додато 2  $\mu l$  *LR Clonase* ензимског микса, узорци су кратко вортексовани (два пута по 2 *s*), оборени у центрифуги, и инкубирани 1,5 *h* на 25 °C. Као негативна контрола, постављена је реакција која је садржала само ДНК вектора и *TE* пуфер, без *entry* клона и ензимског микса. Реакција рекомбинације је заустављена додавањем 1  $\mu l$  раствора протеиназе К у сваки узорак и инкубацијом 10 минута на 37 °C. Продукти *LR* реакције су даље трансформисани у компетентне ћелије *E. coli* (поглавље 3.15) ради селекције и умножавања.

### **3.13 Потврда интегритета секвенци директним секвенцирањем**

Реакција за припрему узорака за секвенцирање, а ради потврде тачности секвенце приликом клонирања, постављена је уз помоћ *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* пакета (#US81050, *GE Healthcare, Buckinghamshire*, Велика Британија). ДНК намењена за секвенцирање претходно је амплификована *PCR*-ом, продукти су раздвојени на гел електрофорези, пречишћени са гела и измерена им је концентрација. Састав реакционе смеше је приказан у табели 19. Реакције за *forward* и *reverse* прајмер су постављане одвојено. У случају мањих *PCR* продуката, за секвенцирање су коришћени исти прајмери као при амплификацији (поглавље 3.9), док је за велике продукте (преко 500 *bp*), коришћено више прајмера који амплификују фрагменте који се донекле преклапају, а у циљу добијања интегралне секвенце (табела 20). Реакција је обављена инкубацијом у *PCR* машини, по програму из табеле 21. Даље кораке у секвенцирању обављао је комерцијални сервис.

Табела 19: Састав реакционе смеше за секвенцирање.

компонента	запремина [ $\mu$ l]
ДНК (20 ng за фрагменте 500 - 1000 bp, 40 ng за фрагменте преко 1000 bp) дејонизована вода	5
<i>DETT</i> микс	1
<i>DETT</i> пуфер	3
прајмер (5 $\mu$ M)	1
укупна запремина	10

Табела 20: Прајмери коришћени за допунско секвенцирање.

назив прајмера	секвенца (5'→3')	ДНК матрица
<i>seqProGasL_497_F</i>	GCTCCAAAGGTTGTTAGTGA	<i>ProGasL</i> инсерт
<i>seqProGasL_905_F</i>	GTCAAACCTCGCTTTACTCTC	<i>ProGasL</i> инсерт
<i>seqProGasL_622_R</i>	GCAAGAACATTCGTTCCATA	<i>ProGasL</i> инсерт
<i>seqProGasL_1369_R</i>	CATCGATTGGCTTTTGTATG	<i>ProGasL</i> инсерт
<i>seqProGasS29_537_F</i>	CAGAACTACAACCAGATCTA	<i>ProGasS29</i> инсерт
<i>seqProGasS29_992_F</i>	CGCGTGTTTACAATTCATAC	<i>ProGasS29</i> инсерт
<i>seqProGasS29_1501_F</i>	GTTTGTACGGTTCACGTTT	<i>ProGasS29</i> инсерт
<i>seqProGasS29_642_R</i>	TTCCTAACAAGTGGTATCAG	<i>ProGasS29</i> инсерт
<i>seqProGasS29_1124_R</i>	AAAACCTCAATTACACAGCAAAA	<i>ProGasS29</i> инсерт
<i>seqProGasS29_1650_R</i>	TTTCGCTAAGTGCAGGTTAT	<i>ProGasS29</i> инсерт
<i>seqProGasS83_542_F</i>	CACACGTAGAGGATTATACA	<i>ProGasS83</i> инсерт
<i>seqProGasS83_1117_F</i>	GTCATTGTGAATGCCAACAG	<i>ProGasS83</i> инсерт
<i>seqProGasS83_683_R</i>	CAAGAAAAGCTGCACTTATG	<i>ProGasS83</i> инсерт
<i>seqProGasS83_1186_R</i>	TCCGCTAGTTGAGATTTACA	<i>ProGasS83</i> инсерт
<i>seqProP450_434_F</i>	CCCAATGGCCTTAAAATGAT	<i>ProP450</i> инсерт
<i>seqProP450_910_F</i>	CCAATACGGACAAATGTTCT	<i>ProP450</i> инсерт
<i>seqProP450_529_R</i>	TCCGGTTATGACCAATCTTA	<i>ProP450</i> инсерт
<i>seqProP450_1067_R</i>	GTGCCACTAGATTGGTGATT	<i>ProP450</i> инсерт
<i>seqAmiRNA_F</i>	AGCTTCCGACTCATTCATCC	<i>RS300</i> вектор
<i>seqAmiRNA_R</i>	CCAATTTGTCTACCGCATCA	<i>RS300</i> вектор

Табела 21: Програм инкубације за реакцију секвенцирања.

корак	T (°C)	време	број циклуса
иницијална денатурација	94	1 min	1
денатурација	94	20 s	
хибридизација	50	15 s	30
екстензија	60	1 min	
чување	10	∞	1

### 3.14 Добијање компетентних ћелија бактерија

За све кораке клонирања коришћене су хемијски компетентне ћелије *E. coli* *XL1 Blue*, док су за остале намене коришћени електро-компетентни сојеви *E. coli* *DB3.1*, *A. rhizogenes* *A4M70GUS*, *MSU440* и *A. tumefaciens* *C58C1*.

Хемијски компетентне ћелије су добијене инокулацијом једне колоније бактерија у 2 ml течног *LB* медијума. Култура је мешана на шејкеру преко ноћи на 37 °C, а затим разблажена са 200 ml течног *LB* медијума у стерилном ерленмајеру. Мешање је настављено неколико сати, до достизања *OD*<sub>600</sub> (оптичке густине на 600 nm) од 0,25 - 0,3, што је утврђено спектрофотометријски. Култура је затим хлађена на леду 15 минута, а затим центрифугирана 10 минута на 3000 g и 4 °C. Течност је одбачена, а ћелије су ресуспендоване у 30 ml хладног 0,1 M *KCl*, и држане на леду 30 минута. Поновљено је центрифугирање, супернатант одбачен, а ћелије ресуспендоване у 6 ml раствора хладног 0,1 M *KCl* и 15% глицерола. Компетентне ћелије су аликвотиране по 200 µl у стерилне микротубе од 1,5 ml, замрзнуте у течном азоту и држане на -80 °C до коришћења.

Електро-компетентне ћелије су добијене инокулацијом једне бактеријске колоније у 10 ml течног медијума. Културе су мешане на 28 (за агробактерије) или 37 °C ( за *E. coli*) преко ноћи, а затим је 2 - 4 ml припремне културе разблажено са по 50 ml течног медијума. Мешање је настављено до достизања *OD*<sub>600</sub> од 0,5. Културе су центрифугиране 10 минута на 3000 g и 4 °C, течност је одбачена, а ћелије ресуспендоване у 20 ml хладне стерилне дејонизоване воде. Центрифугирање је поновљено, супернатант је уклоњен, а ћелије ресуспендоване

у 10 ml хладне воде. Након поновног центрифугирања, ресуспензија је обављена са 2,5 ml хладне воде, а затим са 600  $\mu$ l стерилног, хладног 10% глицерола. Ћелије су аликвотиране по 30  $\mu$ l у стерилне микротубе од 1,5 ml, замрзнуте у течном азоту и држане на -80 °C до коришћења.

### **3.15 Трансформација бактерија**

#### **3.15.1 Трансформација бактерија топлотним шоком**

Хемијски компетентне ћелије су трансформисане методом топлотног шока. Замрзнуте аликвотиране ћелије су извађене са -80 °C и постепено отапане на леду. У стерилне тубе од 15 ml са заобљеним дном сипано је 5  $\mu$ l продукта *BP* или *LR* реакције, а затим 100  $\mu$ l компетентних ћелија, у стерилним условима. Мешавина је промешана благим лупкањем тубе, а тубе враћене на лед још 30 минута. По истеку времена, тубе су инкубиране 50 s у воденом купатилу на температури од 42 °C, а затим држане на леду 2 минута. Свакој туби је додато 900  $\mu$ l *SOC* медијума загрејаног на собну температуру, а затим су мешане на шејкеру 1 сат на 37 °C ради опоравка ћелија. Суспензија ћелија је затим пребачена у стерилне микротубе од 1,5 ml, центрифугирана 5 минута на 13000 *rpm* и уклоњено је 900  $\mu$ l супернатанта. Ћелије су ресуспендоване у преосталих 100  $\mu$ l и пребачене на Петри кутију са одговарајућом комбинацијом медијума и антибиотика. Суспензија је раширена по површини медијума до потпуног сушења троугластим стакленим инструментом, направљеним од Пастерове пипете, који је претходно стерилисан етанолом и опаљивањем. Петри кутије су обрнуте наопако, причвршћене лепљивом траком и инкубиране на 37 °C током ноћи.

#### **3.15.2 Трансформација бактерија електропорацијом**

Електро-компетентне ћелије су трансформисане електропорацијом. Замрзнуте аликвотиране ћелије су извађене са -80 °C и постепено отапане на леду. На 30  $\mu$ l ћелија додато је 1  $\mu$ l ДНК вектора у стерилним условима, мешавина је благо промешана наставком пипете и инкубирана на леду 30 минута. Коришћене су стерилне кивете за електропорацију од 1 mm или 2 mm (#Z706078 и #Z706086, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД*). Електропоратор је подешен на следећи начин:

волтажа је била 1,8 V за кивете од 1 mm, а 2,5 V за кивете од 2 mm, електрични капацитет је био 250  $\mu F$ , а отпор 200  $\Omega$ . Након инкубације на леду, ћелије су пребачене у кивету за електропорацију, обрисани су евентуални трагови течности са електрода, и кивета је убачена у држач на електропоратору. Примењен је електрични пулс, а потом је у кивету сипано 1 ml SOC медијума загрејаног на собну температуру. Ћелије са медијумом за опоравак су пребачене у стерилну тубу са заобљеним дном, и мешане 1 сат на одговарајућој температури. Суспензија ћелија је затим пребачена у стерилне микротубе од 1,5 ml, центрифугирана 5 минута на 13000 rpm и уклоњено је 950  $\mu l$  супернатанта. Ћелије су ресуспендоване у преосталих 50  $\mu l$ , од чега је 10  $\mu l$  раширено по одговарајућем медијуму на Петри кутији. Петри кутије окренуте наопако су инкубиране на одговарајућој температури преко ноћи.

### **3.16 Агроинфилтрација салате - пролазна трансформација**

Функционалност и интегритет конструката за анализу промотора и утишавање гена, добијених у реакцијама клонирања, проверен је агроинфилтрацијом зелене салате (*L. sativa Olof*). За инфилтрацију су коришћене биљке које су расле у стакленику 3 недеље, а које су развиле 6-7 правих листова. Инфилтрирани су листови 4-6 (гледано од најмлађих до најстаријих листова), тј. листови који још нису достигли пуну величину.

Бактеријске културе *A. tumefaciens C58C1* које су носиле одговарајуће векторе, инокулиране су два дана пре инфилтрације, у 5 ml течног LB медијума са одговарајућим антибиотиком (рифампицин и антибиотик специфичан за вектор) и гајене преко ноћи на 28 °C уз константно мешање на шејкеру. Следећег дана културама је додато 20 ml истог медијума и настављено је гајење. На дан инфилтрације културе су центрифугиране 20 минута на 4000 g, медијум је одбачен а пелет ресуспендован у 10 ml дестиловане воде окретањем на хоризонталној мешалици током сат времена. По ресуспензији, измерена је концентрација бактерија спектрофотометријски, мерењем оптичке густине на 600

*nm* ( $OD_{600}$ ). Затим је подешена оптичка густина од 0,5, разблаживањем са дестилованом водом.

За инфилтрацију листова коришћени су шприцеви запремине 1 ml без игле. Усисано је 1 ml бактеријске културе, а затим је, прислањањем шприца на доњу страну листа, полако убризгаван садржај у ткиво. Бирани су делови листа између нерватуре, а поступак је понављан док се не инфилтрира већи део листа. Све инфилтрације су обављене на по три биљке зелене салате. Биљке су даље гајене у истим условима као и пре инфилтрације.

Пет дана након инфилтрације, инфилтрирани листови су одвојени од биљке и експресија трансгена је проверена *GUS* хистохемијским есејом, флуоресцентном микроскопијом, *real-time PCR* и *UPLC-MS* анализом.

### **3.17 Трансформација цикорије**

#### **3.17.1 Трансформација биљака са *A. rhizogenes* A4M70GUS**

Бактеријске културе *A4M70GUS* - сој без *Gateway* вектора и сојеви који су садржали одговарајуће векторе, засејане су у течну подлогу са одговарајућим антибиотицима и гајене на шејкеру преко ноћи. Добро развијени листови биљака цикорије старих 5-10 недеља су одсечени, постављени у Петри кутију на чврсту *MS* подлогу и боцкани стерилном иглом умоченом у бактеријску културу, дуж лисних нерава. Први трансформисани коренови уочени су после две недеље, а после четири недеље одсечени су са листа и пребачени на чврсту *MS* подлогу са додатком  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  цефотаксима, да би се спречио раст бактерија. Коренови су пасажирани на 1-2 месеца, зависно од брзине раста, а концентрација цефотаксима је постепено смањивана у року од 6 месеци, да би након тог периода коренови били гајени на подлози без антибиотика.

#### **3.17.2 Трансформација биљака са *A. rhizogenes* MSU440**

Трансформација цикорије *MSU440* сојем пробана је боцкањем листова (као за *A4M70GUS* сој), инкубацијом одсечака у течной преконоћној култури бактерија и методом умакања хипокотила у бактеријску суспензију (*hypocotyl dip*). У

*hypo*cotyl dip) методи, коришћени су клијанци стари 10 дана, којима је одсечен корен и регион хипокотила инокулиран преконоћном бактеријском културом. Клијанци су постављени на Петри кутију са чврстом MS подлогом, која је до пола била покривена стерилним филтер папиром, тако да хипокотил належе на филтер папир. Петри кутије су држане у усправном положају, са хипокотилом на доле. Коренови који су се развили на клијанцима су исечени и пребачени на чврсту MS подлогу са додатком  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  цефотаксима, после 10 дана од трансформације. Даље су пасажирани као у трансформацији *A4M70GUS* сојем.

### **3.17.3 Култура трансгених коренова и праћење прираста биомасе**

Раст културе трансформисаних коренова праћен је у течном MS медијуму. По 10 експлантата - 1 *cm* дугих одсечака врха корена, трансформисаних и нетрансформисаних биљака, пребачени су у течну MS подлогу (50 *ml* по ерленмајеру) и држани на шејкеру ради константне аерације. За сваки клон и *wt* биљку постављено је по пет ерленмајера. После четири недеље гајења, коренови су просушени на упијајућем папиру, забележена је свежа маса, а материјал замрзнут у течном азоту, те чуван на  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  за даљу анализу садржаја секундарних метаболита.

### **3.17.4 Регенерација из културе коренова**

Учесталост спонтане регенерације праћена је на одсечцима коренова трансформисаних клонова и нетрансформисаних биљака. Експлантати дуги 1 *cm*, постављени су на Петри кутије са чврстом MS подлогом. За сваки клон и мајку биљку постављено је по шест Петри кутија са по пет експлантата. Просечан број образованих изданака по експлантату корена одређиван је после 5, 8 и 13 недеља.

Регенерисани изданци су исецани са коренова и гајени одвојено на чврстој MS подлози. После месец дана, биљке су узорковане за изолацију ДНК и потврду трансформације. Потврђено трансформисане биљке су гајене до потпуне развијености органа (до три месеца). Већина биљака је спонтано цветала током овог периода. Корен регенерисане биљке је пребачен на Петри кутију са истим



медијумом, а остатак биљке је замрзнут у течном азоту и чуван на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до коришћења. За даље потребе експеримента, нови регенерисани издаци су одсецани са потврђено трансформисаног корена и гајени на чврстој *MS* подлози, у трајању од 10 недеља (за експерименте мерења свеже масе, експресије гена, *LC-MS* анализе и флуоресцентну микроскопију). За све експерименте осим за флуоресцентну микроскопију и *GUS* хистохемијску анализу, биљни материјал је просушен на упијајућем папиру, забележена је свежа маса, а материјал замрзнут у течном азоту, и држан на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до коришћења.

### 3.18 *GUS* хистохемијска анализа

Ради утврђивања експресије *Uida* гена у биљкама цикорије трансформисаним празним сојем *A. rhizogenes*, врхови коренова *wt* и трансформисаних биљака инкубирани су у реакционој смеси која је садржала  $50\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $10\text{ mM Na}_2\text{EDTA}$ ,  $0,5\text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $0,5\text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  и  $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  *X-Gluc* реагенса (#R0851, *Thermo Scientific*),  $12\text{ h}$  на  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , у мраку. Обојеност ткива је визуелизована макроскопски и под стереомикроскопом.

Експресија *Uida* гена у листовима зелене салате инфилтрираним *A. tumefaciens* сојевима који су носили конструисане векторе са промоторима, утврђена је на сличан начин. Листови су, након узорковања, прво испирани  $90\%$  раствором хладног ацетона  $20\text{ минута}$ , затим је ацетон уклоњен а листови испрани два пута реакционом смешом (као горе) без *X-Gluc* реагенса. Листови су затим потопљени у реакциону смешу са *X-Gluc* реагентом и инфилтрирани вакуумом два пута по  $30\text{ s}$  на притиску од  $250\text{ mm Hg}$ . Инкубација је настављена  $12\text{ h}$  на  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , у мраку. Хлорофил је уклоњен након инкубације испирањем у етанолу:  $30\%$  етанол,  $10\text{ минута}$ ,  $70\%$  етанол,  $10\text{ минута}$ ,  $96\%$  етанол,  $10\text{ минута}$  или до обезбојавања. Обојеност ткива је визуелизована макроскопски.

### 3.19 Флуоресцентна макро- и микроскопија

Флуоресценција ткива трансгених и нетрансформисаних биљака посматрана је на макро и микро нивоу. На макро нивоу, флуоресценција је испитивана на недеструктиван начин, уз помоћ неколико система.

За посматрање агроинфилтрираног ткива зелене салате коришћена је флуоресцентна бинокуларна лупа *Zeiss SteREO Discovery.V8* (*Carl Zeiss AG, Oberkochen*, Немачка) са мануелним 8:1 зумом, опремљена *PentaFluar S* флуоресцентним додатком, са сетовима филтера за DsRED и GFP, и *Lumen 200* (*Prior Scientific, Jena*, Немачка) системом за осветљавање са живином лампом. Коришћен је окулар *W-PL 10x/23*, и објектив *Plan S 1.0x FWD 81 mm*. Фотографије су направљене камером *AxioCamMR5* везаном за лупу. Флуоресценција је посматрана 5 и 11 дана након инфилтрације. Ради поређења снимака ткива инфилтрираног различитим конструктима, мерена је средња вредност интензитета осветљености пиксела у деловима ткива где постоји експресија, и нормализована на време експозиције камере у секундама (време експозиције је обрнуто пропорционално јачини флуоресценције) -  $\text{api} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Трансгени коренови посматрани су од времена појаве првих коренова на листовима после трансформације, до вишемесечно субкултурисаних култура коренова старости 2-22 недеље.

Трансформисани коренови посматрани су флуоресцентном бинокуларном лупом *Zeiss SteREO Lumar. V12* (*Zeiss*), опремљеном објективом *NeoLumar S 0.8x*, и окуларом *WPL 10x/23 Br. foc*, са распоном увећања 6,4 до 80 пута. Флуоресцентно осматрање је било омогућено флуоресцентним додатком *HiLite* и *Illuminator HBO 100* системом за осветљавање са живином лампом. За уочавање флуоресценције DsRED-а коришћен је 43 CY3 сет филтера (*Zeiss*), а за GFP флуоресценцију 46 YFP (*Zeiss*). Фотографије су снимљене камером *AxioCamICm1* везаном за лупу.

Конструисан је и LED систем за макро посматрање флуоресценције, по угледу на пројекат "*Using LEDs as a low-cost source to detect GFP and DsRED*" (<http://www.wormbook.org/wbg/articles/volume-18-number-1/using-leds-as-a-low-cost-source-to-detect-gfp-and-dsred-2/>). За екситацију су коришћене LED диоде: зелена (515-530 nm), плава (465-475 nm) и UV-A (395 nm) (слика 18). За уочавање флуоресценције DsRED-а коришћени су црвени *long-pass 600 nm* филтер и *BP 0575-040nm* (*Spectragon, Täby*, Шведска), а GFP-а *BP 507-043nm* (*Spectragon*). Фотографије су снимљене камером *Canon PowerShot A470*. За увеличано

посматрање коришћена је бинокуларна лупа *WILD MPS 28/32 M3Z (Leica, Wetzlar, Немачка)* са окуларом  $6.3\times$  и зум објективом увећања  $0.63\text{--}4\times$ . Средња вредност интензитета флуоресценције одређена је коришћењем додељених нумеричких вредности (поглавље 4.2.3), узимајући вредност 0,2 - најмањи подеок на скали, као грешку мерења. Процент трансформаната који показују одређене правилности (на пример да флуоресценција опада са бројем пасажа корена) одређен је у оквиру групе трансформаната код којих је било могуће поредити дато својство (на пример више пасажу у којима је мерена флуоресценција).



Слика 18. *LED* систем за посматрање флуоресценције. (а) - зелена диода за ексцитацију DsRED-а, црвени филтер за детекцију се налазио испод објектива бинокуларне лупе, (б) - иста комбинација светлости и филтера, у конфигурацији за фотографисање, (в) - плава диода са филтером *BP-0575-040nm*, конфигурација за рутински преглед узорака.

За посматрање ткива великим увећањем коришћени су флуоресцентни и конфокални микроскоп.

Припремати су припремани од свежег ткива корена, листовата и стабла, ручним сечењем танких одсецака жилетом. Посебно танки коренови су калушљени у 6% агарози па затим сечени. Пресеци у постављани у кап 100% глицерола на предметна стакла и покривани покровним стаклом. Припремани су и *squash* препарати корена и младих листовата, притискањем дела ткива у глицеролу између предметног и покровног стакла.

Флуоресцентни инвертни микроскоп *Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss)* је коришћен са објективима *A-Plan 5x/0.12*, *Plan-Apochromat 20x/0.8 M27* и *EC Plan-*

*Neofluar 40x/0.75 M27*. Флуоресценција DsRED-а је визуелизована уз помоћ 43HE филтер сета, а GFP-а коришћењем сета 38. За осветљавање је коришћен систем *Illuminator HBO 100* са живином лампом. Фотографије су направљене камером у боји *AxioCamMR5* и монохроматском камером *AxioCamMR3*.

За конфокалну микроскопију коришћен је инвертни микроскоп *Leica TCS SP5 II Basic Vis System DMI 6000 CS Bino* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Немачка*) са објективима *HCX PL APO CS 20.0x0.70 DRY UV* и *HC PL APO CS2 63.0x1.40 OIL UV*. За екситацију су коришћени ласери: *Argon 488 nm* и *Helium Neon 543 nm*, а флуоресценција је детектована у опсегу: за DsRED 575-600 nm, за GFP 500-525 nm. Фотографије су снимљене монохроматски, а затим псеудообојене према одговарајућем каналу.

### **3.20 Квантитативни PCR**

Квантитативни PCR (*qPCR*) коришћен је за одређивање експресије *Rol* гена код биљака цикорије трансформисаним "празним" сојем *A4*, *GFP* и *GAS* гена код клонова цикорије трансформисаним конструктима са промоторским фузијама и *amiRNA* конструктима, и *LTC* гена салате при агроинфилтрацији *amiRNA* конструктима. Реакције *qPCR*-а постављене су коришћењем *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)* комплекта (#K0222, *Fermentas*) према упутству произвођача. Реакционе смеше запремине 25  $\mu\text{l}$  садржале су количину *cDNA* која одговара 100 ng РНК и 0,3  $\mu\text{M}$  прајмере (табела 22). Амплификација је изведена са *ABI PRISM 7000 SDS* (*Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, САД*). Коришћени су исти програми инкубације као и приликом PCR амплификације за одговарајуће парове прајмера (поглавље 3.9). Специфичност прајмера је потврђена анализом топљења продуката амплификације након инкубације. Стандарди за апсолутну квантификацију су припремљени серијским разблаживањем пречишћених PCR продуката (поглавље 3.11.2) у распону од 10  $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  - 1  $\text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Паралелно са тестираним генима, праћена је и амплификација референтног гена за *18S rRNA* (*Bogdanović и сар., 2013*), за који је потврђена конститутивна експресија.

Табела 22. Прајмери коришћени у квантитативним *PCR* реакцијама. Приказане су дужине ампликона (*bp*) и температуре хибридизације прајмера. \* - публиковано у *Bogdanović* и сар. (2013), \*\* - публиковано у *Bennett* и сар. (2002).

назив	секвенца (5'→3')	(bp)	(°C)	секвенца према којој су дизајнирани прајмери
<b>18S_F*</b>	TGACGGAGAATT AGGGTTCG	190	59	консензус секвенца 18S rRNA
<b>18S_R*</b>	CAATGGATCCTC GTTAAGGG	190	59	консензус секвенца 18S rRNA
<b>rolA1_F</b>	GCGAACGCGAC CATCTTGCT	111	56	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain (GenBank K03313)</i>
<b>rolA1_R</b>	GGTCCCTTCGCA GCAACTCG	111	56	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain (GenBank K03313)</i>
<b>rolB1_F</b>	TGATCAGGCCCC GAGAGTCG	144	56	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain (GenBank K03313)</i>
<b>rolB1_R</b>	TCTGCGGCGAGG GACTGAAA	144	56	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain (GenBank K03313)</i>
<b>rolC1_F</b>	CCACGGGCTGCT GTACCTCT	112	56	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain (GenBank K03313)</i>
<b>rolC1_R</b>	CGGGGGAAGGT TGGTGAGGA	112	56	<i>Ri plasmid A. rhizogenes A4 strain (GenBank K03313)</i>
<b>GFP3-F</b>	GTCCATGCCGAG AGTGATCC	246	59	<i>cds GFP са вектора 243 pKGW-GGRR - C</i>
<b>GFP3-R</b>	ATGGCCGACAA GCAGAAGAA	246	59	<i>cds GFP са вектора 243 pKGW-GGRR - C</i>
<b>GasL2_F</b>	TGTTCTAGTTC CTCCACCGAGT	107	57	<i>Cichorium intybus germacrene A synthase long form mRNA (GenBank AF497999)</i>
<b>GasL2_R</b>	GCGAAAGTCGC AAACATACGCA	107	57	<i>Cichorium intybus germacrene A synthase long form mRNA (GenBank AF497999)</i>
<b>GasS1_F</b>	AGTGGGTATGG GCGAGATGGT	150	57	<i>Cichorium intybus germacrene A synthase short form mRNA (GenBank AF498000)</i>
<b>GasS1_R</b>	CCGGTGGCTGAT TGTCCCCT	150	57	<i>Cichorium intybus germacrene A synthase short form mRNA (GenBank AF498000)</i>
<b>LTC1_F*</b>	GTTGAAGCCAAT GGTACCCTT	462	54	<i>Lactuca sativa germacrene A synthase LTC1 mRNA, complete cds (GenBank AF489964.1)</i>
<b>LTC1_R*</b>	CTTCACATCGTT GGTAATGGA	462	54	<i>Lactuca sativa germacrene A synthase LTC1 mRNA, complete cds (GenBank AF489964.1)</i>
<b>LTC2_F*</b>	GTTGACACTAAT GCCACCATC	456	54	<i>Lactuca sativa germacrene A synthase LTC2 mRNA, complete cds (GenBank AF489965.1)</i>
<b>LTC2_R*</b>	CTTCACATCCGT AGAAATATC	456	54	<i>Lactuca sativa germacrene A synthase LTC2 mRNA, complete cds (GenBank AF489965.1)</i>

### 3.21 Екстракција и LC-MS анализа гвајанолида, њихових оксалата и хлорогене киселине

Садржај слободних гвајанолида (8-деоксилактучина, лактуцина, дихидролактучина, лактупикрина), костунолида и хлорогене киселине, мерен је у нетрансформисаним и биљкама трансформисаним сојем *A4M70GUS*, методом циљане *UPLC-MS* анализе. Замрзнут биљни материјал је самлевен у течном азоту, одмерена је потребна количина ткива (100 mg за корен и 400 mg за надземни део биљке), а једињења су екстрахована метанолом са додатком 0,133% мравље киселине. Узорци су сонификовани 10 минута а затим центрифугирани 5 минута на 21000 g на собној температури. Екстракција је поновљена два пута, супернатанти су спојени, затим разблажени дејонизованом водом у односу 1:1 и профильтрирани *Minisart® RC15 (#17761-R, Sartorius, Goettingen, Немачка)* филтерима. Екстракти су анализирани по методи *Kohlen* и сар. (2011) са модификацијама. Анализе су обављене на *Waters Xevo* тандем масеном спектрометру (*Waters, Milford, Massachusetts, САД*), опремљеним електроспреј јонизационим извором, и везаним за *Acquity UPLC (Waters)* течни хроматограф. За раздвајање је коришћена *Acquity BEH C18* колона (100, 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ; *Waters*). Мобилна фаза се састојала од воде са 0,1% мравље киселине (А) и ацетонитрила (Б). Коришћена је елуција са линеарним градијентом: 0 min, 5% Б; 1,25 min 5% Б, 3,55 min, 50% Б; 7,1 min, 90% Б; 7,85 min 90% Б; 8 min, 5% Б и 9,85 min, 5% Б. Температура колоне је била 50 °C, брзина протока 0,5 ml·min<sup>-1</sup>, а ињектирана је запремина од 10  $\mu\text{l}$ . Масени спектрометар је радио у моду позитивне јонизације, а проток у конусу и десолвацији је био подешен на 50 и 100 l·h<sup>-1</sup>. Температура извора и десолвације била је, 150 и 650 °C, редом, а капиларна волтажа 3,0 kV. *MRM* (енг. *multiple reaction monitoring*) прелази испитиваних једињења су оптимизовани коришћењем *Waters Intellistart* конзоле. Садржај једињења у  $\mu\text{g}$  је прерачунат по g свежe масе ткива.

Брзина продукције секундарних метаболита у течној култури коренова прерачуната је према *Mišić* и сар. (2013) као  $\mu\text{g}$  једињења продукован по дану и запремини културе, у укупној свежој маси културе добијеној после 4 недеље гајења.

Садржај оксалата сесквитерпенских лактона (лактучин-15-оксалата, 8-деоксилактучин-15-оксалата и лактупикрин-15-оксалата) поређен је међу нетрансформисаним биљкама и одговарајућим трансформисаним клоновима, ради испитивања утицаја утишавања *GAS long* и *GAS short* гена на продукцију низводних метаболита. Три наведена једињења су изабрана пошто су са високом сигурношћу идентификована на основу масе, поређењем специфичне *MS/MS* фрагментације са литературним подацима (*Sessa* и сар., 2000; *Abu-Reidah* и сар., 2013) и пошто су била присутна у високој количини код мајки биљака. Изолација једињења обављена је на исти начин као у случају мерења слободних гвајанолида. Хроматографско раздвајање и анализа екстраката је изведена помоћу *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* система (*Thermo Fisher Scientific, Bremen*, Немачка) у чијем се склопу налазила бинарна пумпа, вакуум дегасер, термостат за колоне и ауто-семплер. *UHPLC* системом је управљано помоћу *Chromeleon v2.1* (*Thermo Fisher Scientific*) софтвера. Као детектор је коришћен *triple-quadrupole* масени спектрометар (*TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific*) опремљен са грејаном електро-спреј јонизацијом (*HESI*, енг. *heated electrospray ionization*). Хроматографско раздвајање сесквитерпенских лактона је урађено на *Hypersil gold C18* колони (величина честица: 1,9  $\mu\text{m}$ , димензије: 50x2,1 mm), уз коришћење градијент елуције две мобилне фазе: А) 0,1% мравља киселина у води и Б) ацетонитрил, према следећем програму: 5-20% Б у првих 3 min; 20–40% Б од 3 до 5 min, 40-50% Б од 5 до 7,5 min, 50–60% Б у периоду од 7,5 до 8,5 min, 60–95% Б од 8,5 до 10,5 min, 95% В до 13,5 min, 95% до 5% Б од 13,5 до 14 min, за чим је следила рееквилибрација колоне са 5% Б до 18 min, при протоку од 0,4 ml·min<sup>-1</sup>. За све анализе су коришћени “*MS-grade*” раствори (*Fisher Scientific UK, Leics*, Велика Британија) и дејонизована вода ( $\geq 18 M\Omega$ ). Колона је термостатирана на 30 °C, а ињекциона запремина је била 10  $\mu\text{l}$ . Температура јонске пробе (енг. *vaporizer temperature*) подешена је на 100 °C, док су параметри *HESI* пробе износили: напон -3500 V; притисак носећег гаса (*N<sub>2</sub>*) 30 AU (арбитрарне јединице; енг. *arbitrary units*); притисак гаса у јонском извору 0 AU; притисак ауксиларног гаса 7 AU; капиларна температура 275 °C, компензација капиларе (енг. *capillary offset*) -35 V, компензација јонских сочива (енг. *tube lens offset*) -65 V. У квалитативној анализи сесквитерпенских лактона су коришћени *FS* (енг. *full scan*), *PrIS* (енг. *product ion*

*scan*) и *PIS* (енг. *parent ion scan*) модови скенирања, док је за квантитативну анализу коришћен *MRM* мод. Спектри масених прелаза добијени су коришћењем колизионе енергије (*CE* енг. *collision energy*) 20 eV уз 10 eV "energy ramp" (20 ± 10 eV). За *MRM* детекцију и праћење у негативном моду коришћени су следећи масени прелази: 8-деоксилактучин-15-оксалат  $m/z$  331  $[M-H]^- \rightarrow m/z$  259 уз колизиону енергију од 10 eV и  $m/z$  331  $\rightarrow m/z$  215 уз *CE* 15 eV, за лактуцин-15-оксалат  $m/z$  347  $[M-H]^- \rightarrow m/z$  275 уз *CE* 15 eV и  $m/z$  347  $\rightarrow m/z$  213 уз *CE* 15 eV, док су за лактупикрин-15-оксалат коришћени  $m/z$  481  $\rightarrow m/z$  242 уз *CE* 15 eV и  $m/z$  481  $\rightarrow m/z$  213 уз *CE* 20 eV. Наведени масени прелази су изабрани пошто су били високог интензитета и специфичности. Приликом свих експеримената у којима је индукована фрагментација молекула, коришћен је притисак *Ar* гаса од 1,5 *mTorr* у колизионој ћелији. За квантификацију је коришћена површина пикова одговарајућих *MRM* прелаза. Услед недостатка аутентичних стандарда за квантификацију, спроведена је релативна псеудо-квантификација. Наиме, за свако од праћених једињења изабран је узорак са највећим интензитетом пика, тај узорак је серијски разблажен 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 пута раствором који је садржао 50% воде, 50% *MeOH* и 0,067% *HCOOH*. На основу интензитета *MRM* пикова у одговарајућим разблажењима конструисане су псеудо калибрационе криве на основу којих је одређена релативна количина анализираних једињења у осталим узорцима. Линерна регресиона анализа овако добијених калибрационих кривих је показала одличну линеарност уз корелационе коефицијенте од  $r^2 > 0,98$  (0,9879 за лактуцин-15-оксалат, 0,9875 за 8-деоксилактучин-15-оксалат и 0,9892 за лактупикрин-15-оксалат). Резултати су представљени релативно у односу на одговарајућу мајку биљку. *Xcalibur v2.1* софтвер је коришћен за контролу *MS/MS* инструмента, прикупљање и обраду података.

### **3.22 Статистичка и биоинформатичка обрада података и коришћени програми**

Већина експеримената, укључујући мерење свеже масе, анализе експресије гена и садржаја једињења, постављени су барем у три биолошка понављања. Статистичке анализе су обављене уз помоћ софтвера *OriginPro 8* (*OriginLab*



Corporation, Northampton, MA, САД) и *Statistica 8* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, САД). Средње вредности су поређене ANOVA тестом праћеним Fisher LSD posthoc тестом подразумевајући  $p < 0,05$ , или Студентовим *t*-тестом подразумевајући  $p < 0,05$ .

Слике добијених гелова анализирани су уз помоћ програма *TotalLab120 v2008.01* (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, Велика Британија).

Прајмери коришћени у клонирању и секвенцирању дизајнирани су програмом *Clone Suit Manager 9* (Sci-Ed Software, Cary, NC, САД). За дизајн осталих прајмера и проверу специфичности, коришћена је интернет апликација *NCBI Primer Blast* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

Поређење секвенци је обављено програмима *DNA Baser v2* (Heracle BioSoft S.R.L., Pitesti, Румунија) и *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.4* (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, САД).

За претрагу теоријских везивних места транскрипционих фактора у секвенцама промотора коришћена је интернет база *TFSEARCH* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Преглед мапа вектора и клонирање *in silico* урађено је у слободном програму *ApE - A Plasmid Editor v2.0.30* (M. Wayne Davis).

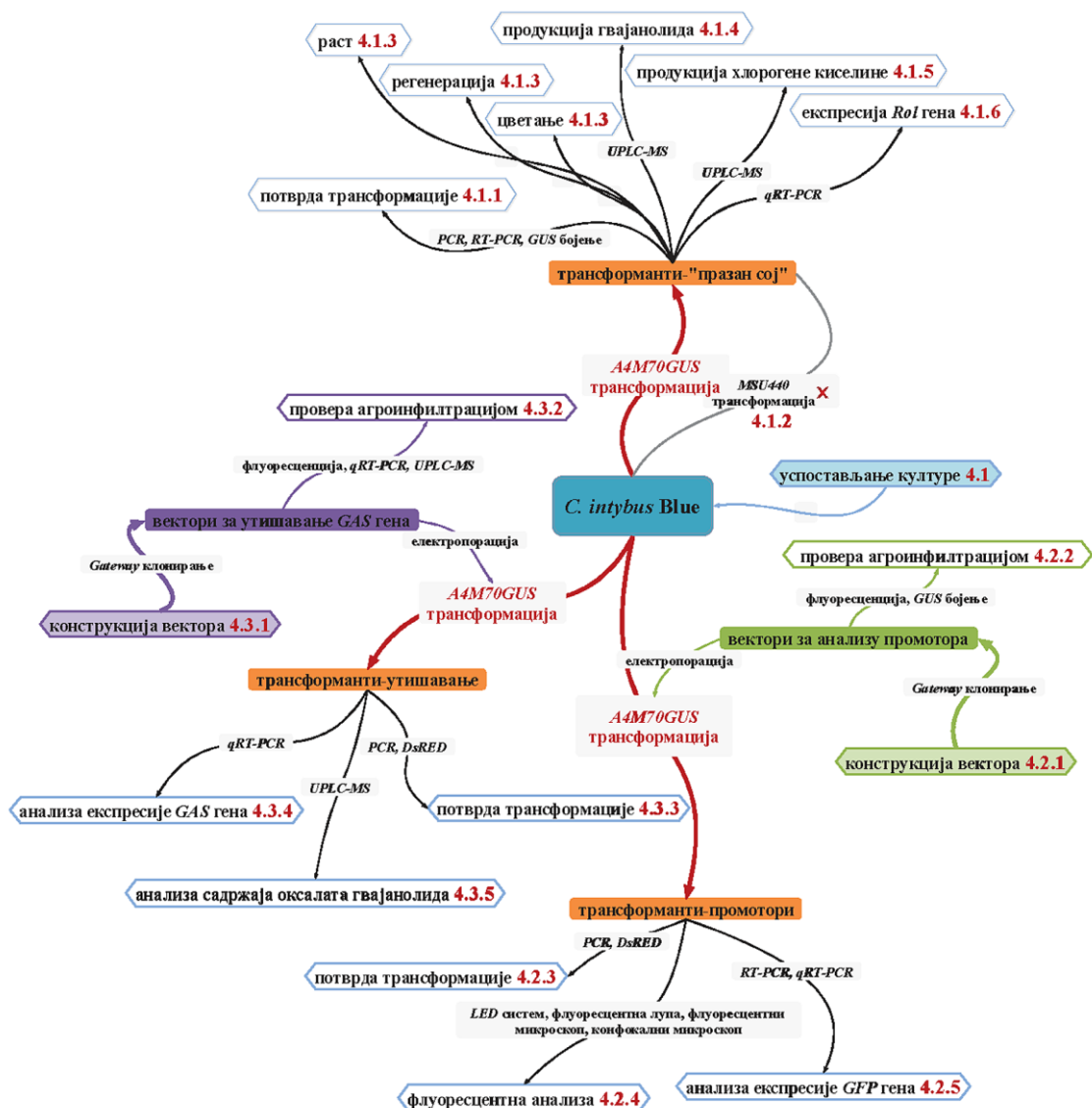
Резултати добијени помоћу *Zeiss* лупа и микроскопа анализирани су програмом *AxioVision 4.8 Rel.* Резултати са конфокалног микроскопа анализирани су програмом *LAS AF Lite 2.6.0* (Leica Microsystems). За мерење средње вредности интензитета пиксела коришћен је слободан програм *ImageJ 1.48v* (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Графици екситације и емисије флуоресцентних протеина, у комбинацији са екситационим извором и емисионим филтерима, направљени су уз помоћ интернет апликација *BD Fluorescence Spectrum Viewer* ([http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)) и *Zeiss*

Interactive Fluorescence Dye and Filter Database (<https://www.microshop.zeiss.com/?s=1245654263e7f70&l=en&p=us&f=f&a=i>).

Резултати експресије гена добијени *qPCR* методом, анализирани су програмом *7000 System SDS Software v1.2*.

### 3.23 Шема тока експеримента



Слика 19. Шема коришћеног биљног материјала, употребљених метода и обављених анализа, са назначеним поглављима резултата.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

---

### 4.1 Успостављање *in vitro* културе цикорије и протокола за генетичку трансформацију

*In vitro* култура *C. intybus Blue* је успостављена из семена. Након површинске стерилизације, семена су исклијала на *MS* подлози током 10-15 дана. Клијанци су даље гајени на истој подлози са 2% сахарозом. У току 1-2 месеца развиле су се потпуно формиране биљке, са добро развијеним коренским системом и крупним листовима организованим у розету. Неке биљке су спонтано цветале током 2-3 месеца гајења, док је већина остала у вегетативном стадијуму. Након шест месеци гајења, уз месечно пасажирање изданака, око 70% биљака је процветало. Најефикаснији систем за умножавање добијених *in vitro* култура био је преко културе корена одсеченог са биљке у развојној фази розете, на коме су се, спонтано или послешено повредом, формирали изданци у току 1-2 месеца (слика 20). Регенерисани изданци су одсечани и гајени до образовања биљке са кореном. Експлантати изданака су ефикасно умножавани док су биљке биле у вегетативној фази, и честа је била појава адвентивних пупољака у основи експлантата. Са преласком у фазу цветања, међутим, одсечци изданака су углавном губили регенеративни потенцијал и било је тешко добити комплетно регенерисане биљке са развијеним кореном. Корен одсечен са цветале биљке је такође било теже пропагирати од корена биљке у стадијуму розете. Због тога, за потребе експеримената, регенерисани изданци су одвајани са културе корена и гајени засебно до формирања целе биљке.

За генетичку трансформацију цикорије и добијање *hairy-root* култура, тестирана су два соја *A. rhizogenes* - *A4M70GUS* и *MSU440*.



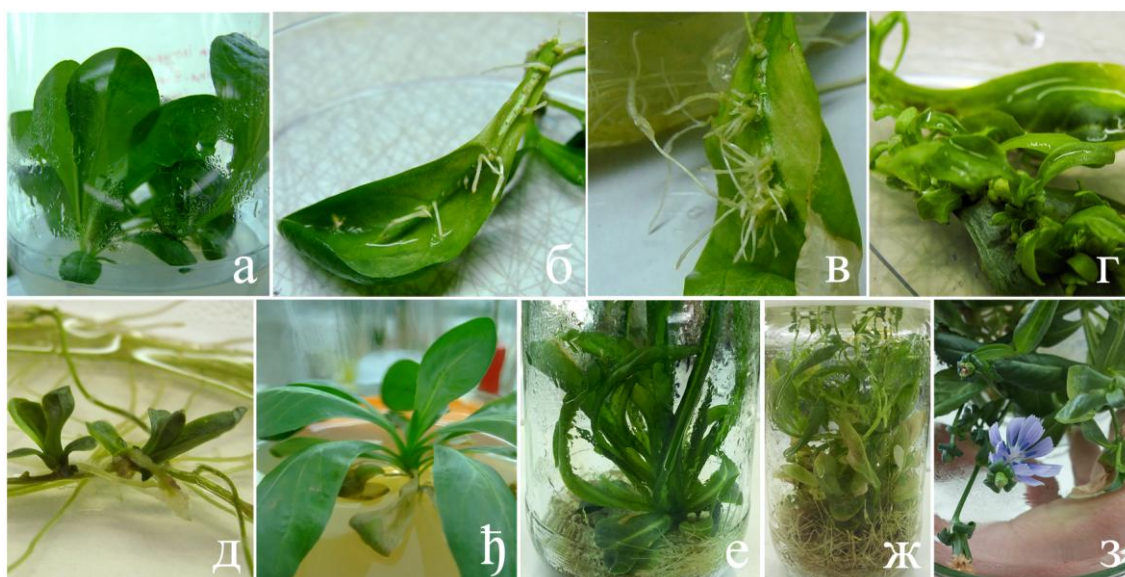
Слика 20. Шематски приказ регенерације цикорије у култури *in vitro*.

#### 4.1.1 Трансформација сојем *A4M70GUS*

Иницијални експерименти подразумевали су трансформацију цикорије "празним" сојем *A. rhizogenes* - који је садржао само *pRiA4* плазмид са интегрисаним *Uida* геном, без конструисаних бинарних вектора, а у сврху провере могућности трансформације овим сојем, квалитета и броја добијених трансформаната, и праћења утицаја трансформације и експресије *Rol* гена на акумулацију гвајанолида.

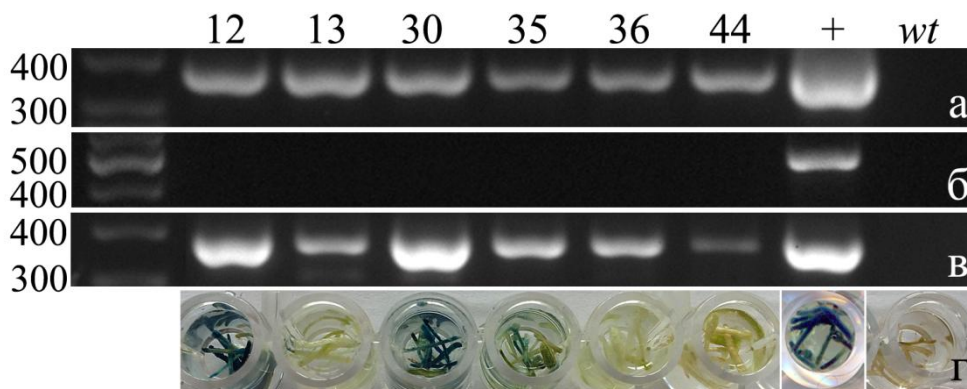
Биљке су трансформисане боцкањем одсечених листова иглом умоченом у бактеријску културу. Од 15 биљака чији су листови одсецани, њих 10 је развило коренове. Први коренови су се појавили на листовима већ након 10 дана (слика 21б), а одсечени су након четири недеље. На листовима инокулисаним

бактеријском културом образовали су се, осим коренова, и изданци. *PCR* анализом је показано да ови пупољци нису били трансформисани и они нису даље анализирани. Контролне биљке, боцкане стерилном иглом, на месту повреде су развијале искључиво изданке (слика 21г). Од 47 иницијалних клонова, њих девет је преживело првих шест месеци култивације и наставило раст. У току тог периода, у култури шест клонова су се спонтано образовали изданци (слика 21д), који су одсецани са коренова и гајени самостално на *MS* подлози са 2% сахарозом. Регенерисани изданци су развијали надземни део углавном нормалне морфологије, док су коренови били знатно бројнији и више гранати него код нетрансформисаних биљака (слика 21е и ж). Трансформисани изданци су раније прелазили у фазу цветања, у односу на нетрансформисане, па је тако после два месеца половина клонова цветала, а после четири месеца пет од шест клонова је развило цветне изданке. Клонови су се међусобно разликовали у брзини цветања, коју су задржавали кроз вишеструке пасаже.



Слика 21. Трансформација цикорије и регенерација трансгених биљака: (а) изданци стари 10 недеља, пре инокулације, (б) *HR* на листовима 10 дана по трансформацији, (в) добро развијени *HR* пре одсецања, (г) изданци на месту повреде контролних биљака, (д) спонтана регенерација изданка у *HR* културама, (ђ) изглед нетрансформисане биљке у стадијуму розете, (е) трансформисана биљка у стадијуму розете, (ж) трансформисана цветала биљка, (з) изглед цвета трансформисане биљке.

Регенерисане биљке сваког клона су гајене засебно 10 недеља, након чега су тестиране на присуство и експресију трансгена - *UidA* гена амплификованог из геномске ДНК, експресију *UidA* транскрипта у листовима детектовану *RT-PCR*-ом, и активност GUS протеина детектовану хистохемијским бојењем (слика 22). Свих шест клонова, добијених спонтаном регенерацијом са *HR*, потврђени су као трансформисани, и сви су експримирали GUS у листу и корену, клонови 12 и 30 највећим интензитетом. Одсуством амплификације *virD1* бактеријског гена показано је да је експресија GUS последица интеграције трансгена у биљни геном, а не последица контаминације бактеријама. Од шест клонова код којих је потврђена трансформација, три су изабрана за даља истраживања, на основу прелиминарне карактеризације растења и цветања.



Слика 22. Потврда трансформације шест *HR* клонова обележених бројевима 12 до 44: геномска ДНК листа регенерисаних биљака је коришћена за амплификацију *UidA* гена ради потврде интеграције трансгена у биљни геном (а) и *VirD1* гена ради потврде да сигнал не потиче од бактеријске контаминације (б). Експресија *UidA* гена је потврђена *RT-PCR*-ом на РНК изолованој из листова (в) и GUS хистохемијским бојењем коренова регенерисаних биљака (г). Као позитивна контрола у *PCR* реакцијама коришћена је бактеријска ДНК (+), док је у бојењу коришћен корен претходно потврђен да експримира GUS. *Wt* - нетрансформисана биљка као негативна контрола.

#### 4.1.2 Трансформација сојем *MSU440*

*MSU440* је сој који садржи *pRiA4* плазмид, и не садржи маркере за трансформацију, те је погодан за употребу са бинарним плазмидима који садрже маркере, као што су GUS и GFP.

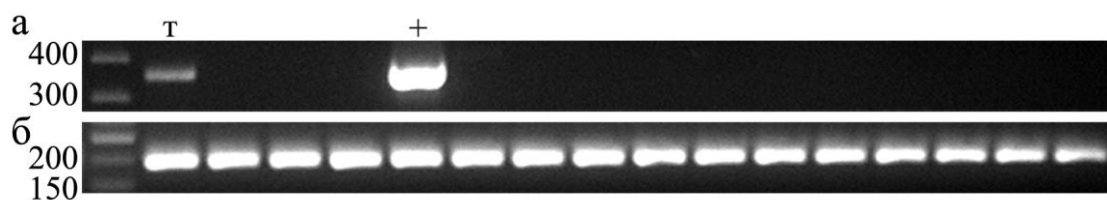
За трансформацију овим сојем, испробана су три протокола. При трансформацији боцкањем листова дуж лисног нерва на клијанцима старим 12 дана, и биљкама старим 3 и 6 недеља, као и инкубацији одсецака листова биљака старих 1-2 месеца у течной бактеријској култури, није дошло до развијања *HR* коренова, те трансформација није била успешна. Применом *hypocotyl dip* методе на клијанцима старим 12 дана развили су се коренови на месту пресека хипокотила. Развијени коренови су одсечени са биљке и даље гајени одвојено на подлози са цефотаксимом (слика 23а). Након месец дана, на одсеченим кореновима су се спонтано формирали изданци (слика 23б), који су одвојени и гајени засебно на *MS* подлози са 2% сахарозом, ради провере трансгене природе.



Слика 23. *Hypocotyl dip* трансформација *MSU440* сојем. (а) - коренови формиран на инокулисаном хипокотилу, (б) - спонтана регенерација изданака на одвојеном корену.

Од 150 инокулисаних клијанаца добијено је 323 иницијална клона, од чега је 129 преживело култивацију у периоду од шест месеци, а 65 спонтано регенерисало потенцијално трансгене изданке. По три или више одвојених изданака сваког од ових клонова тестирано је геномским *PCR*-ом на присуство трансгена, и од свих тестираних изданака, само код једног је детектовано присуство бактеријског гена *rolB* (слика 24). Све тестиране биљке имале су очекивану амплификацију *18S rRNA* гена, што је сугерисало да је изолација ДНК била успешна. Закључено је да сој *MSU440* није погодан за трансформацију

цикорије, будући да је ефикасност трансформације била веома ниска, и није коришћен у даљим експериментима.



Слика 24. Геномски *PCR* једног броја клонова добијених инокулацијом са *MSU440*. (а) амплификација *rolB* гена и (б) амплификација *18S* гена. "+" је биљка трансформисана *A4M70GUS* сојем, претходно потврђена, а "Т" једини трансформисани клон међу тестираним.

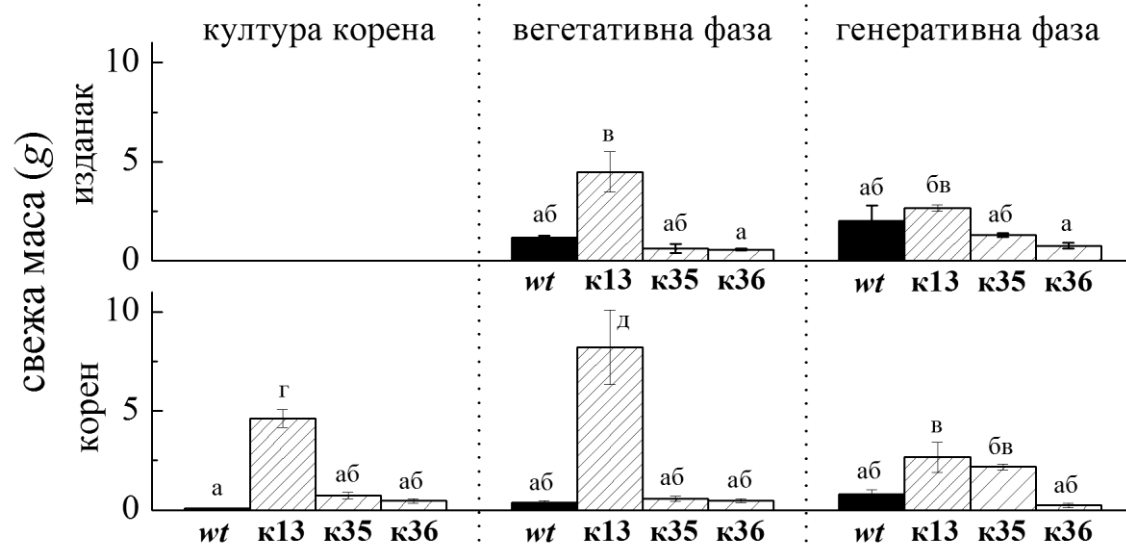
#### 4.1.3 Растење и развиће трансформаната

Одабраним клоновима добијеним трансформацијом *A4* сојем, окарактерисани су параметри растења, регенерације и цветања.

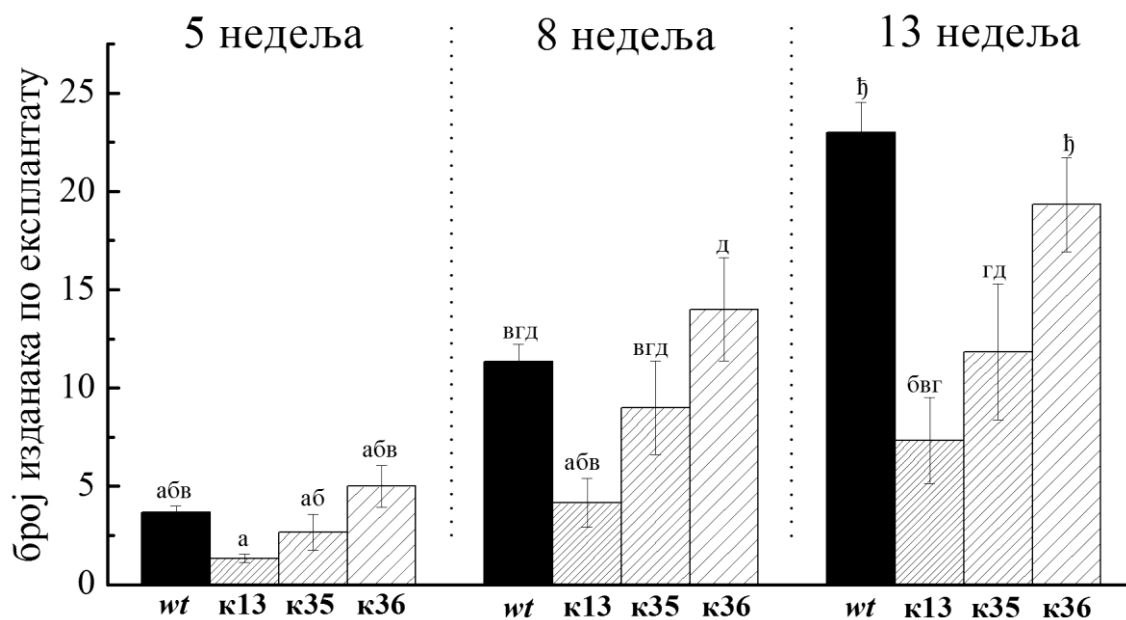
Раст култура коренова клонова 13, 35 и 36 и нетрансформисане биљке, праћен је у течној култури током месец дана (слика 25). Коренови свих клонова су расли брже од нетрансформисаних, а клон 13 је имао највећи прираст биомасе - око 60 пута виши у односу на контролу. Бржи раст клона 13 задржао се и код образованих регенераната старих 10 недеља, посебно у стадијуму розете када је овај клон имао 22 пута већи раст корена и 3,8 пута већи пораст масе изданка, у односу на нетрансформисану контролу. У стадијуму цветања, разлике између клонова и нетрансформисаних биљака су биле мање уочљиве.

Клонови су окарактерисани и мерењем учесталости регенерације на одсечцима коренова током 5, 8 и 13 недеља гајења на чврстом медијуму (слика 26). Током тог периода, највише регенераната је образовано у култури нетрансформисаних коренова, као и у култури клона 36. Најмање регенераната формирано је на кореновима клона 13.





Слика 25. Прираст свеже масе културе коренова, као и изданка и корена регенераната нетрансформисане биљке (*wt*) и трансформисаних клонова ( $\kappa 13$ ,  $\kappa 35$  и  $\kappa 36$ ) у вегетативној и генеративној фази развића. Вредности на графику представљају средњу вредност  $\pm$  стандардну грешку мерења масе културе корена из пет ерленмајера или 3 - 8 целих регенерисаних биљака. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ).



Слика 26. Спонтана регенерација у култури нетрансформисаних (*wt*) и трансформисаних коренова ( $\kappa 13$ -36). Приказана је средња вредност и стандардна грешка броја изданака образованих у шест Петри кутија са по пет експлантата за сваки клон. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ).

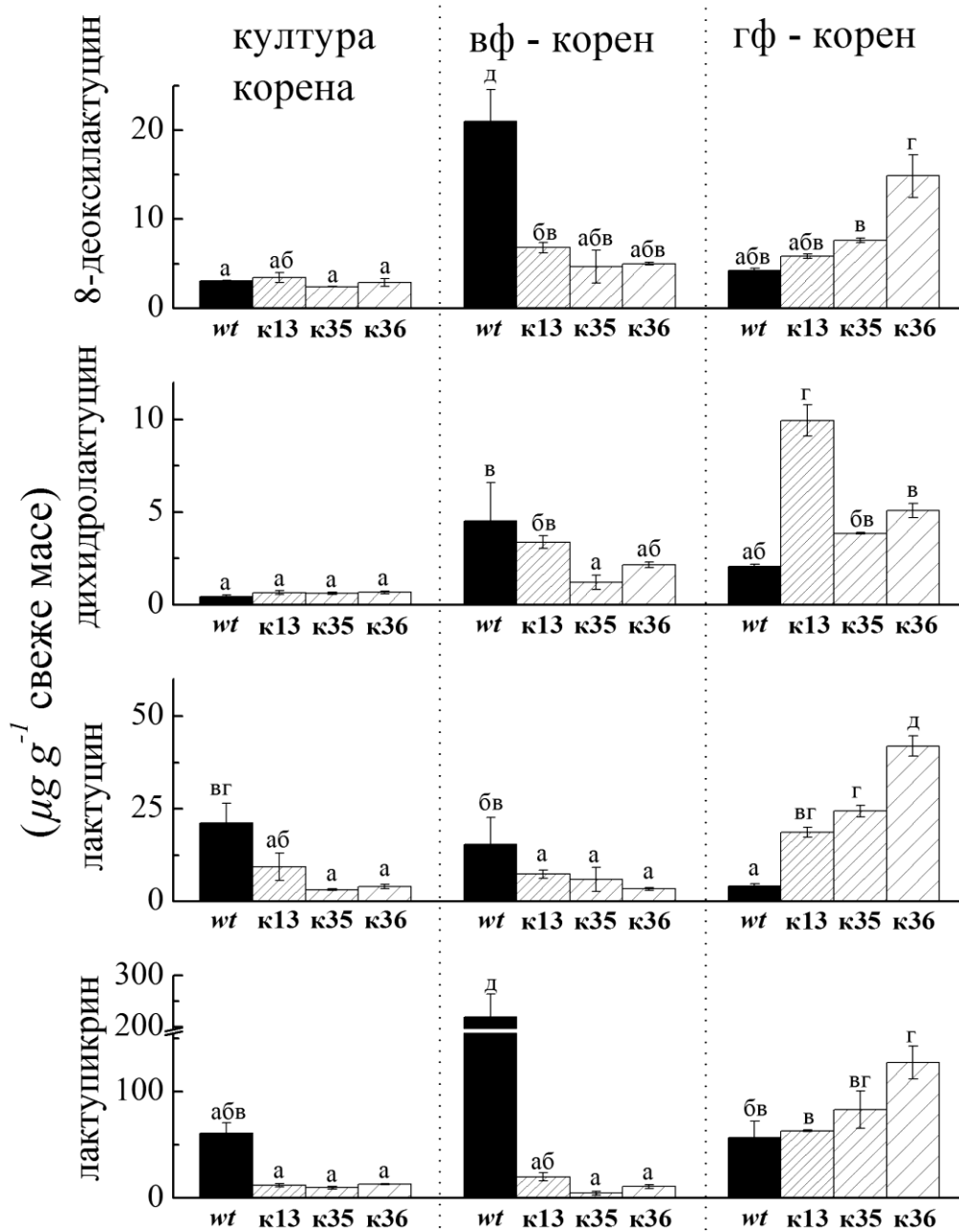
Клонови су се међусобно разликовали и у брзини преласка у фазу цветања. Мада су постојале разлике међу изданцима истог клона, већина биљака пореклом од клона 35 и 36 је процветала после 6 недеља гајења, а само је неколико биљака остало у стадијуму розете након 10 недеља култивације. За разлику од њих, нетрансформисане биљке су још увек већински биле у стадијуму розете након 10 недеља. Клон 13 је цветао раније у односу на контролу али не и у односу на клонове 35 и 36.

#### **4.1.4 Продукција гвајанолида у трансформисаним и нетрансформисаним биљкама у вегетативној и генеративној фази развића**

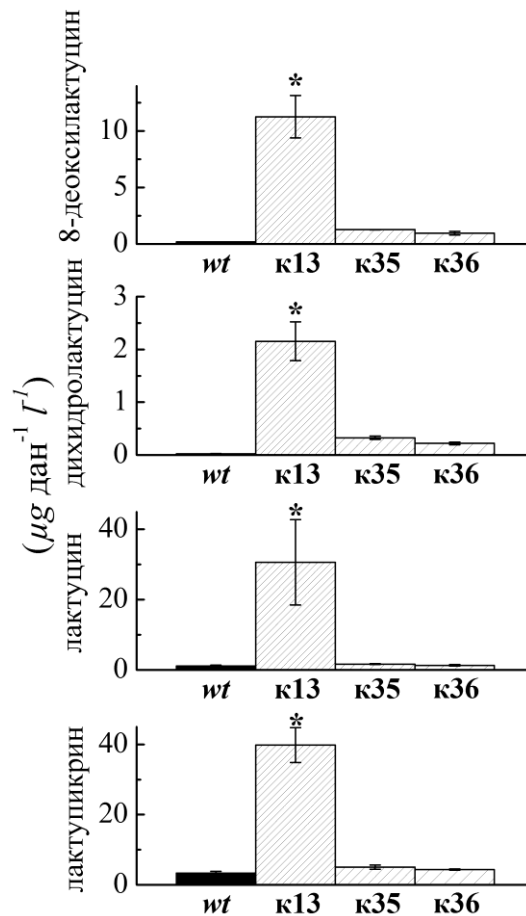
Успостављен систем култура, састављен од *wt* и *HR* течних култура корена, и нетрансформисаних и трансформисаних биљака у вегетативној и генеративној фази, искоришћен је за проучавање акумулације гвајанолида у ткивима цикорије током органогенезе и цветања.

Нетрансформисани коренови цикорије у течном медијуму производили су гвајанолиде из групе лактуцина - лактуцин ( $21,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), лактупикрин ( $61,06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), и мање количине 8-деоксилактучина ( $3,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) и 11 $\beta$ ,13-дихидролактучина ( $0,43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (слика 27). Костунолид, заједнички прекурсор сесквитерпенских лактона код цикорије, није детектован. *HR* културе одабраних клонова су такође производиле ова једињења, 8-деоксилактучин и дихидролактучин у количини сличној као код контроле, док су лактуцин и лактупикрин били присутни у мањој количини.

Међутим, захваљујући бржем растењу трансформисаних коренова (слика 25), ипак је било могуће добити већу количину једињења из *HR* култура у току једне субкултуре (слика 28), па је тако култура корена клона 13 произвела 10, 25, 70 и 90 пута више лактупикрина, лактуцина, 8-деоксилактучина и дихидролактучина, редом, у поређењу са *wt* културом.

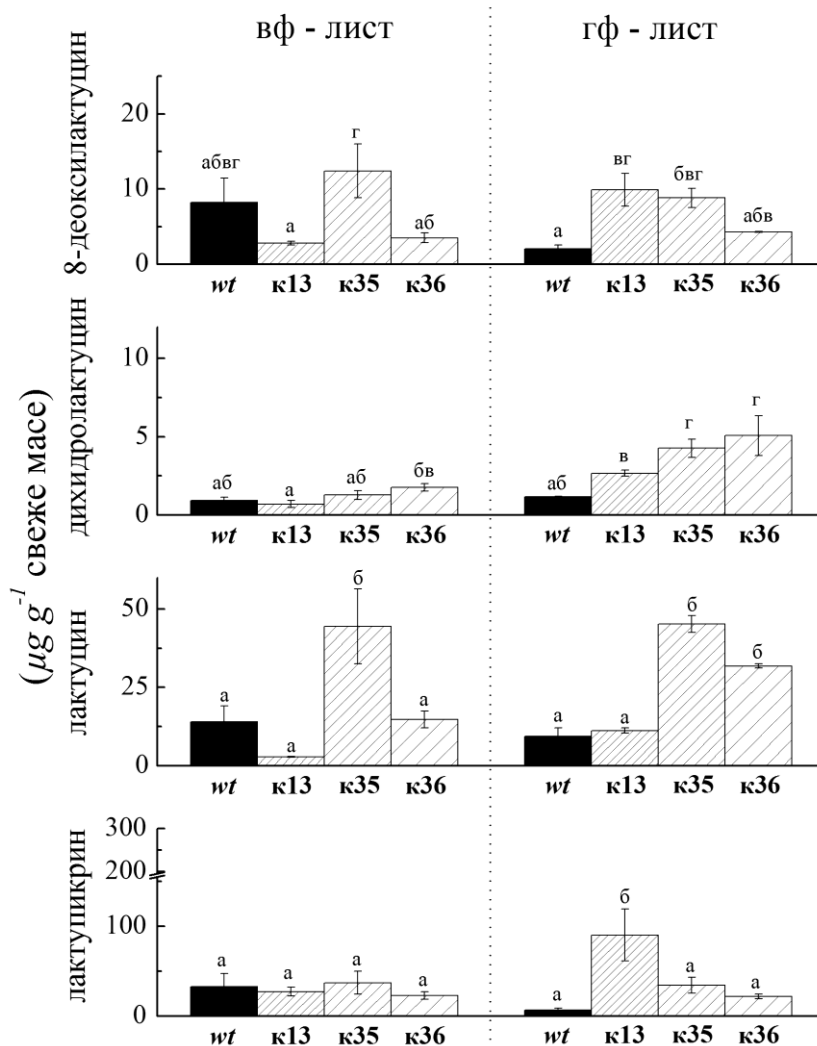


Слика 27. Садржај гвајанолида у течној култури корена, корену биљке у вегетативној (вф) фази и корену биљке у генеративној (гф) фази развића. Приказане су средње вредности са стандардном грешком три независна понављања. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ).



Слика 28. Брзина продукције гвајанолида у течној култури нетрансформисаних коренова и *HR*. Приказане су средње вредности са стандардном грешком три независна понављања. "\*" означава вредности статистички значајно различите у односу на *wt* културу ( $p < 0,05$ ).

Биљке у развојном стадијуму розете имале су виши садржај гвајанолида у корену у односу на културе корена без изданка (слика 27). Садржај 8-деоксилактонина, дихидролактонина и лактопикрина у корену нетрансформисаних биљака је био посебно повећан - 3-10 пута у односу на *HR* културу корена. Корен трансформисаних биљака у стадијуму розете такође је акумулирао више 8-деоксилактонина и дихидролактонина од *HR* култура истих клонова, али не више од корена *wt* розета. Сва четири типа гвајанолида била су присутна и у листу нетрансформисаних биљака у стадијуму розете (слика 29), мада у мањој количини него у корену. Розете трансформисаних биљака имале су у листу сличне количине гвајанолида као нетрансформисана контрола, са изузетком клона 35, који је акумулирао значајно више 8-деоксилактонина и лактопикрина него контрола и остали клонови.

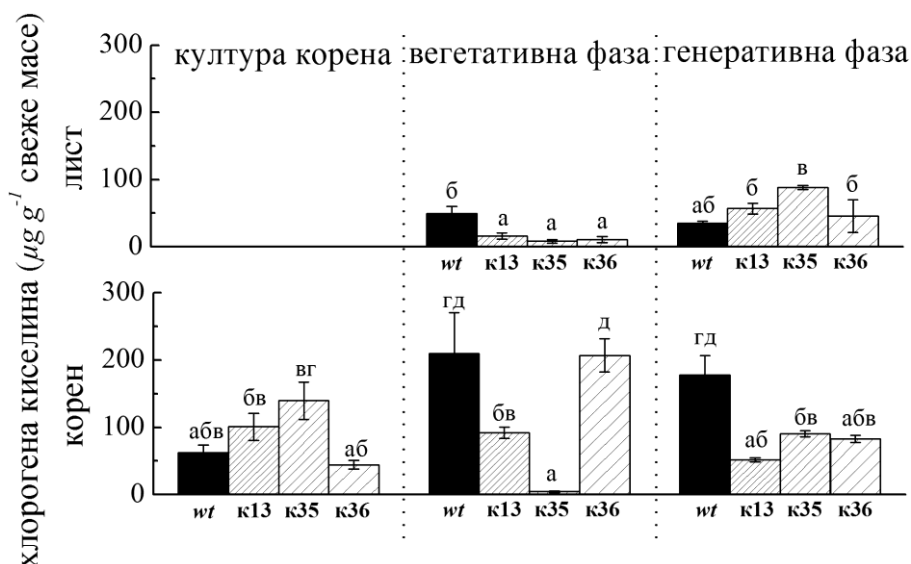


Слика 29. Садржај гвајанолида у листовима биљке у вегетативној и генеративној фази. Приказане су средње вредности са стандардном грешком три независна понављања. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ).

Транзиција у фазу цветања имала је супротан ефекат на садржај гвајанолида код трансформисаних и нетрансформисаних биљака. У трансгеним биљкама, акумулација слободних форми ових једињења била је стимулирана - и у листу и у корену, док је код *wt* биљака она опадала са преласком у генеративну фазу развића (слике 27 и 29). Овај пад је био статистички значајан за сва посматрана једињења у корену али не и у листу. Клонови су се разликовали међусобно по томе која су једињења највише акумулирала, али укупна количина гвајанолида у целим биљкама није много варијала, будући да је код оних клонова, чији је ниво одређеног једињења у корену био већи, у листу је био пропорционално мањи, и обрнуто.

#### 4.1.5 Продукција хлорогене киселине

Код нетрансформисаних биљака, акумулација хлорогене киселине је била повећана током органогенезе, па је тако корен целих биљака имао већи садржај овог једињења него култура корена, али цветање није утицало на промену садржаја у односу на биљке у фази розете (слика 30). Код трансформисаних биљака, сличан садржај је био присутан у култури корена и корену и листу цветале биљке. Пораст садржаја хлорогене киселине приликом цветања био је уочљив само у листовима трансформисаних биљака, док је у корену дошло до смањења (са изузетком клона 36), те се може рећи да, када је у питању хлорогена киселина, није постојао јасан тренд промене садржаја са транзицијом у фазу цветања.



Слика 30. Садржај хлорогене киселине у течной култури корена, листовима и корену биљака у вегетативној и генеративној фази развића. Приказане су средње вредности са стандардном грешком три независна понављања. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) у оквиру корена и листа.

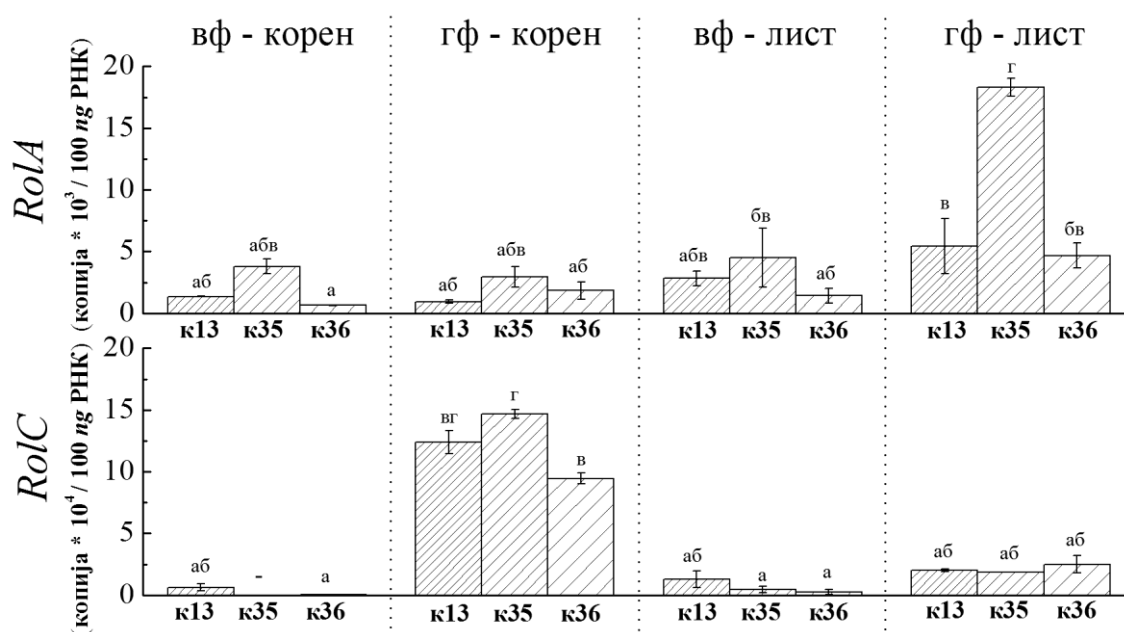
#### 4.1.6 Експресија *Rol* гена у корену и листу трансформисаних биљака

Будући да је пораст садржаја слободних гвајанолида приликом цветања био уочљив само код трансформисаних биљака, вероватно је да је цветање под утицајем бактеријских *Rol* гена, а не цветање као самосталан фактор, одговорно за пораст садржаја гвајанолида. Стога је анализирана експресија *RolA*, *RolB* и *RolC*

гена у корену и листу трансформисаних биљака. *QRT-PCR*-ом утврђено је да се код регенераната експримирају *RolA* и *RolC* гени (слика 31), али не и *RolB*.

Експресија *RolA* гена је генерално била ниска (испод  $10^4$  копија у  $100\text{ ng}$  РНК) и уједначена у кореновима и листовима биљака у вегетативном стадијуму развића, и кореновима цветалих биљака. Једино је у листовима цветалих клонова, посебно клона 35, уочен значајно виши ниво овог транскрипта. *RolC* транскрипти су били присутни у нижој количини код биљака у стадијуму розете (у нивоу експресије *RolA* гена), а њихов ниво је значајно порастао са преласком у фазу цветања, на  $2,5 \times 10^4$  копија /  $100\text{ ng}$  укупне РНК у листовима и  $1,5 \times 10^5$  копија /  $100\text{ ng}$  РНК у кореновима.

Експресија *RolC* гена у трансформисаним биљкама цикорије подударала се са акумулацијом гвајанолида (слике 27, 29 и 31): оба параметра су била виша у цветалим биљкама него у биљкама у фази розете, и оба су била виша у корену него у листу код цветалих биљака.



Слика 31. Експресија *RolA* и *RolC* гена у кореновима и листовима трансформисаних биљака у вегетативној (vf) и генеративној (gf) фази развића. Приказане су средње вредности са стандардном грешком три независна понављања. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ). "-" - податак недостаје.

## 4.2      Анализа промотора одабраних гена

Промотори гена са почетка биосинтетског пута гвајанолида - гена гермакрен А синтазе и оксидазе, нису до сада испитивани и у литератури нема података о њиховој функцији, регулацији и активности у биљци. Стога је спроведена конструкција вектора који носе испитиване промоторе везане за маркере који омогућавају идентификацију активности промотора, као и трансформација цикорије овим конструктима ради детекције њихове активности у различитим биљним органима.

### 4.2.1   Конструкција вектора за анализу промотора

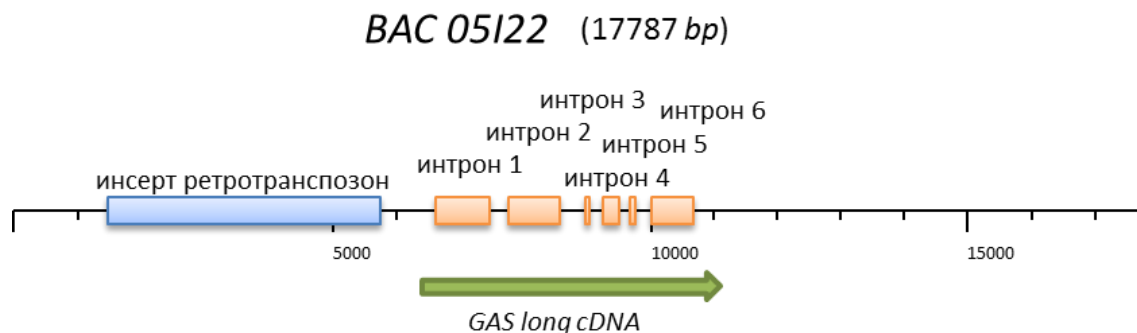


Слика 32. Шема експеримента амплификације и клонирања промотора.

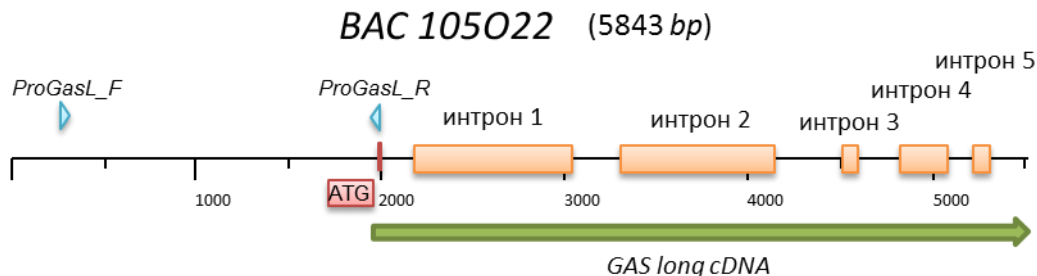


Ток експеримента конструкције вектора приказан је на слици 32. ДНК секвенце генома цикорије, смештене у *BAC*-овима, у којима су претходно пронађене и анотиране секвенце *GAS long* гена (*GenBank AF497999*), *GAS short* гена (*GenBank AF498000*), и гена *GAO* (*P450* монооксигеназе) (*GenBank HQ166835*), претражене су ради утврђивања броја копија гена присутних у секвенцама генома, и доступне дужине промотора. Критеријуми за одабир одговарајуће секвенце промотора су били: што дужа секвенца (идеално око 2 *kbp*), без ретротранспозона и без репетитивних секвенци на почетку *BAC* секвенце.

За *GAS long* ген, пронађене су две копије у геному - на *BAC*-овима ознаке *105022* и *05I22*. Копија у *BAC 05I22* је садржала ретротранспозонски инсерт унутар секвенце промотора (слика 33), па је за даљи ток истраживања коришћена копија у *BAC 105022*. Старт кодон (*ATG*) је детектован на позицији 1,994 *bp* (слика 34). Дизајнирани су прајмери који амплификују део промотора у дужини од 1,738 *bp*, а који се завршава један нуклеотид пре старт кодона.

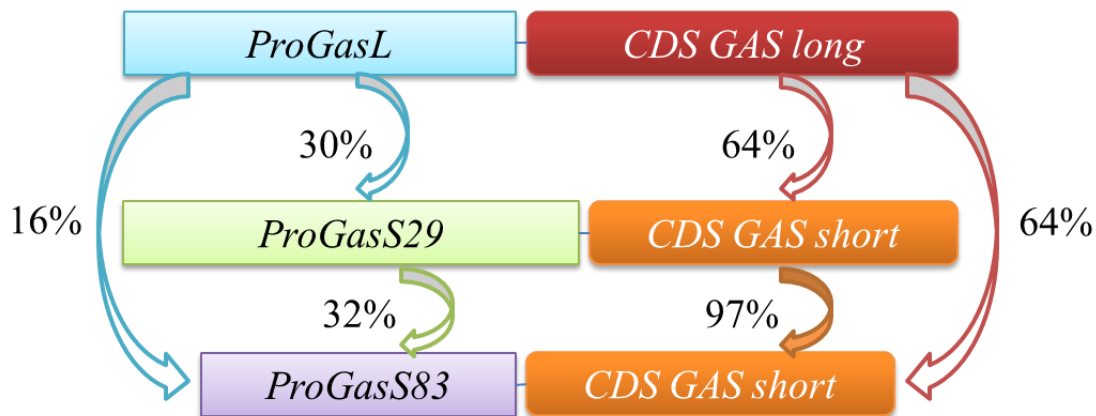


Слика 33. *GAS long* ген у *BAC 05I22*.



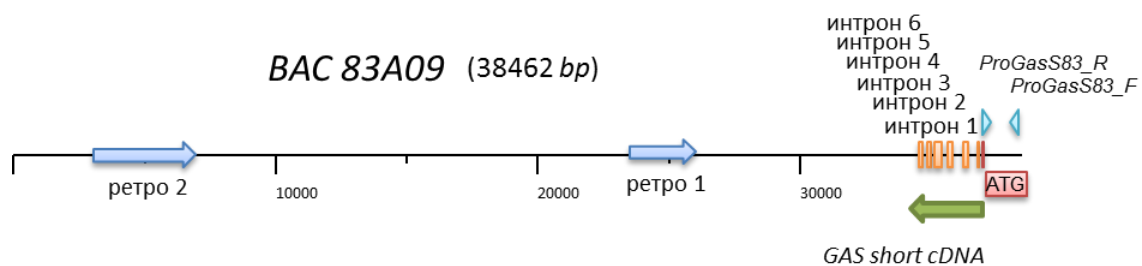
Слика 34. *GAS long* ген у *BAC 105022*. Означена је позиција старт кодона и везивна места одабраних прајмера за амплификацију промотора (табела 6).

За *GAS short* ген, пронађене су две секвенце, на *BAC*-овима ознаке 83A09 и 29O10. Поређењем секвенци ова два промотора, утврђена је мала хомологија секвенци (слика 35), и оба промотора су одабрана за испитивање. Ови промотори и њихови прајмери су надаље обележени према почетним бројевима *BAC* клонова.



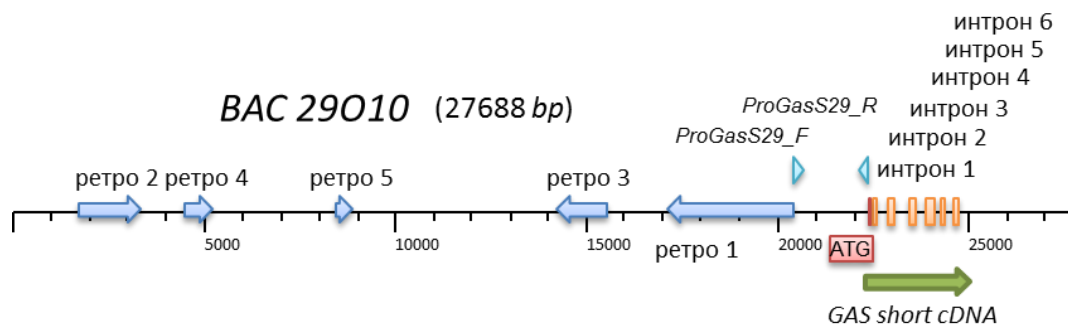
Слика 35. Сличности нуклеотидних секвенци промотора и кодирајућих секвенци (енг. *coding sequence, CDS*) *GAS* gena.

Секвенца gena у *BAC* 83A09 је била у реверзној оријентацији, па је *ATG* пронађен на позицији 36985 *bp*, и дизајнирани су прајмери који амплификују део промотора у дужини од 1,393 *bp* (слика 36).



Слика 36. *GAS short* ген у *BAC* 83A09. Означена је позиција старт кодона и везивна места одабраних прајмера за амплификацију промотора (табела 6).

*ATG* секвенце у *BAC* 29O10 детектован је на позицији 22355 *bp*, а дизајнирани су прајмери који су амплификовали део промотора дужине 1,948 *bp* (слика 37).



Слика 37. *GAS short* ген у *BAC29010*. Означена је позиција старт кодона и везивна места одабраних прајмера за амплификацију промотора (табела 6).

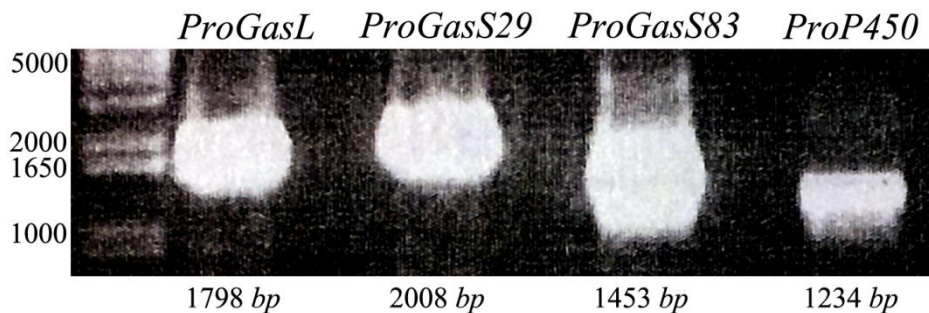
За *P450* ген, пронађене су три секвенце, а једна (на *BAC 59A14*) је била погодна за амплификацију (слика 38). *ATG* је пронађен на позицији 1,324 bp, а дизајнирани су прајмери који су амплификовали део промотора дужине 1,174 bp.



Слика 38. *P450* ген у *BAC 59A14*. Означена је позиција старт кодона и везивна места одабраних прајмера за амплификацију промотора (табела 6).

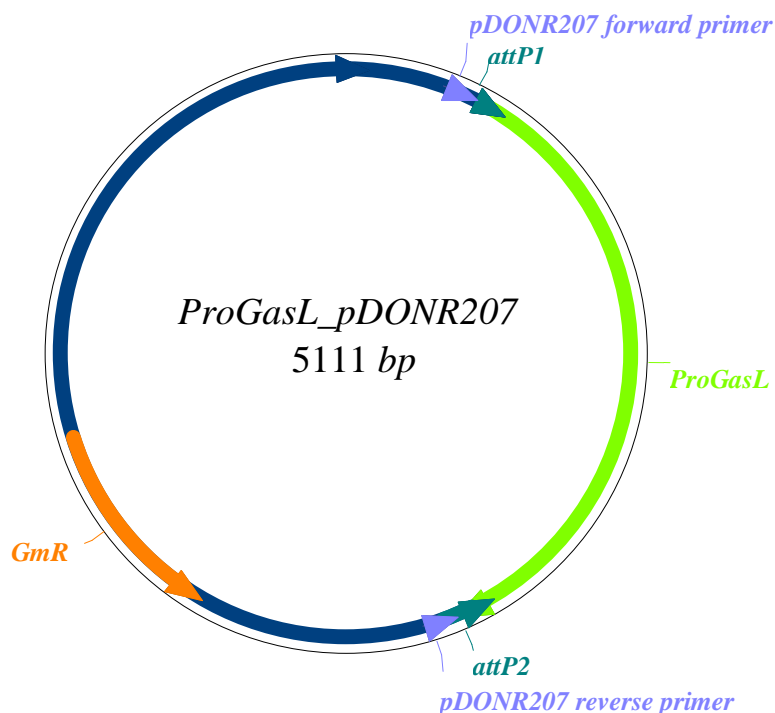
Сви одабрани прајмери за амплификацију региона промотора су модификовани додавањем *Gateway attB* места за рекомбинацију (табела 6).

Промотори су амплификовани у *Advantage PCR* реакцији, коришћењем ДНК одговарајућег *BAC* као темплејта и модификованих прајмера, а продукти реакције раздвојени су на агарозном гелу и визуелизовани на *UV* трансилуминатору (слика 39). Траке одговарајуће величине су исечене, ДНК из њих је пречишћена и измерена јој је концентрација.



Слика 39. Раздвајање продуката амплификације промотора на гелу.

Пречишћени продукти са *attB* местима рекомбиновани су са *pDONR207* вектором у *Gateway BP* реакцији, чиме су добијени *entry* клонови са инсертима промотора (слика 40).



Слика 40. Изглед *entry* клона након рекомбинације на примеру *ProGasL* конструкта. *CcdB* ген је замењен промотором.

Ради умножавања и селекције правилно рекомбинованих вектора, хемијски компетентне ћелије *E. coli XL-1 Blue* трансформисане су мешавином из *BP* реакције методом тоplotног шока. Као негативна контрола коришћен је празан *pDONR207* вектор у *TE* пуферу. После опоравка на *SOC* медијуму, ћелије су инокулисане на хранљиву подлогу са гентамицином ради селекције током ноћи.

Негативна контрола није развила колоније, док су Петри кутије са бактеријама трансформисаним *BP* реакцијом садржале бројне колоније. Шест колонија од сваког промотора тестирано је *colony PCR*-ом на присуство инсерта промотора са истим прајмерима који су коришћени за њихову амплификацију. По две колоније са јаком траком специфичне величине и без неспецифичне амплификације на гелу, одабране су за наставак експеримента. Те колоније су сачуване као глицерол штокови и из њих је изолована плазмидна ДНК.

ДНК позитивних колонија је секвенцирана вишеструким реакцијама, уз помоћ прајмера из табела 6 и 20, да би била покривена цела секвенца промотора. *Alignment* секвенци промотора из *BAC* темплејта, и оних добијених секвенцирањем инсерата у *pDONR207* вектору, потврдио је успешност клонирања целе секвенце промотора и његову очекивану позицију у вектору. Пример поређења секвенци у програму *DNA Baser* дат је на слици 41.

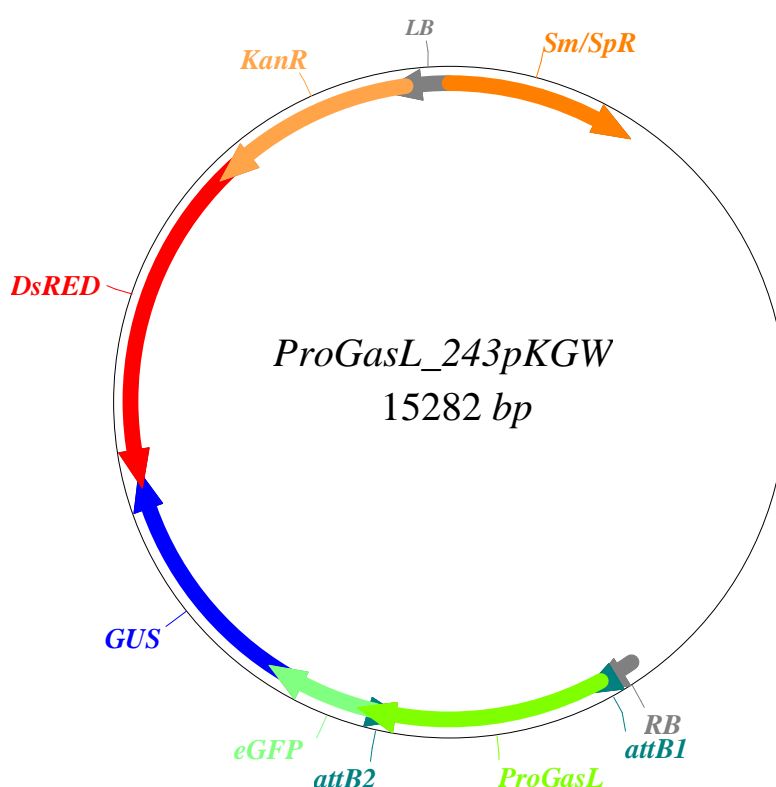


Слика 41. Упоредивање секвенце *ProGasL* секвенце из *BAC* (љубичасто обојен ред) и секвенци добијених секвенцирањем инсерата у вектору.

Приликом поређења, примећено је да у секвенцама постоје мале разлике између теоријског и секвенцираног низа нуклеотида. Ради провере да ли те разлике потенцијално нарушавају функцију промотора, преко интернет базе *TFSEARCH* извршена је *in silico* претрага претпостављених везивних места транскрипционих фактора у *BAC* секвенцама ових промотора и утврђено је да се присутне разлике не налазе у деловима промотора кључним за њихово

функционисање. У зависности од резултата секвенцирања, изабран је по један клон са најпрецизнијом секвенцом од сваког промотора за наставак експеримента.

ДНК вектора одабраних клонова рекомбинована је даље са *243 pKGW-GGRR destination* вектором у *Gateway LR* реакцији, чиме су добијени готови вектори за трансформацију биљака, у којима су испитивани промотори фузионисани за маркер-гене *eGFP* и *GUS* (слика 42). Продукти реакције су трансформисани у компетентне ћелије *E. coli* и колоније су селектоване на спектиномицину.

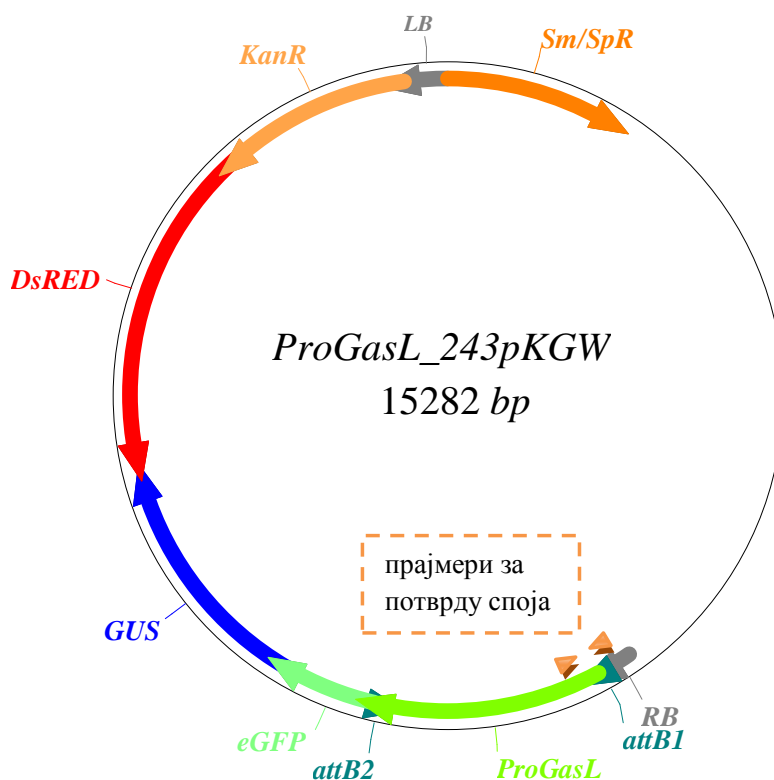


Слика 42. Изглед готовог вектора за трансформацију биљака на примеру *ProGasL* конструкта. *CcdB* ген је замењен промотором који је фузионисан са *eGFP* и *GUS* - генима за маркере који показују активност тестираног промотора. *DsRED* - ген за црвени флуоресцентни протеин, и ген за резистенцију на канамицин (*KanR*), представљају маркере за котрансформацију и селекцију биљака.

Настале колоније су проверене *colony PCR*-ом на присуство инсерта (истим прајмерима као при амплификацији), а затим проверене на одсуство секвенце *pDONR207* вектора (са *pDONR207* прајмерима, табела 12). Овај други *PCR* је служио да искључи могућност да бактерије садрже непотпуно рекомбиноване

продукте или преостале *pDONR207*-конструкте. Одговарајуће колоније су сачуване као глицерол штокови и из њих је изолована плазмидна ДНК.

Ради финалне потврде интегритета конструката, дизајнирани су прајмери који амплификују спој 243 вектора и датог промотора (слика 43 и табела 15), урађен је *PCR* на плазмидној ДНК са тим прајмерима, и добијањем специфичних продуката одговарајуће величине, потврђена је правилна интеграција и оријентација промотора у финалном вектору.

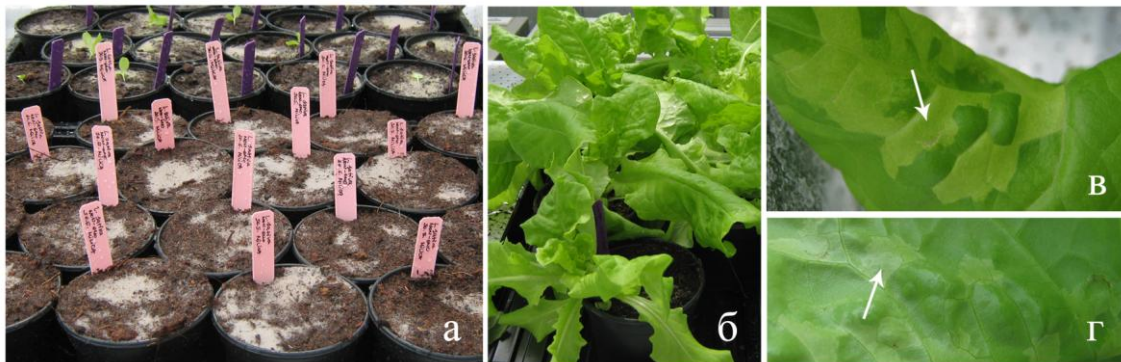


Слика 43. Место везивања прајмера дизајнираних да потврде правилно клонирање инсерта промотора на примеру *ProGasL* конструкта.

Потврђени вектори су пребачени у одговарајуће сојеве агробактерија - *A. tumefaciens* C58C1 за агроинфилтрацију, и *A. rhizogenes* A4M70GUS за трансформацију цикорије. Бактерије су трансформисане електропорацијом, селектоване на спектиномицину и проверене *colony PCR*-ом на присуство инсерта. Позитивне колоније су сачуване у виду глицерол штока.

#### 4.2.2 Провера конструктора агроинфилтрацијом – флуоресцентна анализа и GUS бојена реакција

Агроинфилтрација - врста пролазне трансформације, корисна је као метод провере функционалности конструктора у биљци, пре него што се приступи стабилној трансформацији. За проверу конструктора за анализу промотора изабрана је агроинфилтрација на зеленој салати (слика 44), која је филогенетски блиска цикорији.



Слика 44. *L. sativa Olof* коришћена у агроинфилтрацији. (а) исклијавање и раст током три недеље, до стадијума са 6-7 правих листова (б). Светлији делови ткива непосредно после агроинфилтрације на лицу (в) и наличју листа (г), обележени стрелицама.

Салата је инфилтрирана сојевима *A. tumefaciens C58C1* који су носили по један конструктор за анализу промотора. Као позитивне контроле за флуоресцентне маркере, коришћени су вектори *GFP+* (*GFP* контрола) и *DsRED+* (*DsRED* контрола). Пет дана након инфилтрације, проверена је флуоресценција инфилтрираних листова бинокуларном лупом са флуоресцентним додатком. Контроле су показивале јаку флуоресценцију само на каналу који одговара маркеру који садрже, док је на другом каналу била присутна само аутофлуоресценција ткива и некротичног дела око места инфилтрације (слика 45а и б). Листови инфилтрирани конструкторима са промоторима показивали су флуоресценцију на оба канала - *DsRED* и *GFP* (слика 45в до ђ). Експресија маркера била је строго ограничена у инфилтрираним деловима. Експресија није примећена у лисној нерватури, вероватно због немогућности уласка бактеријске суспензије.



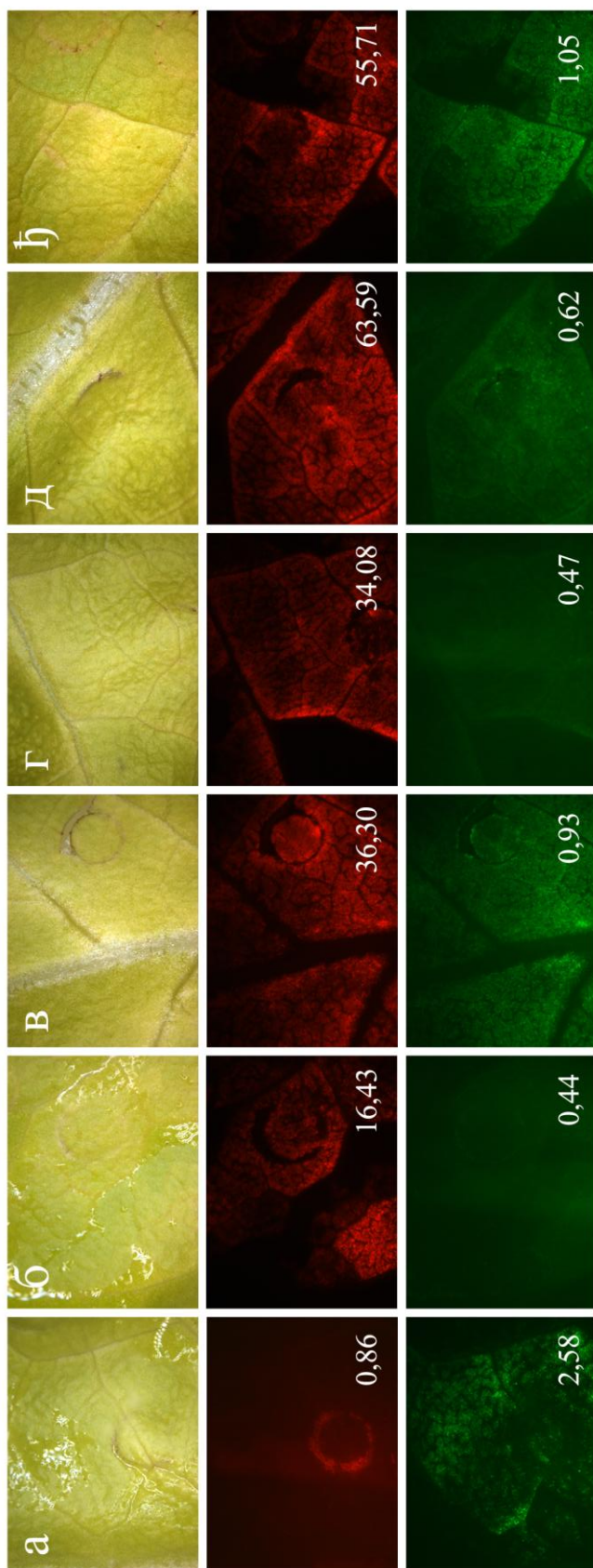
Интензитет снимљене флуоресценције маркера изражен је преко средње вредности интензитета осветљености пиксела у деловима листа где постоји експресија, нормализоване на време експозиције у секундама -  $api \cdot s^{-1}$ . На овај начин је превазиђен проблем камере када се при продуженој експозицији и слабој флуоресценцији добија светлија целокупна слика - укључујући и неинфилтриране делове, што даје лажну слику о јачини маркера.

DsRED флуоресценција је била приметно јача од GFP (чак и код најјаче GFP+ контроле), између 50 и 100 пута. Сва четири конструкта са промоторима су експримирали GFP широм инфилтрираног ткива, мада различитим интензитетом - *ProGasL* и *ProP450* показивали су снажнију флуоресценцију од *ProGasS29* и *ProGasS83*, а сви су били слабији од GFP контроле.

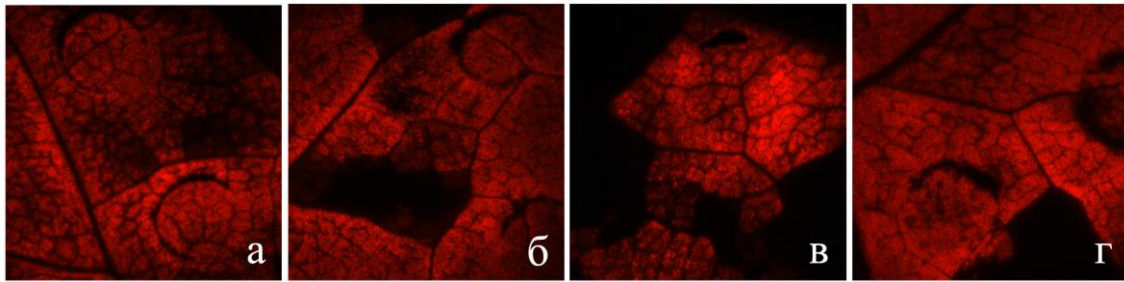
Овим је показана функционалност направљених конструката, ефикасност маркера да покажу присуство и ниво експресије трансгена, као и функционалност тестираних промотора у биљном ткиву.

Након 11 дана од инфилтрације, DsRED флуоресценција је била уједначена међу узорцима са различитим промоторима (слика 46), са стандардном девијацијом интензитета флуоресценције 7% од средње вредности. Уочен је и општи пораст интензитета флуоресценције у односу на период 5 дана после инфилтрације, од око 10-20 пута.

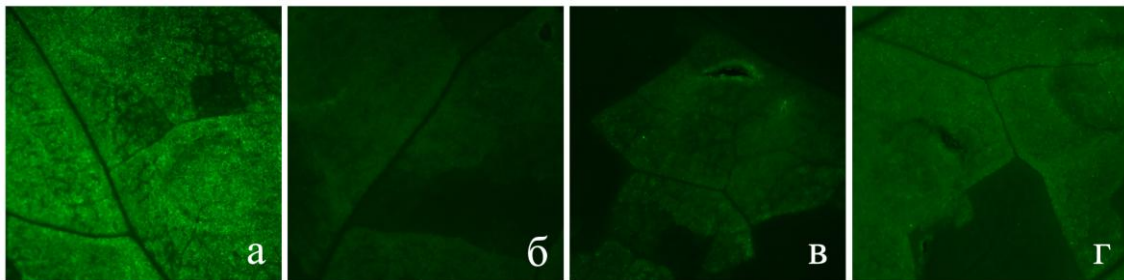
GFP флуоресценција се после 11 дана и даље разликовала међу узорцима инфилтрираним различитим промоторима (слика 47), са варијацијом од 42,5% средње вредности. Најјачу флуоресценцију је имао *ProGasL* промотор, праћен промотором *ProP450*, док су *ProGasS29* и *ProGasS83* и даље били релативно слаби.



Слика 45. Делови листова 5 дана након инфилтрације, посматрани под белим светлом (први ред), DsRED филтерима (други ред) и GFP филтерима (трећи ред). *GFP+* контрола (а), *DsRED+* контрола (б), *ProGasL* вектор (в), *ProGasS29* вектор (г), *ProGasS83* вектор (д), *ProP450* вектор (е). Дужина експозиције је подешавана аутоматски, за сваку фотографију посебно. На свакој фотографији означен је интензитет снимљене флуоресценције.



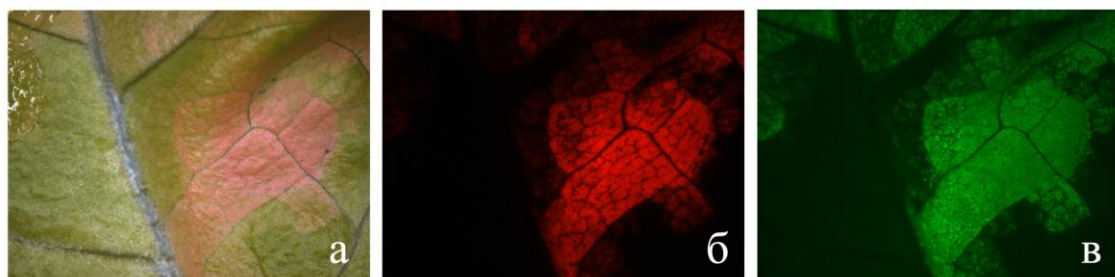
Слика 46. DsRED флуоресценција 11 дана након инфилтрације (а) - *ProGasL* 634,32  $api \cdot s^{-1}$ , (б) - *ProGasS29* 642,18  $api \cdot s^{-1}$ , (в) - *ProGasS83* 662,70  $api \cdot s^{-1}$ , (г) - *ProP450* 738,55  $api \cdot s^{-1}$ . Дужина експозиције за све слике је била 0,044 s.



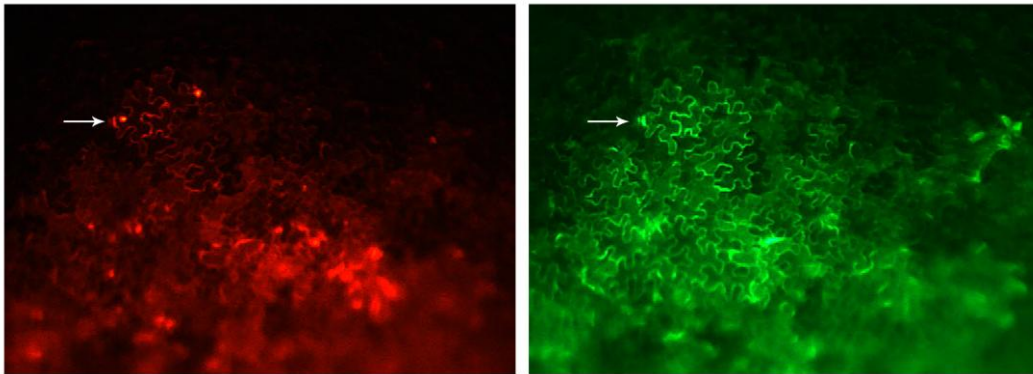
Слика 47. GFP флуоресценција 11 дана након инфилтрације (а) - *ProGasL* 2,03  $api \cdot s^{-1}$ , (б) - *ProGasS29* 0,87  $api \cdot s^{-1}$ , (в) - *ProGasS83* 0,87  $api \cdot s^{-1}$ , (г) - *ProP450* 1,44  $api \cdot s^{-1}$ . Дужина експозиције за све слике је износила 15,04 s.

После 11 дана од инфилтрације, инфилтрирани листови су изгубили део хлорофила, па је јака флуоресценција DsRED маркера била уочљива и голим оком, на белој светлости (слика 48).

На увећаном приказу ткива које флуоресцира, примећена је флуоресценција епидермалних ћелија, њихове цитоплазме приљубљене уз изувијан ћелијски зид и једара (слика 49).



Слика 48. Флуоресценција DsRED видљива голим оком (а) после 11 дана од инфилтрације, на примеру узорка инфилтрираним *ProP450* конструктом. Под (б) и (в) је исти регион посматран филтерима за DsRED и GFP.



Слика 49. Увећани приказ ћелија које флуоресцирају на примеру *ProGasL* конструкта. Стрелицом је обележено једро епидермалне ћелије.

Осим провером експресије флуоресцентних маркера, конструкти су окарактерисани бојеном реакцијом на GUS, који је такође под контролом испитиваних промотора. Као негативна контрола, употребљен је празан *pBIN* вектор, који не садржи *GUS* ген. Сва четири конструкта са промоторима давала су бојену реакцију код инфилтрираних листова, док је негативна контрола била безбојна. Обојени делови су били уочљиви и након дужег обезбојавања хлорофила (слика 50).



Слика 50. GUS бојена реакција листова салате инфилтрираних конструктима са промоторима, на примеру *ProGasL* конструкта (г-њ). Листови инфилтрирани *pBIN* контролом (а-в). Приказани су листови након инфилтрације, а пре бојења (а и г), после бојења (б и д) и након обезбојавања у етанолу (в и њ).

### 4.2.3 Трансформација цикорије *A. rhizogenes* сојевима који носе конструкте за анализу промотора

Након потврде да су састављени конструкти функционални, а испитивани промотори правилно клонирани и активни, приступило се стабилној трансформацији цикорије сојем *A4M70GUS*, за који је показано да може да трансформише цикорију са задовољавајућом учесталашћу. За разлику од трансформације "празним" сојем *A4* (поглавље 4.1.1), када је долазило до трансфера Т-ДНК са *Ri* плаزمида у биљне ћелије, при трансформацији сојевима који су носили и по један бинарни плазмид за испитивање активности промотора, очекиван је био пренос Т-ДНК са оба плазмида и интеграција у биљни геном, што је означено као котрансформација. Могућ је био и пренос Т-ДНК са једног од ова два плазмида - или са *Ri* или са бинарног. У првом случају, овакви клонови нису били од интереса, док у случају трансформације само бинарним плазмидом, очекиван је био слаб раст трансформисаних коренова, у недостатку бактеријских гена.

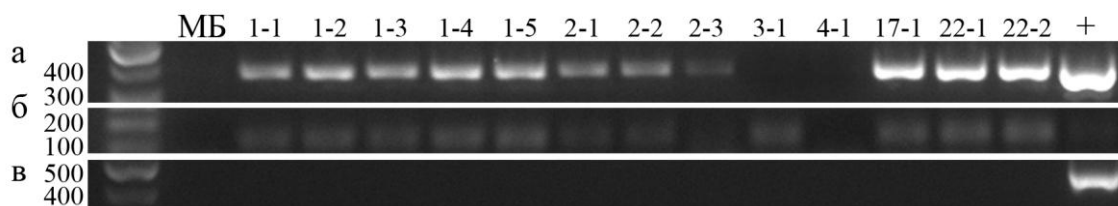
Трансформација цикорије обављена је са четири конструкта за анализу промотора - *ProGasL*, *ProGasS29*, *ProGasS83* и *ProP450*, као и *DsRED* и *GFP* контролама - *DsRED+* и *GFP+*. Почетни материјал за трансформацију биле су биљке добијене из семена. По два листа одвојена од биљака старих 5-10 недеља (по пет биљака за сваки конструкт) инокулисана су бактеријском културом дуж листних нерава. Први коренови су се на листовима појавили после 10 дана од инокулације (слика 51а), а одсечени су после четири недеље и гајени посебно на подлози са цефотаксимом ради спречавања раста бактерија. Добијене *HR* културе су имале карактеристичну *hairy-root* морфологију, одликовале су се брзим растом, а коренови су били врло гранати (слика 51б и в). Коренови који су наставили са растењем, даље су субкултурисани, а на њима су се појављивали изданци (слика 51г) - спонтано или индуковано повредом - убадањем стерилном иглом. Изданци су одвајани, пазећи да не буде обухваћено ткиво корена, и даље гајени још месец дана, када су узорковани за проверу трансгене природе (слика 52, табела 23). Изданци код којих је потврђена трансформација су гајени до формирања целе биљке. Трансформисане биљке су имале сличну морфологију као и клонови

добијени трансформацијом "празним" сојем *A4*, са добро развијеним и врло гранатим кореновима и изданцима углавном нормалне морфологије. Корен тих регенераната је изолован и даље субкултурисан, а остатак биљке узоркован за проверу експресије трансгена и микроскопирање.

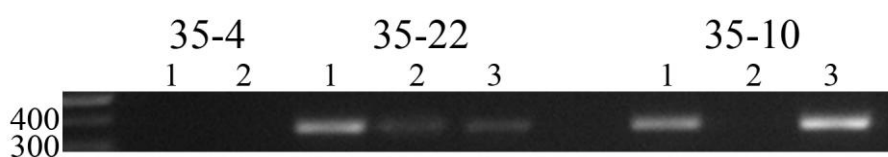


Слика 51. Трансформисани коренови 10 дана по инокулацији (а), *hairy-root* морфологија (б и в) коренова пре одсецања, (г) *HR* култура стара месец дана са спонтано формираним изданцима (стрелице).

Потврда трансформације обављена је на свим клоновима који су дали регенеранте, а тестирано је до шест регенераната сваког клона. Први добијени клонови, трансформисани *ProGasL* конструктом, тестирани су на присуство Т-ДНК са бинарног вектора (*DsRED* ген, слика 52а), Т-ДНК са *Ri* плаزمидом (*RolA* ген, слика 52б) и одсуство *virD1* гена (слика 52в) као потврду да није у питању контаминација бактеријама. Ни један од три гена није био присутан у мајци биљци, а *virD1* није био присутан ни у једном од клонова, као што је било очекивано. Клонови 3-1 и 4-1 нису имали *DsRED* ген (иако је 3-1 имао интегрисан *RolA*), те су искључени из даљих експеримената, док су остали клонови и сви њихови регенеранти имали траку очекиване величине. У случају неких клонова, уочено је да се регенеранти међусобно разликују по томе да ли су трансформисани или не (слика 53), па је у свим даљим проверама трансформације (за све трансформисане конструкте) тестирано између два и шест регенераната сваког клона. За даље експерименте коришћене су само оне линије пореклом од биљака код којих је директно потврђена трансформација.



Слика 52. Провера трансгене природе дела клонова на примеру трансформисаних *ProGasL* конструктом. Проверена је интеграција гена (а) *DsRED* - 349 bp, (б) *RolA* - 111 bp и (в) *virD1* - 441 bp PCR ампликон. МБ - нетрансформисана мајка биљка, 1-1 до 1-5 су различити регенеранти клона 1, 2-1 до 2-3 су регенеранти клона 2, а 22-1 и 22-2 регенеранти клона 22. Сви клонови су пореклом од исте мајке биљке. "+" је бактеријска ДНК као позитивна контрола.



Слика 53. Пример клонова са свим нетрансформисаним (клон 35-4), свим трансформисаним (клон 35-22) и мешовито трансформисаним регенерантима (клон 35-10).

У даљим проверама трансформаната, регенеранти су тестирани само на присуство *DsRED* или *GFP* гена. Сумарни приказ успешности трансформације приказан је у табели 23. Око 70% тестираних клонова, а то су клонови који су добро расли и формирали регенеранте, било је позитивно на Т-ДНК са бинарног вектора.

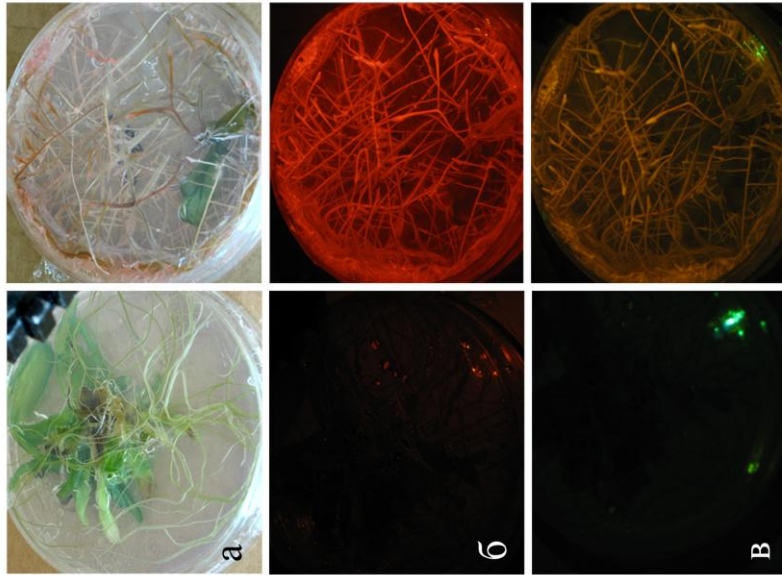
Табела 23. Збирни приказ ефикасности трансформације цикорије сојевима са векторима за анализу промотора и контролним векторима. "+" означава број клонова или регенераната код којих је потврђена трансформација.

	иницијалних клонова	преживелих клонова	тестираних клонова	+ клонова	+ регенераната
<i>DsRED</i> +	53	22	19	12	37
<i>GFP</i> +	54	31	14	9	14
<i>ProGasL</i>	60	28	27	19	67
<i>ProGasS29</i>	48	8	3	3	11
<i>ProGasS83</i>	85	32	29	26	100
<i>ProP450</i>	49	13	11	5	16
укупно	349	134	103	74	245

У току раста иницијалних *HR* култура, као и након одвајања корена са регенераната код којих је потврђена трансформација, периодично је бележена DsRED флуоресценција, као један вид недеструктивне карактеризације експресије трансгена. Културе су визуелизоване уз помоћ конструисаног система са *LED* диодама и одговарајућим филтерима. DsRED је било могуће визуелизовати уз помоћ две комбинације осветљења и филтера: зелена светлост и црвени *LP* филтер (слика 18а и б) и плава светлост и *BP-0575-040nm* филтер (слика 18в). Ни у једној од ових комбинација није била видљива аутофлуоресценција нетрансформисаних биљака (слика 54) и *GFP+* клонова, што је потврдило да је овај систем одговарајући за детекцију трансформације и експресије *DsRED* трансгена. Ове две комбинације осветљења и филтера се нису квалитативно разликовале - детектовале су исте делове биљке да флуоресцирају, док када је у питању интензитет добијеног сигнала, систем са зеленом светлошћу је давао јачи сигнал, будући да је зелена светлост оптимална за ексцитацију DsRED-а (слика 54).

Културе коренова различитих клонова флуоресцирале су различитим интензитетом. Неке културе су имале униформну флуоресценцију у свим деловима, док је код већине култура флуоресценција била варијабилна. У циљу лакшег праћења интензитета флуоресценције, осмишљена је описна скала која апроксимативно дефинише интензитет флуоресценције целокупне културе и појединих делова коренова тј. врхова или старијих делова корена (табела 24). Скала са примерима приказана је на слици 55.



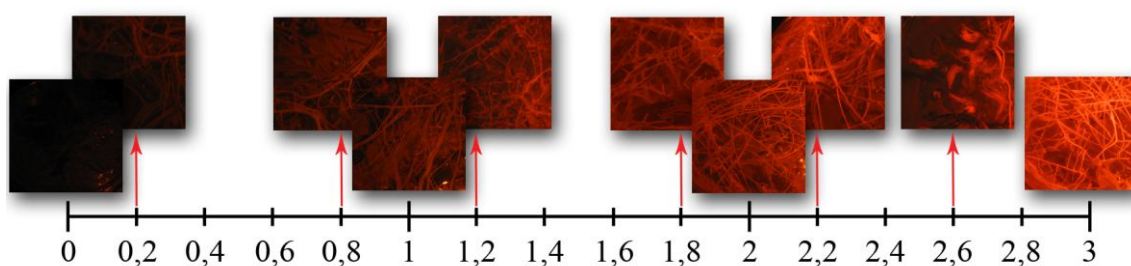


мајка биљка *DsRED*<sup>+</sup> клон

Слика 54. Визуелизација DsRED флуоресценције уз помоћ две комбинације експлицационе светлости и емисионог филтера: (б) - зелена светлост + LP филтер и (в) - плава светлост + BP-0575-040nm филтер. Под (а) су приказане културе под белом неонском светлошћу. У десном делу слике приказани су спектри експлицације (*exD*) и релативне емисије (*emD*) DsRED маркера у зависности од таласне дужине експлицације, затим таласне дужине коришћених LED диода и опсег таласних дужина које филтери пропуштају.

Табела 24. Описна скала вредности интензитета флуоресценције са додељеним нумеричким вредностима.

већина / делови културе	вредност интензитета флуоресценције
<b>нема флуоресценције</b>	<b>0</b>
нема / слаба	0,2
нема / средња	0,4
нема / јака	0,6
слаба / нема	0,8
<b>слаба флуоресценција</b>	<b>1</b>
слаба / средња	1,2
слаба / јака	1,4
средња / нема	1,6
средња / слаба	1,8
<b>средња флуоресценција</b>	<b>2</b>
средња / јака	2,2
јака / нема	2,4
јака / слаба	2,6
јака / средња	2,8
<b>јака флуоресценција</b>	<b>3</b>



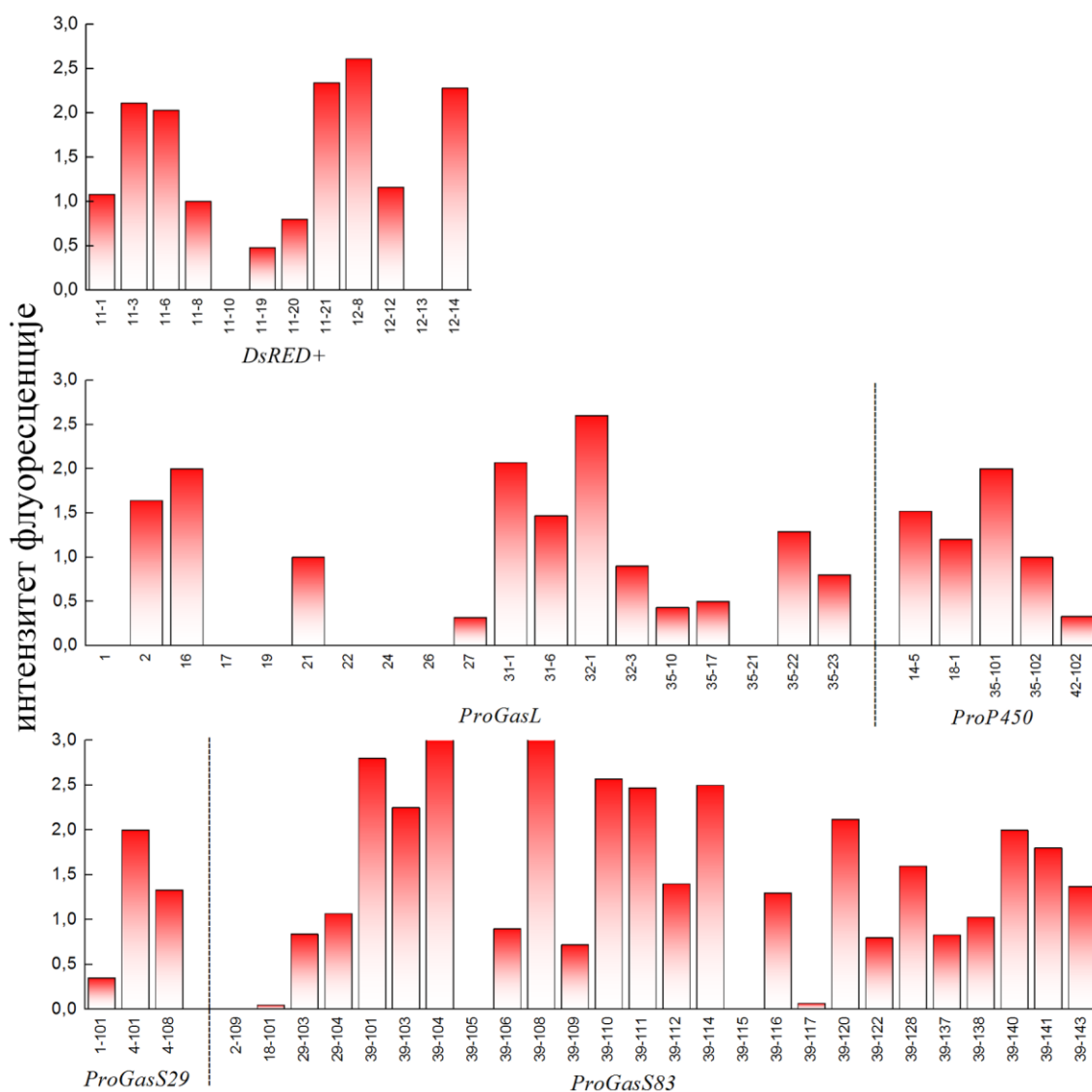
Слика 55. Апроксимативне вредности нивоа флуоресценције са примерима.

За клонове код којих је потврђена трансформација, одређена је средња вредност интензитета флуоресценције користећи додељене нумеричке вредности (слика 56, базирано на прилогу 1). За сваки клон, поређени су интензитети флуоресценције корена примарне *HR* културе и културе корена регенераната потеклих од ње. Поређене су културе старости 1, 1,5 и 2 месеца.

Већина трансформисаних клонова је експримираола *DsRED*, различитим средњим интензитетом (слика 56).

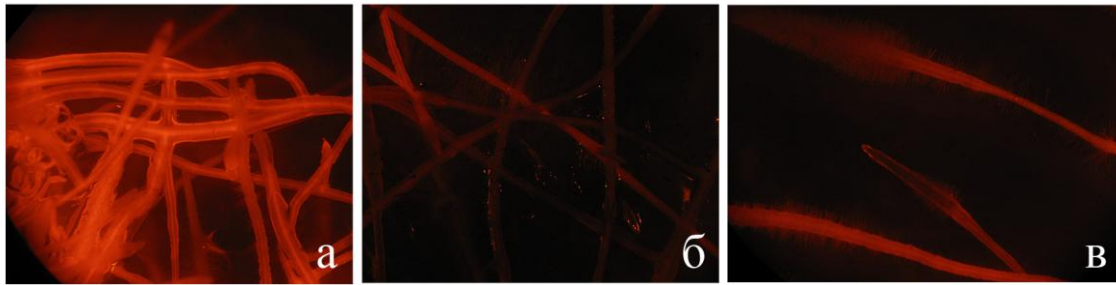
Током праћења флуоресценције корена примарних *HR* култура и култура корена њихових регенераната, примећене су следеће правилности (прилог 1):

- Коренови примарних *HR* култура су имали јачу флуоресценцију од корена њихових регенераната при истој старости културе. Код 61,53% клонова регистрована је јача флуоресценција примарних култура.
- Различити регенеранти исте старости, а пореклом од истог клона, разликовали су се међусобно у нивоу флуоресценције, што је било уочљиво код 56,25% клонова.
- Интензитет флуоресценције је растао са дужином гајења културе, мерено током 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 и 5 месеци. Старији коренови истог регенеранта имали су јачу флуоресценцију од млађих код 60,26% регенераната.
- Код већег броја регенераната (59,68%), ниво флуоресценције корена је опадао са бројем пасажа, односно са укупном старошћу културе од датума одвајања са биљке.
- У 20,15% случајева, флуоресценција је била присутна само у првим пажима изворног клона или регенеранта, док се у каснијим потпуно изгубила.
- 18,46% клонова није флуоресцирало ни у једном пасажу од трансформације.

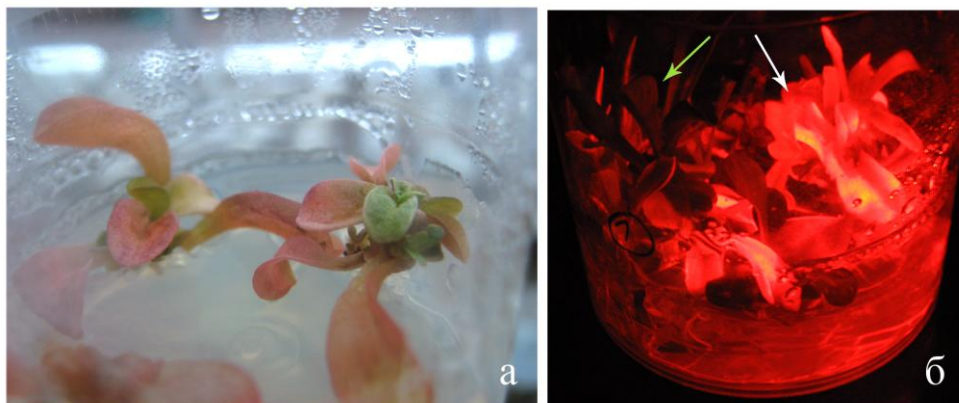


Слика 56. Интензитет DsRED флуоресценције *HR* клонова (обележених бројевима) трансформисаних конструктима *DsRED+*, *ProGasL*, *ProP450*, *ProGasS29* и *ProGasS83*.

Посматрањем под бинокуларном лупом, уочен је највећи интензитет флуоресценције коренова у средишњем делу, централном цилиндру корена (слика 57а). Врхови коренова из култура које се одликују брзим растењем не поседују флуоресценцију (слика 57в), али се она јавља ниже од зоне раста корена. У изданку неких клонова била је такође уочљива DsRED флуоресценција (слика 58). Црвена боја је била приметна и голим оком, у случају листова без хлорофила (слика 58а), као и приликом агроинфилтрације. Флуоресценција је била тешко уочљива у листовима који су имали хлорофил, али врло јасно у етиолираним изданцима (слика 58б).



Слика 57. DsRED флуоресценција - детаљи. (а) - најјаче је флуоресцирао средишњи део корена, (б) - варијације у интензитету међу кореновима исте културе, (в) - врх корена без флуоресценције и зона DsRED акумулације.



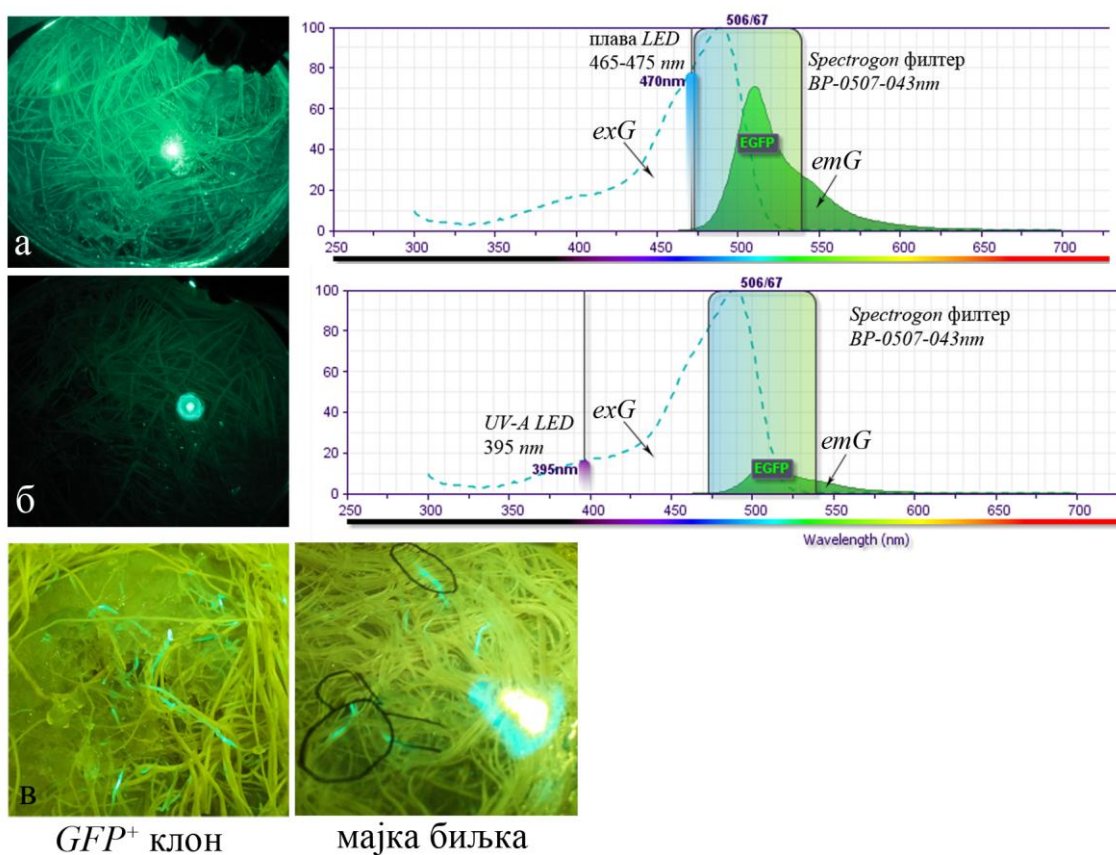
Слика 58. Флуоресценција изданака трансформисаног клона. (а) - DsRED експресија приметна голим оком у обезбојеним листовима, (б) - флуоресценција је била јасно видљива у етиолираном изданку (бела стрелица) али не и у изданку са хлорофилом (зелена стрелица).

#### 4.2.4 Флуоресцентна анализа активности промотора клонова

Због одабраног соја бактерија за трансформацију који је садржао *GUS* ген-маркер у *Ri* плазмиду, није било могуће користити *GUS* под контролом испитиваних промотора за детекцију њихове активности.

Конструисаним *LED* системом, осим DsRED маркера, праћена је и GFP флуоресценција, која би показала активност промотора. Покушане су две комбинације осветљења и *BP-0507-043nm* филтера (слика 59). У случају ексцитације плавом светлошћу, која је оптимална за ексцитацију овог маркера, филтер није успешно блокирао ексцитациону светлост (слика 59а). Бирање филтера са вишим таласним дужинама не би било продуктивно, будући да се DsRED такође ексцитује плавом светлошћу а детектује већ од 540 *nm*, па раздвајање сигнала два маркера не би било могуће. Померањем ексцитације у *UV*

део спектра (слика 59б), отклоњен је овај проблем, али је смањен релативни ниво детектабилне емисије GFP-а, тако да би овим системом вероватно било могуће детектовати само изразито јак GFP сигнал. GFP флуоресценција, јача од аутофлуоресценције нетрансформисаног корена, није детектована ни код једног клона, укључујући и клонове трансформисане *GFP+* контролним вектором. Примећени су делови корена који су флуоресцирали под *UV* светлошћу (слика 59в), међутим такви делови корена су детектовани како код клонова, тако и код нетрансформисаних биљака, па је закључено да је ова флуоресценција пореклом од неког другог извора, а не GFP маркера.



Слика 59. Покушај визуелизације GFP флуоресценције уз помоћ две комбинације ексцитационе светлости и емисионог филтера: (а) - плава светлост + *BP-0507-043nm* филтер и (б) - *UV-A* светлост + *BP-0507-043nm* филтер. У десном делу слике приказани су спектри ексцитације (*exG*) и релативне емисије (*emG*) GFP маркера у зависности од таласне дужине ексцитације, затим таласне дужине коришћених *LED* диода и опсег таласних дужина које филтери пропуштају. (в) - аутофлуоресценција непознатог порекла присутна код клона и нетрансформисане мајке биљке.

Пошто *LED* систем није био успешан у детекцији GFP маркера, употребљени су софистицирани системи за флуоресцентну микроскопију ради покушаја детекције емисије овог флуоресцентног протеина.

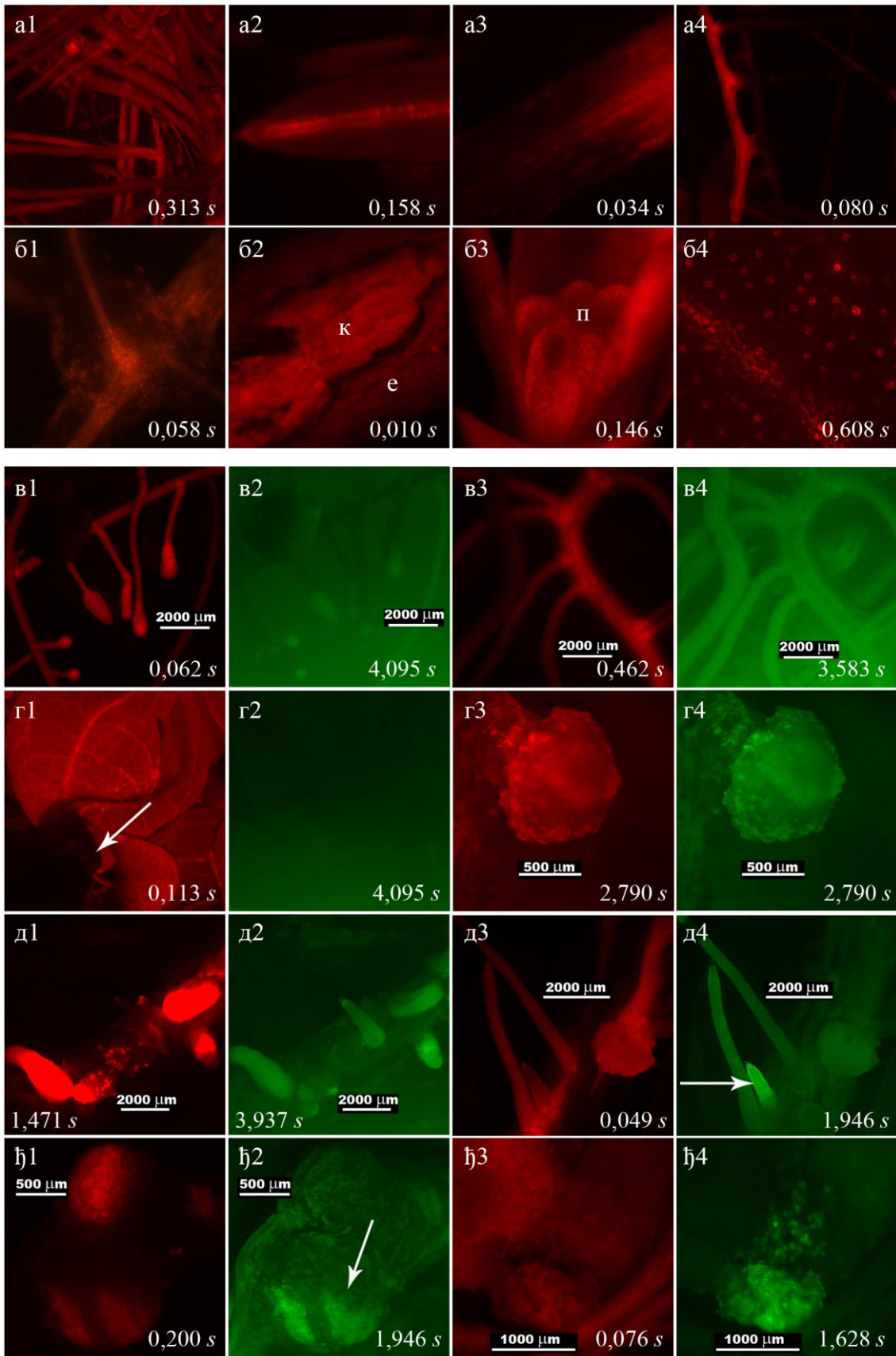
Коренови који су се развијали на листовима, и коренови и изданци трансформисаних биљака, посматрани су на бинокуларној лупи *Zeiss SteREO Lumar. V12*, са одговарајућим подешавањима за оба маркера (слика 60). DsRED флуоресценција је била врло уочљива и распрострањена у свим посматраним структурама - старијим културама корена (a1), младим кореновима (a2-б1), цветним пупољцима (б3), листовима (б4 и г1) и калусима (ђ1 и љ3). Најјача флуоресценција је била уочљива у централном делу корена (a2 и б1) и листовима без хлорофила (г1). GFP флуоресценција није засигурно детектована ни у једном узорку, укључујући и *GFP+* контролу. Аутофлуоресценција ткива на GFP каналу је била посебно изражена у задебљалим врховима корена (в2), задебљалим беличастим кореновима (в4), младим кореновима који су се појављивали на листовима (д2) и калусима (г4). У листу је било знатно мање аутофлуоресценције (г2), вероватно јер листови нису богати лигнином. У неким случајевима није било могуће потпуно одбацити могућност GFP флуоресценције, као код (д4), где је један млађи корен имао знатно јачи сигнал од осталих, затим у калусу (ђ2) где су оба дела имала DsRED флуоресценцију, а само доњи део имао јачу зелену флуоресценцију, и (ђ4) где је DsRED<sup>+</sup> калус изразито светлео и на зеленом каналу. У сва три случаја DsRED није био најјачи на месту најјаче зелене флуоресценције, што указује да она није пореклом од "цурења" емисије DsRED-а у зелени канал.

Флуоресцентна анализа је продубљена на инвертном флуоресцентном микроскопу *Zeiss Axio Observer Z1*. Припремани су свежи препарати корена, листа, стабла и пупољака нетрансформисаних биљака и трансформисаних клонова који су носили конструкте са промоторима, или контролни DsRED конструкт *DsRED+*, прављењем танких ручних пресека или *squash* техником. Пресеци су посматрани под белом светлошћу, и са подешавањима за визуелизацију DsRED и GFP флуоресценције на два различита канала. Посматрањем нетрансформисане биљке, установљено је присуство слабе

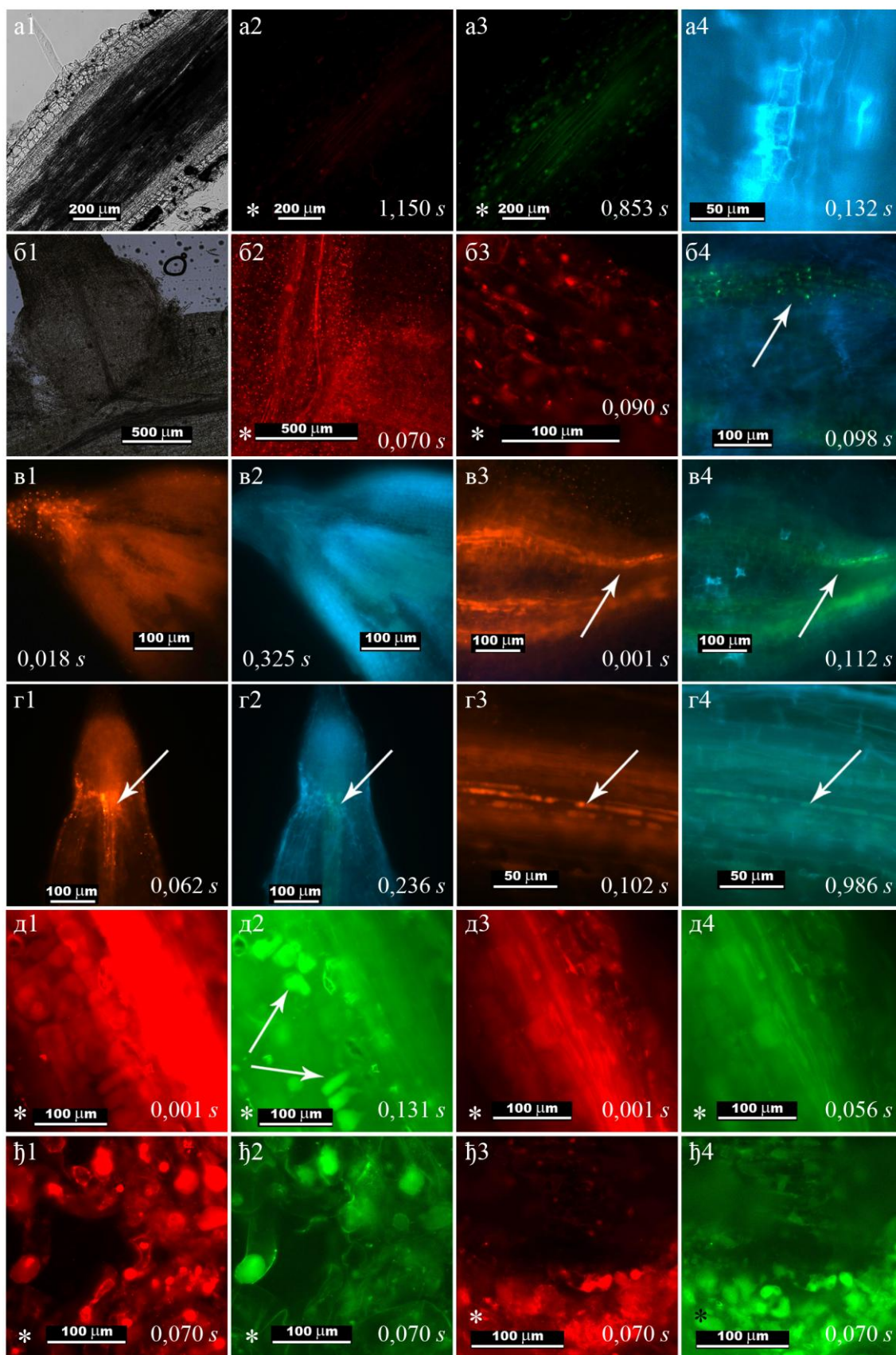
аутофлуоресценције на DsRED и нешто јаче на GFP каналу (слика 61a2 и a3), пореклом од ксилемских елемената у корену и околних паренхимских ћелија. Анализом препарата биљног ткива на већем увећању (20 пута), детектована је повећана аутофлуоресценција на GFP каналу (a4). Ћелије централног цилиндра корена су биле плаво-зелене боје (сликано камером у боји), са израженом флуоресценцијом ћелијских зидова. Код биљке трансформисане контролним DsRED конструктом, DsRED флуоресценција различитих ћелија корена је била јасно видљива (б2), а на већим увећањима најјаче су флуоресцирала једра ћелија (б3). На препаратима који су посматрани на GFP каналу уочене су две врсте аутофлуоресценције (б4) - плаво-зелена, пореклом од ћелијских зидова, и жуто-зелена - непознатог порекла. Пажљивијим прегледом великог броја узорака клонова DsRED контроле и клонова са промоторима, установљено је да се позиција жуто-зеленог сигнала веома добро поклапа са локализацијом DsRED флуоресценције (в1-г4), док овај тип сигнала није био присутан код нетрансформисане контроле у сличним деловима корена (a4).

Слична слика флуоресценције је била и на пресеку стабла (слика 62a1 до a4), где се на GFP каналу такође јављао жуто-зелени сигнал са истом локализацијом као DsRED, како у контроли (a2), тако и у клону са *ProP450* конструктом (a4). На пресецима стабла изражена је била аутофлуоресценција ксилемских судова, и то на оба канала (б2-б3), а ксилем је још јасније флуоресцирао у неким пресецима старијих трансформисаних коренова (б4). Колокализација DsRED-а са жуто-зеленим сигналом примећена је и на пресеку цветног пупољка (в1-в2), а веома добро је корелисала и на увећаном попречном пресеку младог корена (в3-в4). У листу, најјача DsRED флуоресценција запажена је у околини лисних нерава (г1), док GFP аутофлуоресценција није примећена на малом увећању (г2), али на већем јесте (г4). Вишећелијске длаке уочене на листовима такође су флуоресцирале (д2-д3), као и стоме (д2-д3 и њ2). Као и на DsRED каналу, најјачи сигнал у GFP каналу био је локализован око лисних нерава (ђ4), мада без изражене жуто-зелене обојености.

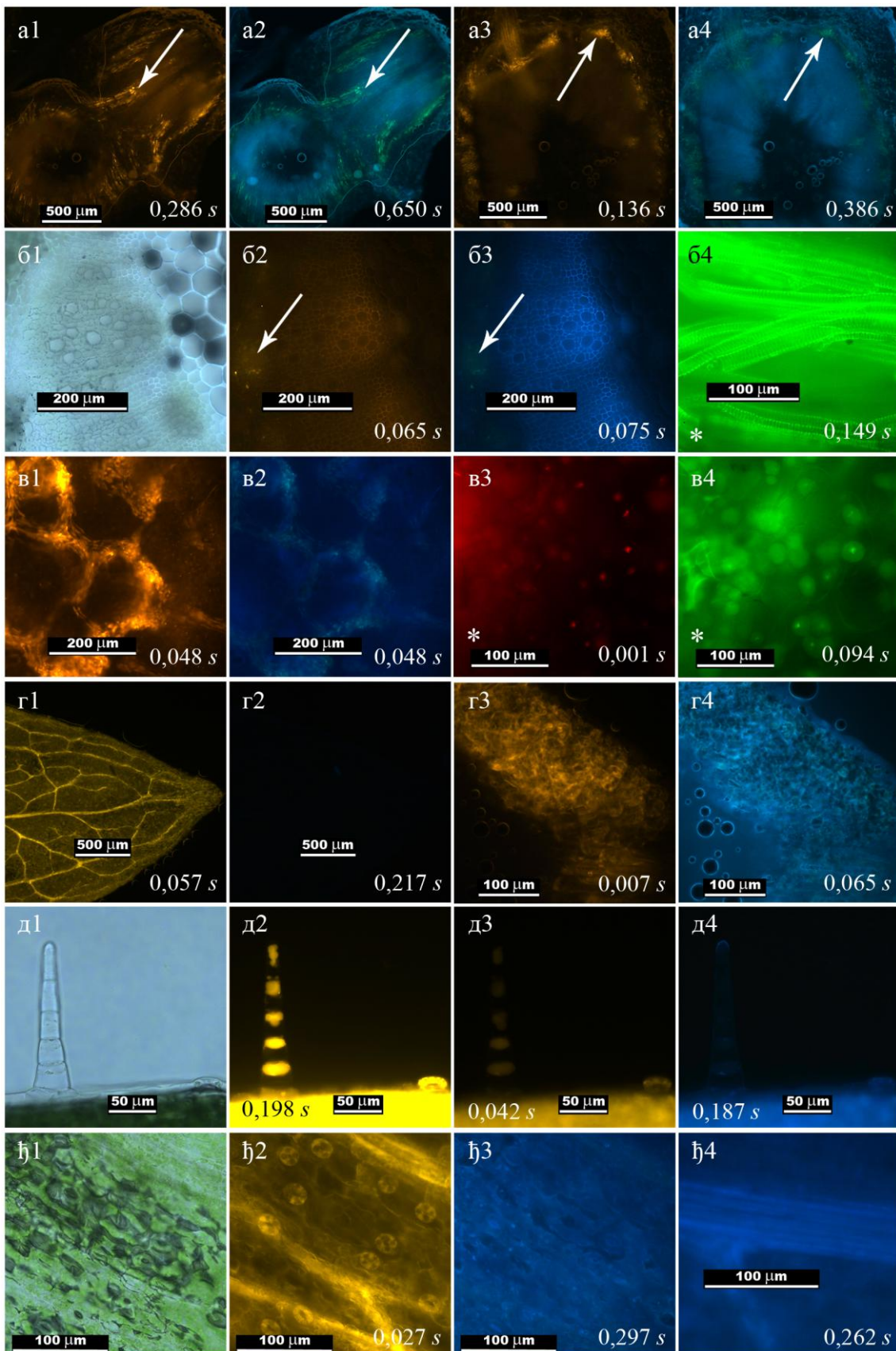




Слика 60. Флуоресцентна анализа клонова на бинокуларној луци. Фотографије су псеудообојене у црвено за DsRED и зелено за GFP канал. На свакој слици је дата дужина експозиције у секундама, и скала величине, где је била доступна. (a1) - флуоресценција корена DsRED<sup>+</sup> клона, (a2) - врх младог корена са најјачом флуоресценцијом у централном цилиндру, (a3) - прелазна зона корена између јаче и слабије флуоресценције, (a4) - варијабилна експресија DsRED-а у истом корену, главни корен флуоресцира, али не и бочни коренови, (б1) - млади бочни корен са флуоресценцијом у центру и околном калусу, (б2) - корен који калусира изнутра - флуоресцентне ћелије (к) испуњавају унутрашњост корена, епидермис (е) пуца, (б3) - незрели цветни пупољак (п) са флуоресцентним ћелијама у епидермису, (б4) - увећани приказ доње стране листа са ћелијама дуж лисног нерва и стомама које јаче флуоресцирају, (в1) и (в2) - DsRED<sup>+</sup> клон са јаком DsRED флуоресценцијом и аутофлуоресценцијом на GFP каналу, посебно у задебљалим врховима корена, (в3) и (в4) - ProGasS29 клон са варијабилном DsRED флуоресценцијом и уједначеном GFP аутофлуоресценцијом, (г1) и (г2) - DsRED<sup>+</sup> клон са DsRED флуоресценцијом у листовима и веома слабом аутофлуоресценцијом на GFP каналу, стрелицом је приказан лист без флуоресценције, (г3) и (г4) - GFP<sup>+</sup> клон без флуоресценције - приказан сигнал у оба канала је последица аутофлуоресценције калуса корена, (д1) и (д2) - нови трансформисани коренови на листу инокулисаном ProP450 сојем, (д3) и (д4) - нови трансформисани коренови на листу инокулисаном ProGasS83 сојем, стрелицом је обележен потенцијално GFP<sup>+</sup> корен, (ђ1) и (ђ2) - калус на листу инокулисаном ProP450 сојем, стрелицом је обележен потенцијално GFP<sup>+</sup> калус, (ђ3) и (ђ4) - калус на корену ProP450 клона, неке ћелије јаче флуоресцирају на GFP каналу и представљају потенцијално место експресије.

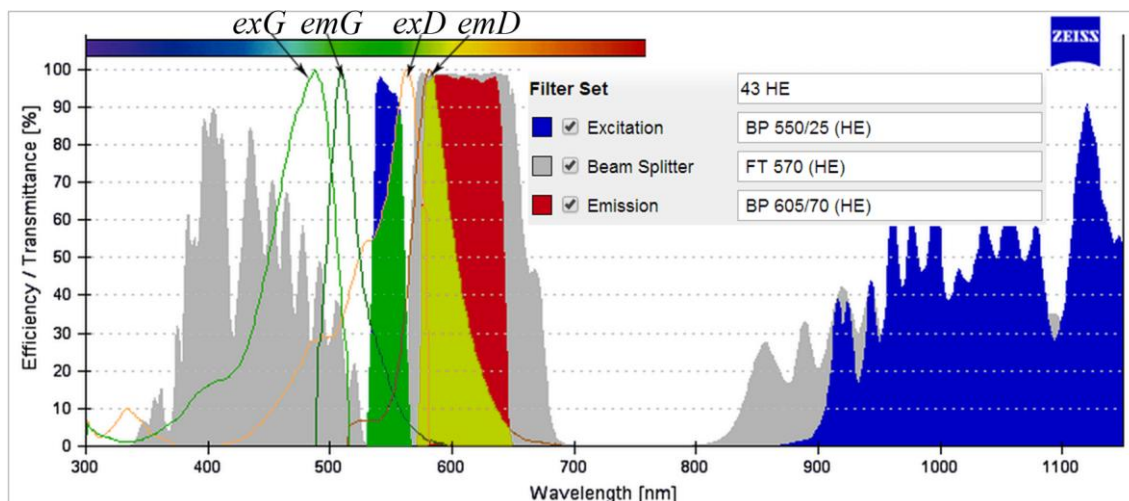


Слика 61. Флуоресцентна анализа препарата корена нетрансформисане биљке, трансформисаних контролних клонова и клонова са промоторским фузијама. Уздужни пресек корена нетрансформисане биљке приказан је под белом светлошћу (а1), а слаба аутофлуоресценција корена на DsRED (а2) и GFP (а3) каналу, са увећаним приказом врха корена са јаком GFP аутофлуоресценцијом уједначене нијансе (а4). Корен биљке трансформисане контролним DsRED конструктом приказан је под белом светлошћу (б1), DsRED флуоресценција основе бочног корена (б2) са увећаним приказом ћелија које флуоресцирају (б3) и сличан регион, ближе врху корена на GFP каналу (б4) са аутофлуоресценцијом различите боје (стрелице). Врхови корена биљке са DsRED контролним вектором приказани упоредо на оба канала (в1 и в2, в3 и в4), где је утврђена колокализација сигнала DsRED флуоресценције на црвеном каналу и жуто-зелене аутофлуоресценције на зеленом каналу (стрелице). Исти феномен примећен је и код клона трансформисаног *ProGasL* конструктом (г1-г2), где је на увећаном приказу приметна потпуно истоветна локализација (г3-г4) DsRED сигнала и жуто-зелене аутофлуоресценције (стрелице). Код других клонова истог конструкта примећено је да неке ћелије на GFP каналу (д2, беле стрелице) одступају по интензитету од очекиваног из DsRED канала (д1), те представљају потенцијално место експресије GFP-а, док је на другим пресецима присутан истоветан распоред и интензитет флуоресцирајућих делова на оба канала (д3-д4). На нивоу појединачних ћелија, колокализација DsRED сигнала и јаче аутофлуоресценције на GFP каналу била је присутна како код DsRED контроле (ђ1-ђ2), тако и код *ProP450* клонова (ђ3-ђ4). "\*" означава снимке направљене монохроматском камером и псеудообојене према одговарајућем каналу - у црвено за DsRED и у зелено за GFP. Остали снимци направљени су камером у боји. На свакој слици означена је дужина експозиције камере у секундама и скала величине.

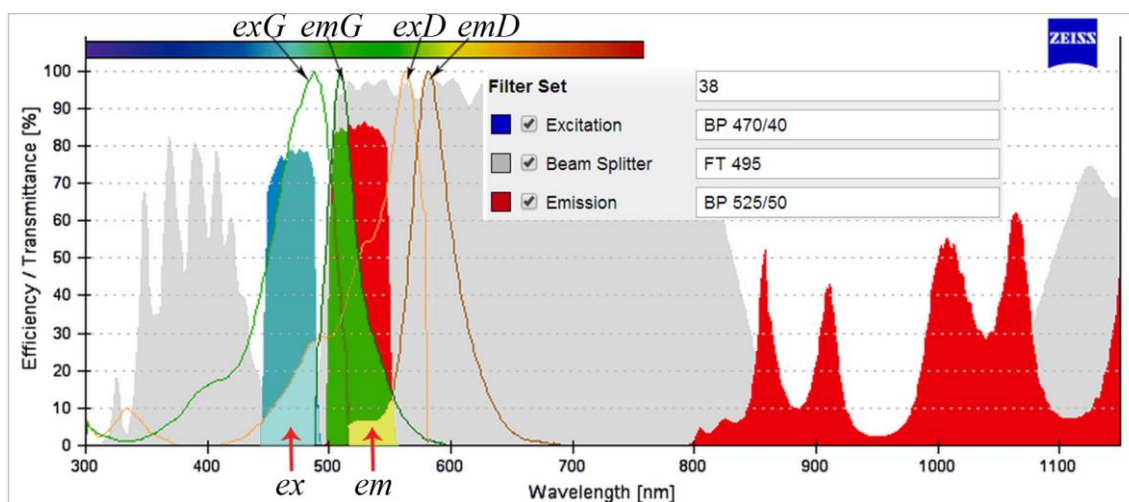


Слика 62. Флуоресцентна анализа препарата стабла, корена, цветног пупољка и листа нетрансформисане биљке, трансформисаних контролних клонова и клонова са промоторским фузијама. Први ред (а1-а4) представља упоредни приказ попречног пресека стабла биљке трансформисане DsRED контролом (а1-а2) и *ProP450* конструктом (а3-а4), где је на GFP каналу видљива плаво-зелена аутофлуоресценција ћелијских зидова и ксилема, и зелено-жута флуоресценција (а2 и а4, стрелице) колокализована са DsRED флуоресценцијом (а1 и а3). Увећани приказ пресека стабла DsRED контроле са слабијом флуоресценцијом, при белој светлости (б1), на DsRED (б2) и GFP каналу (б3), открива добро развијене ксилемске судове са јаком аутофлуоресценцијом на оба канала, и слабом DsRED флуоресценцијом околних ћелија (стрелице), на црвеном каналу (б2), а присутном у истом распореду и на зеленом каналу (б3). Увећани приказ уздужног пресека старијег корена са јасном аутофлуоресценцијом ксилемских судова (б4). Колокализација DsRED сигнала у зеленом каналу видљива је и код попречног пресека цветног пупољка *ProGasL* клона (в1-в2). На увећаном попречном пресеку младог корена *ProGasL* клона (в3-в4) приказана је јача DsRED флуоресценција ближе централном цилиндру корена (леви део слике в3) са појединачним паренхимским ћелијама са видљивим флуоресцентним једрима у десном делу слике, идентично локализованим и на GFP каналу (в4). Врх листа *ProGasL* клона са јаком DsRED флуоресценцијом око лисних нерава (г1) и минималном аутофлуоресценцијом на GFP каналу при истом увећању (г2). На попречном пресеку листа и већем увећању, код *ProP450* клона видљива је јача општа аутофлуоресценција ткива на GFP каналу (г4) са слабом колокализацијом DsRED сигнала из DsRED канала (г3). Детаљ вишећелијске длаке и стоме на листу *ProGasL* клона под белом светлошћу (д1), флуоресценција на DsRED каналу (д2 - дужа експозиција, д3 - краћа експозиција) и аутофлуоресценција на GFP каналу (д4). Доња страна листа истог клона под белом светлошћу (ђ1), на DsRED и GFP каналу (ђ2-ђ3) са видљивом DsRED флуоресценцијом у стомама и ћелијама око лисних нерава. (ђ4) - регион лисног нерва клона DsRED контроле на GFP каналу, са видљиво јачом аутофлуоресценцијом у ћелијама које окружују нерватуру. "\*" означава снимке направљене монохроматском камером и псеудообојене према одговарајућем каналу - у црвено за DsRED и у зелено за GFP. Остали снимци направљени су камером у боји. На свакој слици означена је дужина експозиције камере у секундама и скала величине.

Пажљивијим прегледом спектра коришћених ексцитационих и емисионих филтера, установљено је да је филтер сет 43 HE био одговарајући за визуелизацију специфичне DsRED флуоресценције (слика 63), док је филтер сет 38, иначе препоручен за визуелизацију GFP флуоресценције, истовремено побуђивао и DsRED и визуелизовао део његовог емисионог спектра, ближе жутој боји (слика 64).



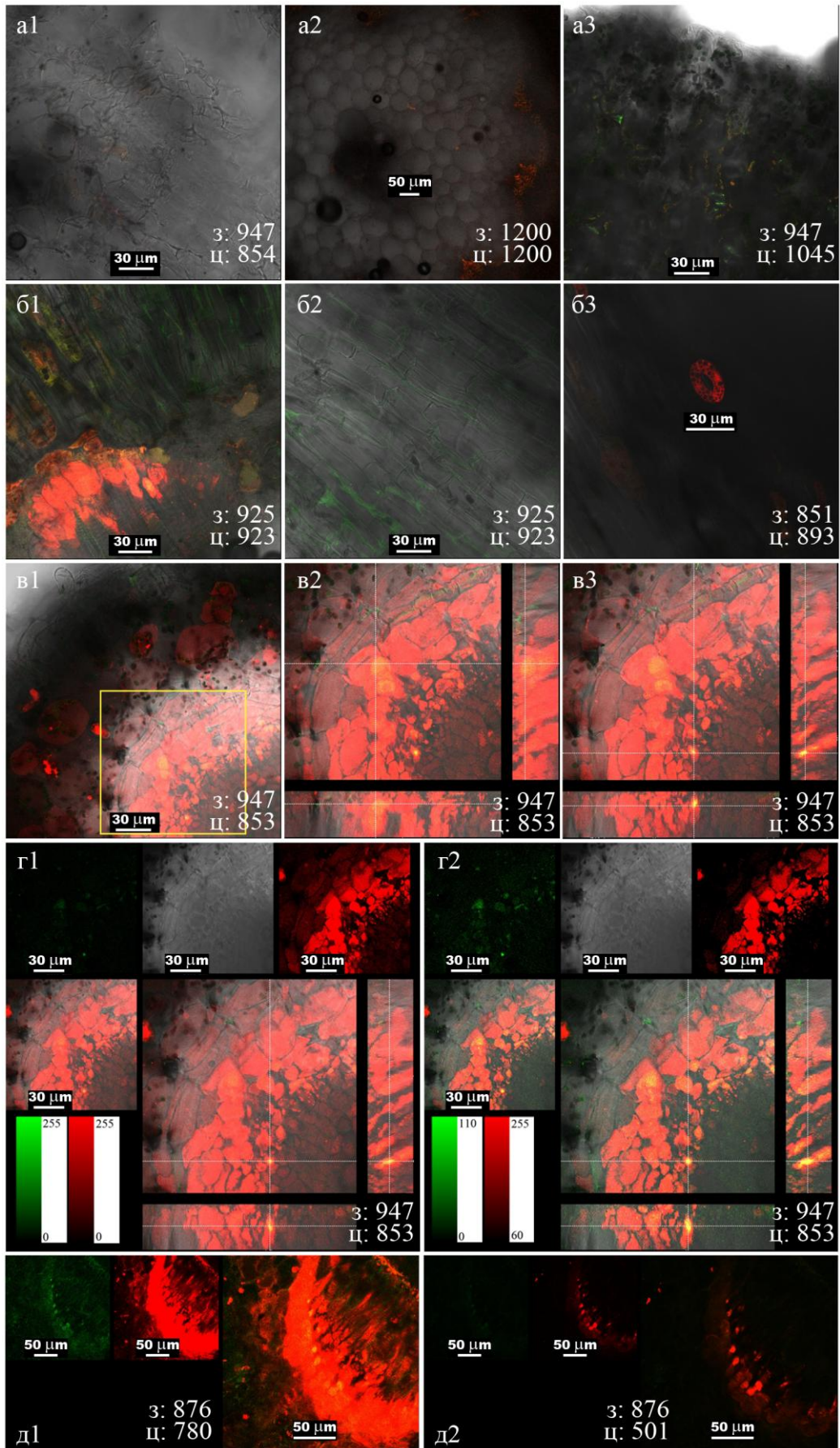
Слика 63. Комбинација филтера за визуелизацију DsRED маркера. Приказани су спектри ексцитације и емисије за eGFP маркер (*exG* и *emG*) и DsRED маркер (*exD* и *emD*). Филтер сет 43 HE је одговарао ситуацији и није било интерференце са GFP сигналом.



Слика 64. Комбинација филтера за визуелизацију GFP маркера. Приказани су спектри ексцитације и емисије за eGFP маркер (*exG* и *emG*) и DsRED маркер (*exD* и *emD*). Филтер сет 38 није био погодан за визуелизацију GFP сигнала у ткиву где постоји и DsRED сигнал. Црвеним стрелицама су обележене зоне мешања сигнала ексцитације (*ex*) и емисије (*em*).

У покушају да се што више елиминише преклапање емисионих спектара ова два маркера, приступљено је конфокалној микроскопији. Флуоресценција је снимана секвенцијално на два канала: за GFP коришћена је ексцитација ласером 488 nm а детекција је рађена у опсегу од 500-525 nm, док је за DsRED коришћен 543 nm ласер, а детектовано између 575 и 600 nm. Опсег GFP детекције је сужен да обухвата емисиони максимум а што више елиминише DsRED емисију. Код нетрансформисане контроле, аутофлуоресценција на оба канала није била јака у корену, а нешто видљивија је била у стаблу и листу, углавном пореклом од ћелијских зидова и хлоропласта (слика 65a1 до a3). Флуоресценција DsRED маркера је детектована код неких клонова трансформисаних *ProGasL* конструктом (б1, в1), док код других није била присутна (б2), што је одговарало опсервацијама начињеним уз помоћ LED система. У листовима, флуоресценција је била приметна само у стомама и много мање у осталим ћелијама (б3). Будући да је, као и на флуоресцентном микроскопу, уочена колокализација зеленог сигнала са црвеним (б1, в1), регион колокализације је посматран увећано и снимљен је *z-stack* - вишеслојан снимак по дубини препарата који се састојао од 30 снимака удаљених по 1  $\mu\text{m}$ . Прегледањем свих региона колокализације на ортогоналној пројекцији, установљено је да се зелени сигнал увек јавља унутар црвеног у ћелијама (в2-в3). Изузетак је зелени сигнал пореклом од аутофлуоресценције хлоропласта и ћелијских зидова, који је био видљив и на контролним пресецима. Манипулисањем снимљених фотографија, тако да се појача видљивост зеленог сигнала (г1-г2), показано је његово још шире присуство у оквиру црвеног сигнала, посебно у ћелијама са изузетно јаком DsRED флуоресценцијом, што је сугерисало да долази до "цурења" DsRED сигнала, зависно од интензитета, у зелени канал. Ово је потврђено смањивањем *gain*-а (релативног мерила амплификације сигнала фотона који се детектују) само црвеног канала (д1-д2), чиме је смањен и сигнал добијен у зеленом каналу. Ово се не би десило да је у питању флуоресценција GFP маркера или друга, независна аутофлуоресценција. Раздвајање флуоресценције ова два маркера је, дакле, било немогуће, без обзира на смањење опсега детекције емисије.





Слика 65. Анализа флуоресценције клонова на конфокалном микроскопу. На свакој фотографији означен је *gain* за зелени канал (з) и црвени канал (ц) и скала величине. Фотографије су псеудообојене према одговарајућем каналу, у зелено за GFP и црвено за DsRED канал, а затим спојене са каналом беле светлости у композитну слику. Аутофлуоресценција корена, стабла и листа нетрансформисане контроле дата је на сликама а1, а2 и а3, редом. Корен клонова трансформисаних *ProGasL* конструктом - клон 21 (б1) је имао јачу DsRED флуоресценцију у ћелијама које окружују ксилемске елементе и слабију у спољашњим паренхимским ћелијама, GFP аутофлуоресценцију пореклом од ћелијских зидова и зелену флуоресценцију која је била колокализована са DsRED сигналом (на слици жућкасто где се два канала преклапају), док је клон 22 (б2) имао само GFP аутофлуоресценцију. У листу клона 21 (б3) јасна флуоресценција је била присутна само у стомама. *ProGasL* клон 2 имао је јаку црвену флуоресценцију у корену (в1) и зелену флуоресценцију колокализовану са DsRED сигналом (жуто на слици). Снимањем *z-stack*-а одабраног региона и посматрањем ортогоналних пројекција дуж хоризонталне и вертикалне осе (в2-в3) потврђена је потпуна колокализација зеленог и црвеног сигнала у ћелијама. Мењањем нивоа осветљености приказа оба канала (г1-г2) добијен је јаснији приказ распореда зеленог сигнала, који је био присутан у ћелијама са најјачом DsRED флуоресценцијом. Мењањем *gain*-а само црвеног канала, постигнуто је драстично смањење сигнала и у зеленом каналу (д1-д2).

#### **4.2.5 RT-PCR и qRT-PCR анализа експресије GFP гена под контролом испитиваних промотора**

Будући да није било могуће визуелизовати активност промотора преко флуоресценције GFP протеина у биљном ткиву, урађена је анализа експресије GFP гена да би се утврдило да ли је промотор функционалан у трансформантима цикорије и у којој мери.

Тестиране су биљке које су носиле неки од четири конструкта за анализу промотора или GFP+ контролу, претходно потврђене на интеграцију трансгена геномским PCR-ом (поглавље 4.2.3). Прикупљен је материјал већине клонова, старости од два до пет месеци, у вегетативном или генеративном стадијуму. Код биљака у стадијуму розете, тестирани су корен и лист, док су код процветалих биљака одвојено тестирани корен, листови, цветови и стабло. Комплетни резултати испитивања експресије дати су у табели 25. Сви тестирани клонови и скоро сви регенеранти су експримирали GFP. Само један регенерант у фази розете, трансформисан *ProGasS83* конструктом, није експримирао GFP ни у листу

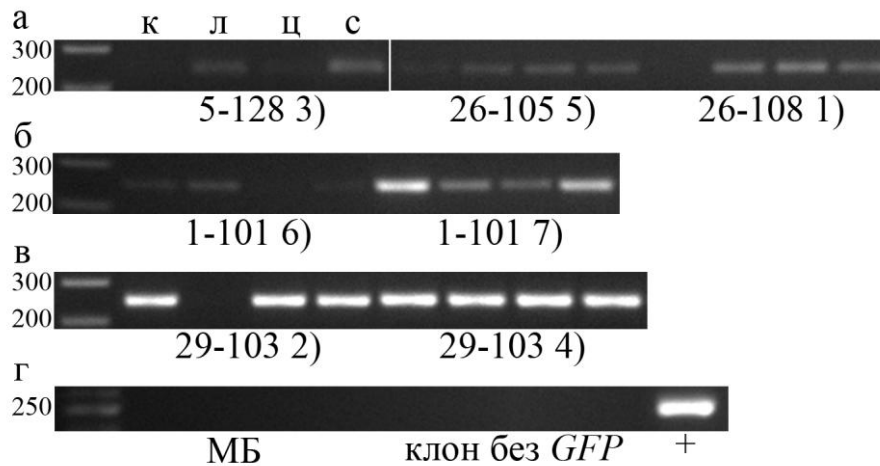
ни у корену. Одређени број биљака није експримирао *GFP* у неком од органа (табела 25, прилог 2), док је већину карактерисала експресија у свим органима.

Табела 25. Тестирање *GFP* експресије. "+" означава број клонова или регенераната код којих је потврђена *GFP* експресија. Потврђеним се сматрају они регенеранти који су имали експресију бар у једном од 4 посматрана дела биљке - корену, листу, цвету или стаблу. Колона "сви / неки органи" говори о томе колико биљака је имало експресију у свим посматраним органима, а коликом броју је недостајала експресија у неком органу.

	тестираних клонова	+	тестираних регенераната	+	розета/ цветала	сви/ неки органи
<i>GFP+</i>	5	5	9	9	0/9	3/6
<i>ProGasL</i>	15	15	36	36	11/29	34/2
<i>ProGasS29</i>	3	3	4	4	0/4	2/2
<i>ProGasS83</i>	20	20	48	47	23/25	43/5
<i>ProP450</i>	4	4	7	7	3/4	4/3
<b>укупно</b>	<b>47</b>	<b>47</b>	<b>104</b>	<b>103</b>	<b>37/71</b>	<b>86/18</b>

Ниво експресије, посредно окарактерисан преко јачине траке на гелу (50 ng *cDNA* по реакцији), разликовао се међу клоновима исте старости, па и међу регенерантима истог клона (слика 66б). Генерално најслабију експресију имали су клонови трансформисани контролним конструктом *GFP+* (слика 66а), што је сугерисало да овај вектор није најпогоднији за трансформацију цикорије у сврху визуелизације *GFP* флуоресценције. Експресија која недостаје у једном органу (нпр. листу) једног регенеранта, док је код другог присутна у свим органима, приказана је на слици 66в. Код мајки биљака и клонова трансформисаним векторима без *GFP* гена, није детектована експресија, што је показало специфичност везивања прајмера за *GFP* секвенцу (слика 66г).

Да би јачина активности промотора, преко нивоа експресије *GFP* гена, била прецизније окарактерисана, одређен је број копија *GFP* транскрипта *qRT-PCR*-ом. Одабран је по један регенерант пореклом од неколико различитих клонова за сваки конструкт, у фази цветања и старости 2,5 месеца. За конструкте са много добијених клонова (*ProGasL* и *ProGasS83*) одабране су биљке са експресијом у свим органима, да би у оквиру њих био упоређен број копија.



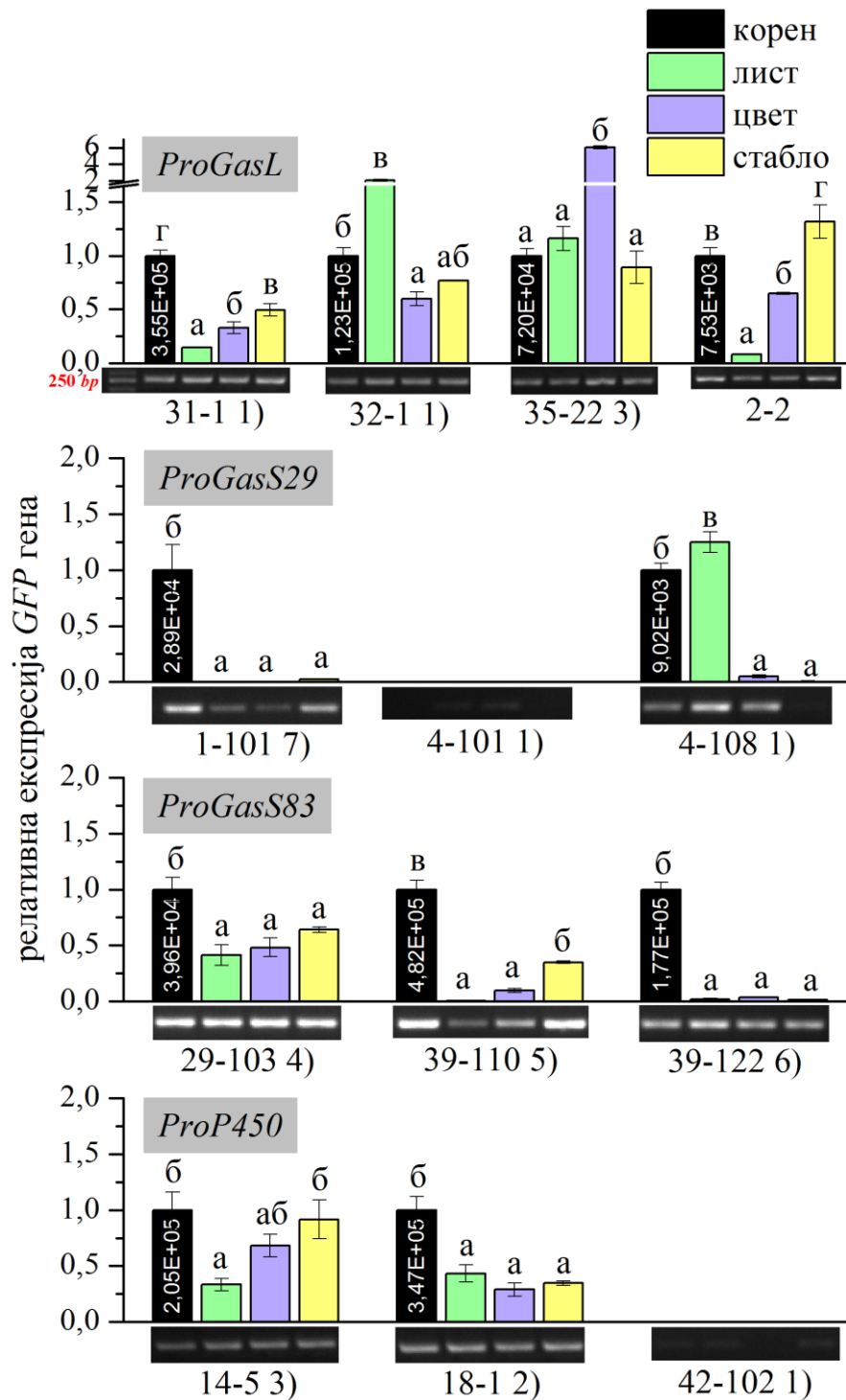
Слика 66. Експресија *GFP* гена - посебни случајеви. (а) - *GFP*<sup>+</sup> клонови са ниским нивоом експресије, (б) - пример разлике у експресији код два регенеранта истог клона трансформисаног *ProGasS29* конструктом, где регенерант 6 клона 1-101 има врло слабу експресију, док регенерант 7 истог клона има средњу до добру, (в) - пример разлике у месту експресије код два регенеранта истог клона (29-103), где регенерант 2 нема експресију у листу, док регенерант 4 има у сва четири органа, к - корен, л - лист, ц - цвет, с - стабло, (г) - мајка биљка и клон трансформисан конструктом без *GFP*-а немају експресију. "+" - векторска ДНК као позитивна контрола. Све приказане биљке су биле исте старости - 2,5 месеци, у стадијуму цветања.

Експресија *GFP* маркера у клоновима *GFP*<sup>+</sup> контроле је била занемарљиво мала (*qRT-PCR* резултати нису приказани), што је одговарало примећеном ниском нивоу експресије при *RT-PCR*-у. Експресија није постојала у МБ биљкама, као ни у биљкама трансформисаним вектором без *GFP* гена, као и у случају *RT-PCR*-а.

Број копија *GFP* транскрипта код свих тестираних клонова указивао је да је *ProGasS29* најслабији промотор (слика 67), са просечно  $6\,297 \pm 3\,602$  копија, док је најјачи био *ProP450* промотор са просечних  $164\,983 \pm 30\,329$  копија. Друга два промотора су по броју копија била интермедијерна, *ProGasL* са  $120\,192 \pm 31\,740$  и *ProGasS83* са  $82\,153 \pm 40\,495$  копије. Највећи број копија нађен је у корену клона 39-110 5) (*ProGasS83*) и износио је 482 331 копија. Јачина промотора одређена на овај начин подударала се са резултатима добијеним у агроинфилтрацији, посматрањем *GFP* флуоресценције (слика 45).

Код регенераната клонова 4-101 1) и 42-102 1) детектоване су занемарљиво мале вредности броја транскрипата (слика 67), што је одговарало ниском нивоу експресије примећеном у *RT-PCR*-у. Код ових клонова, иако интегрисан у биљни геном, *GFP* се веома слабо експримирао, вероватно због утишавања трансгена. Ова претпоставка подржана је резултатима флуоресценције DsRED-а (прилог 1), где је флуоресценција била присутна само код изворних клонова-коренова, а не и код регенерисаних биљака које су тестиране на експресију *GFP* маркера.

Експресија у клоновима *ProGasL*, *ProGasS29*, *ProGasS83* и *ProP450* је затим нормализована према експресији у корену, где је код већине клонова била највиша, ради поређења експресије у различитим органима биљке (слика 67). За клонове трансформисане *ProGasS83* конструктом, *GFP* маркер се статистички значајно највише експримирао у корену сва три клона. Код клонова *ProGasS29* и *ProP450*, по један од два клона су имала највишу експресију у корену, док код *ProGasL* клонова није постојала јасна специфичност према органу и сва четири клона су се разликовала међусобно.



Слика 67. Експресија *GFP* маркера под контролом испитиваних промотора код различитих клонова, одређена *RT-PCR*-ом (гелови) и *qRT-PCR*-ом (графици). *QRT-PCR* резултати су нормализовани према нивоу експресије у корену сваког клона. Различита слова приказују статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) у оквиру истог клона. У клоновима 4-101 1) и 42-102 1) детектоване су занемарљиво мале вредности. Апсолутне вредности броја копија транскрипта су дате у стубићима за корен.

### 4.3 Утишавање *GAS* гена

У циљу карактеризације функције гена гермакрен А синтазе, преко њиховог утишавања у биљкама цикорије, конструисани су вектори за експресију *amiRNA* специфичних за *GAS long* и *GAS short* гене, и цикорија је трансформисана тим конструктима ради индуковања РНК интерференце, утишавања испитиваних гена и анализирања фенотипских и физиолошких ефеката смањења генске експресије.

#### 4.3.1 Конструкција вектора за утишавање гена

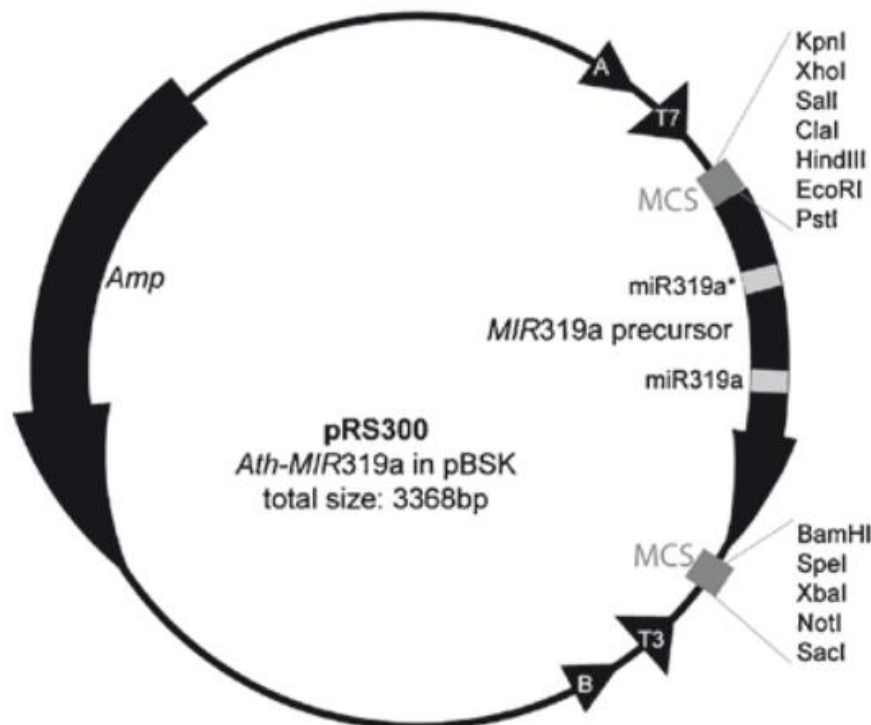


Слика 68. Шема експеримента амплификације и клонирања *amiRNA* конструктата.

Ток експеримента конструкције вектора за утишавање *GAS* гена приказана је на слици 68.

Зарад конструкције *amiRNA* вектора, одабране су секвенце *mRNA GAS* гена цикорије - *CiGASlo* (*Cichorium intybus germacrene A synthase long form mRNA, complete cds; alternatively spliced, AF497999*) и *CiGASsh* (*Cichorium intybus germacrene A synthase short form mRNA, complete cds; alternatively spliced, AF498000*).

За дизајн *amiRNA* конструктора одабран је метод синтезе са темплејт вектора *pRS300*, заменом оригиналне секвенце од 21 *bp* - *miR319a* (слика 69), секвенце за постојећу функционалну микро РНК *Arabidopsis*-а, секвенцом специфичном за утишавање *GAS* гена. Замена се обавља преклапајућим *PCR* реакцијама (поглавље 3.9.2), чиме се добија касета која садржи жељену секвенцу у *sense* и *anti-sense* оријентацији, уметнуту унутар кичме *amiRNA* конструктора, која по експресији у биљци заузима конформацију укоснице (енг. *hairpin*), а која представља окидач утишавања гена.



Слика 69. Темплејт плазмид *pRS300* за синтезу *amiRNA* конструктора, који садржи *miR319a*, у *sense* и *anti-sense* (\*) оријентацији. Преузето из Schwab и сар. (2010).



За одабир специфичне *amiRNA* секвенце и дизајнирање прајмера за њену амплификацију, коришћен је интернет сајт *WMD3 - Web MicroRNA Designer*.

У бази овог сајта постоји база секвенци цикорије (*Cichorium intybus PUT v171a (PGDB)*), али у њој нису постојале анотиране секвенце *GAS* транскрипата. Зато је прво урађена *BLAST* претрага секвенци у бази, поређењем са *FASTA* секвенцама датим у *GenBank*, да би се идентификовале секвенце које представљају *GAS long* и *short* транскрипте у овој бази. На основу сличности секвенци, установљено је да *PUT-171a-Cichorium\_intybus-7634* одговара *GAS long* транскрипту, а *PUT-171a-Cichorium\_intybus-27635* одговара *GAS short* транскрипту.

Даље је приступљено дизајнирању *amiRNA* према жељеним секвенцама. У *Designer* делу интернет сајта, као циљана секвенца убачена је *FASTA* секвенца *mRNA*, а као дозвољени *off-target*, убачена је *PUT* секвенца раније идентификована да одговара тој РНК. Будући да међу овим секвенцама постоје мање разлике, вероватно као последица различитог генотипа секвенцираних узорака, циљ је био да одабрана *amiRNA* има потенцијал да утишава више евентуалних форми транскрипата, базирајући се на делу секвенце где не постоје разлике.

Одабир најбоље *amiRNA* од понуђених резултата (слика 70) зависио је од задовољења неколико услова:

- апсолутна енергија хибридизације *amiRNA* и циљане секвенце не сме да буде мања од  $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , најбоље  $-35$  до  $-40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
- да специфично везује *GAS* транскрипт - *long* или *short*, а да друге транскрипте везује са много мањим афинитетом
- да специфично везује *PUT* секвенцу која одговара датом гену.

Друга два услова су додатно проверавана *BLAST*-ом секвенце одабране *amiRNA* у нуклеотидној и *EST* колекцији цикорије на сајту *NCBI*. Уз помоћ ових услова, одабране су по две *amiRNA* секвенце, специфичне за сваки од два *GAS* гена, дате у табели 26.



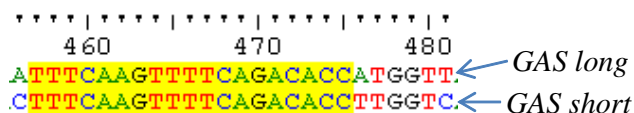
## Designer

Transcript library: Cichorium\_intybus\_v171a.mRNA.PUT.fasta  
 Target genes: gi|20386403|gb|AF498000.1| Cichorium intybus germacrene A synthase short form mRNA, complete cds; alternatively spliced  
 Description: GAS short, our seq, acc off-target 27635  
 Min. number of included targets: 1  
 Accepted off-targets: PUT-171a-Cichorium\_intybus-27635  
 Annotated: 0  
[Download xls](#)

TTATAAGCCTAACATACCTT	-39.28	gi 20386403 gb AF498000	-39.28
TAATAGTTTGTCAAGTGC	-42.25	gi 20386403 gb AF498000	-42.25
TTTTAGCTAGTTGCTTCTCAA	-38.69	gi 20386403 gb AF498000	-38.69
TTCTTAATCTCAATTGTGCAG	-38.30	gi 20386403 gb AF498000	-38.30
TTACGATCAGTTTTCTCACTT	-38.32	gi 20386403 gb AF498000	-38.32
TATATAAGCCTAACATACCTT	-39.98	gi 20386403 gb AF498000	-39.98
TAATGGTCAATATATCCGG	-40.11	gi 20386403 gb AF498000	-40.11
TCATATAAGCCTAACATACCC	-41.75	gi 20386403 gb AF498000	-41.75
TGAATTTGCTCCATAGCACTG	-43.29	gi 20386403 gb AF498000	-43.29
TTCAATCTCTTGAAGAACAG	-40.57	gi 20386403 gb AF498000	-40.57
TGAGAAATACATCCTTGCCTC	-43.89	gi 20386403 gb AF498000	-43.89
TAGAACAGATATGTCAAACCA	-39.68	gi 20386403 gb AF498000	-39.68

Слика 70. Изглед странице са резултатима претраге на примеру *GAS short* секвенце.

Затим је дизајнирана *amiRNA* базирана на региону хомологије *GAS long* и *short* гена, предвиђена да утишава оба гена истовремено. Да би се идентификовао регион хомологије ових гена, њихове секвенце су упоређене и установљен је заједнички део секвенце у дужини од 19 *bp* (слика 71). Будући да секвенца треба да буде дуга 21 *bp*, одлучено је да се продужи за два нуклеотида у 3' правцу.



Слика 71. Регион хомологије *GAS* гена дат у 5'→3' правцу.

Даље модификације су интродуковане мануелно, према саветима из Schwab и сар. (2010) и WMD3 сајта:

- секвенца *amiRNA* треба да почиње са Т - најчешће заступљено у природним *miRNA*

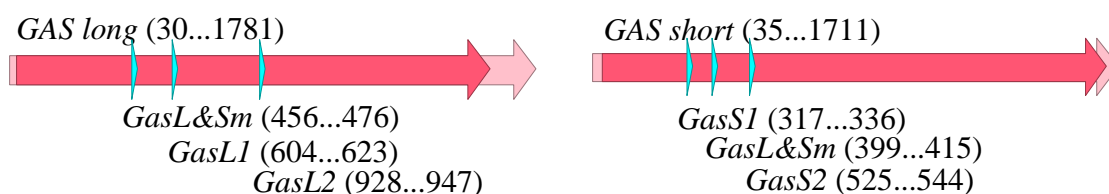
- на местима у *amiRNA* 2-12 не треба да постоје *missmatch*-еви у односу на циљану секвенцу
- на местима 18-21 треба да постоји *missmatch* да би се спречило евентуално ширење ефекта утишавања
- енергија хибридизације треба да буде између  $-35$  и  $-40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

По овим критеријумима, одабрана је секвенца *GasL&Sm* дата у табели 26, чија је специфичност затим проверена *BLAST*-ом, као и за аутоматски генерисане секвенце.

Као алтернатива овом приступу, дизајниране су и фузионисане секвенце, које су састојале од секвенци за појединачне *amiRNA long* и *short*, спојене у једну. Њихова специфичност је такође тестирана, а одабрана је секвенца која је сачињена од *GasL1* и *GasS1* (табела 26). Положај свих одабраних *amiRNA* на секвенцама *GAS* транскрипата приказан је на слици 72.

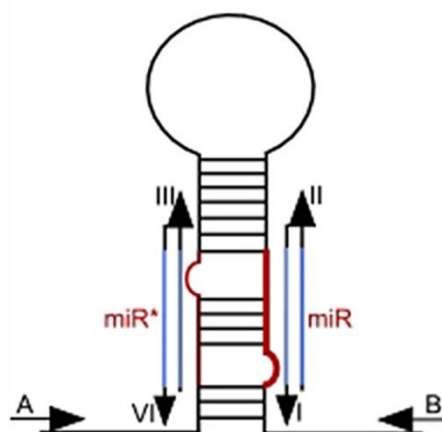
Табела 26. Секвенце одабраних *amiRNA*

име - скраћено име	секвенца
<i>GAS long amiRNA 1 - GasL1</i>	TATCTAAGATATCTTCACCGT
<i>GAS long amiRNA 2 - GasL2</i>	TAATCCATAGGTATATCTCCG
<i>GAS short amiRNA 1 - GasS1</i>	TAATAGTTTGTCAAGCTGCGC
<i>GAS short amiRNA 2 - GasS2</i>	TTCTTAATCTCAATTGTGCAG
<i>GAS long&amp;short manual - GasL&amp;Sm</i>	TAGGTGTCTGAAACTTGGAA
<i>GAS long&amp;short fused - GasL&amp;Sfuse</i>	TATCTAAGATATCTTCACCGT- TAATAGTTTGTCAAGCTGCGC



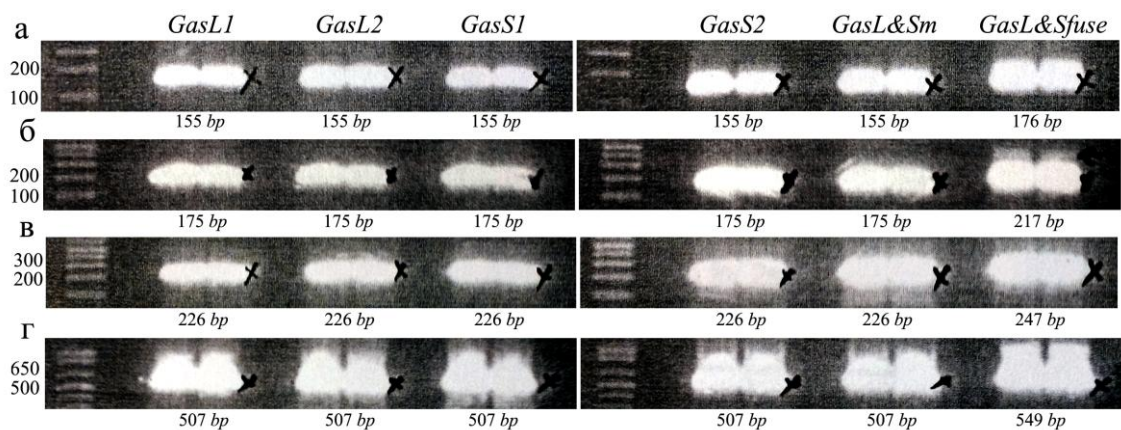
Слика 72. Везивна места одабраних *amiRNA* на секвенцама *GAS mRNA*.

По избору секвенци, дизајнирани су прајмери за њихову амплификацију (табела 11), у модулу *Oligo WMD3* сајта, на основу секвенце *amiRNA* и вектора *pRS300*. Приликом планирања прајмера, алгоритам програма убацује потребне мисмечеве да би се остварило оптимално савијање конструкта облика укоснице. Приликом уношења фузионисане секвенце, ти мисмечеве су добијени само за први део секвенце, а за други су ручно додати, по угледу на појединачне *amiRNA* од којих је фузионисана састављена. Уместо препоручених *A* и *B* прајмера (слика 73) који обухватају читав *amiRNA* прекурсор, дизајнирани су *AmiGatewayA* и *B* прајмери, померени у *MCS* део секвенце, и са додатим *Gateway attB* местима за рекомбинацију (слика 11).



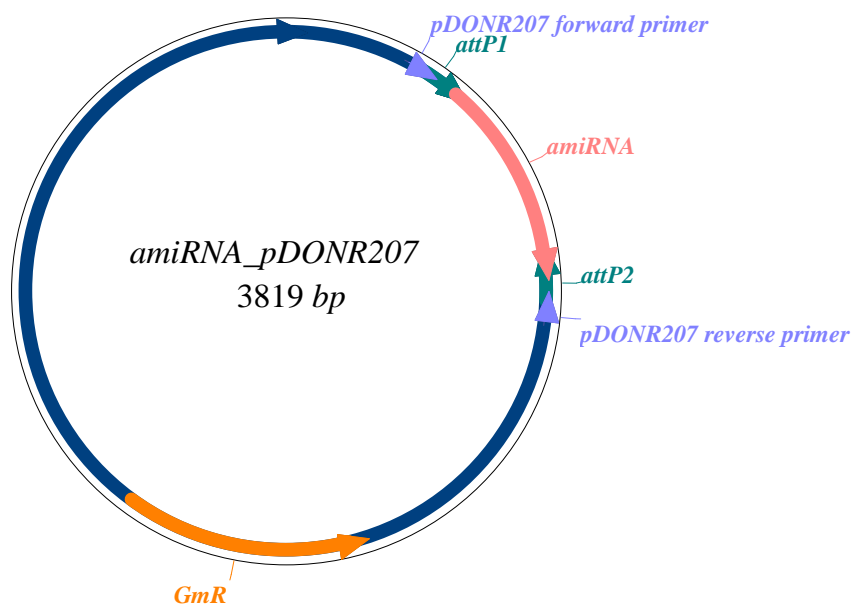
Слика 73. *Hairpin* структура *amiRNA* са приказаним мисмечевима, везивним местима прајмера (*A*, *B*, *I-IV*) и секвенцама које се замењују (*miR* и *miR\**), извор: *WMD3* сајт.

*AmiRNA* су конструисане кроз четири преклапајуће *Phusion PCR* реакције, коришћењем ДНК вектора *pRS300* као темплејта и прајмера специфичних за дату *amiRNA* (поглавље 3.9.2), а производи сваке реакције раздвојени на агарозном гелу и визуелизовани на *UV* трансилуминатору (слика 74). Траке одговарајуће величине су исечене, а ДНК из њих је пречишћена и измерена јој је концентрација. Овим реакцијама је оригинална секвенца *miRNA Arabidopsis*-а замењена дизајнираним секвенцама за утишавање *GAS* гена, са задржаном оригиналном *hairpin* структуром.



Слика 74. Преклапајуће *PCR* реакције за конструкцију *amiRNA*. Сlike а - г одговарају реакцијама а) - д) из поглавља 3.9.2.

Пречишћени продукти са *attB* местима на крајевима рекомбиновани су са *pDONR207* вектором у *Gateway BP* реакцији, чиме су добијени *entry* клонови са *amiRNA* инсертима (слика 75).



Слика 75. Изглед *amiRNA* инсерта у *pDONR207* вектору после рекомбинације.

Ради умножавања и селекције правилно рекомбинованих вектора, хемијски компетентне ћелије *E. coli XL-1 Blue* трансформисане су мешавином из *BP* реакције. Након опоравка, ћелије су селековане на гентамицину. По четири колоније од сваког *amiRNA* конструкта тестирано је *colony PCR*-ом на присуство инсерта са *pDONR207* прајмерима. По две колоније са јаком траком на гелу

специфичне величине и без неспецифичне амплификације, одабране су за наставак експеримента. Те колоније су сачуване као глицерол штокови и из њих је изолована плазмидна ДНК.

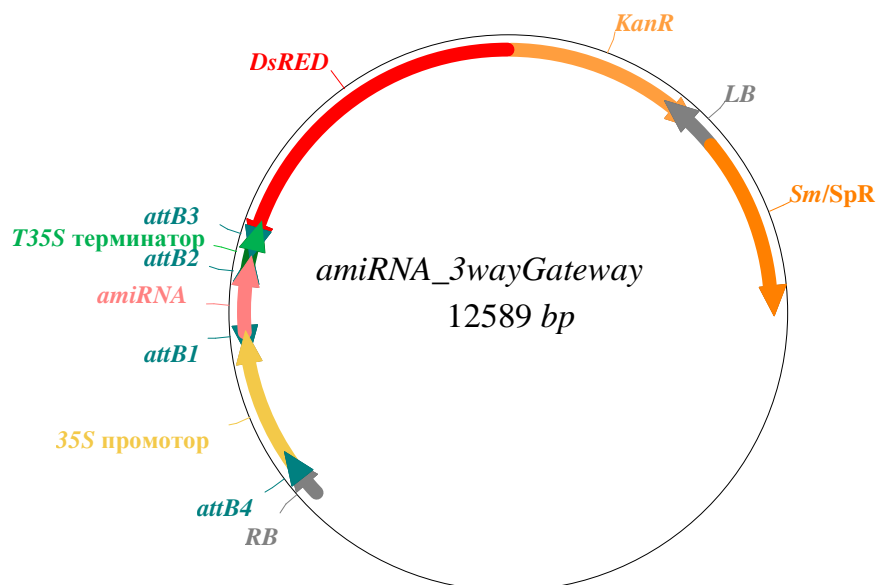
ДНК позитивних колонија је секвенцирана вишеструким реакцијама, уз помоћ прајмера из табела 11 и 20, да би била покривена цела секвенца, јер је секвенцирање било отежано присуством секундарних структура *amiRNA*. *Alignment* теоријских секвенци добијених рекомбинацијом *in silico*, и оних добијених секвенцирањем инсерата у *pDONR207* вектору потврдио је успешност клонирања секвенце *amiRNA*, њихову очекивану позицију у вектору и тачност *amiRNA* секвенце (слика 76). У зависности од резултата секвенцирања, изабран је по један клон са најпрецизнијом секвенцом од сваког конструкта за наставак експеримента.



Слика 76. Део поређења секвенци између теоријске секвенце *GasS2* (обележено црним) и секвенце две тестиране колоније.

ДНК вектора одабраних клонова рекомбинована је даље у *three-way Gateway LR* реакцији са векторима *242 pKGW*, *365 pENTR* и *373 pENTR*, чиме су добијени готови експресиони вектори за трансформацију биљака, у којима су *amiRNA* фузионисане са *35S* промотором и терминатором (слика 77). Продукти реакције су трансформисани у хемијски компетентне ћелије *E. coli* и колоније су селектоване на спектиномицину.

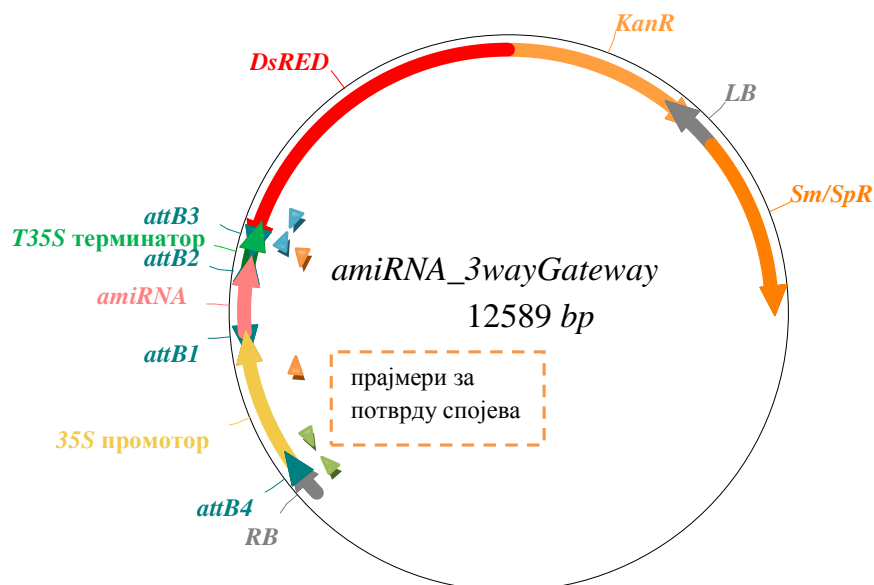
Настале колоније су тестиране *colony PCR*-ом на присуство инсерта (са *AmiGatewayA* и *B* прајмерима, табела 11), а затим проверене на одсуство секвенце *pDONR207* вектора (са *pDONR207* прајмерима, табела 12). Одговарајуће колоније су сачуване као глицерол штокови и из њих је изолована плазмидна ДНК.



Слика 77. Изглед готовог експресионог вектора за трансформацију биљака. *CcdB* ген је замењен касетом *35S* промотор - *amiRNA* - *35S* терминатор. *DsRED* - ген за црвени флуоресцентни протеин, и ген за резистенцију на канамицин (*KanR*), представљају маркере за котрансформацију и селекцију биљака.

Ради финалне потврде интегритета конструката, дизајнирани су прајмери који амплификују спојеве *242* вектора и *35S* промотора, промотора и терминатора (са *amiRNA* секвенцом између), и терминатора и *242* вектора (слика 78 и табела 15), урађен је *PCR* на плазмидној ДНК, и добијањем специфичних продуката одговарајуће величине, потврђена је правилна интеграција и оријентација промотора у финалном вектору.

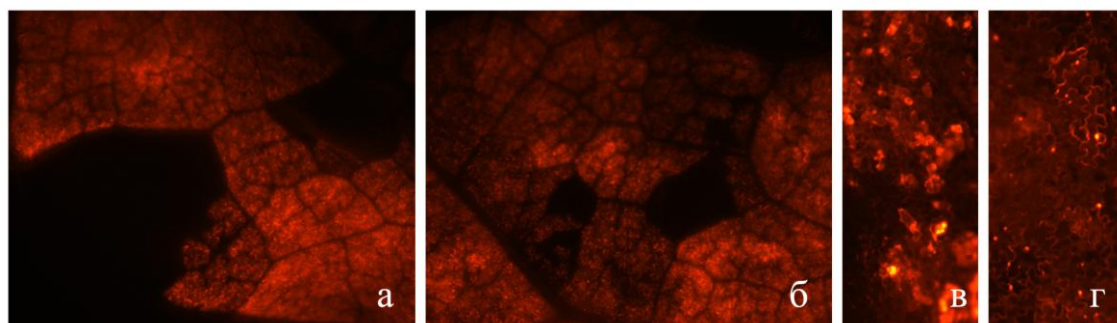
Потврђени вектори су пребачени у одговарајуће сојеве агробактерија - *A. tumefaciens* *C58C1* за агроинфилтрацију, и *A. rhizogenes* *A4M70GUS* за трансформацију цикорије. Агробактерије су трансформисане електропорацијом, селектоване на спектиномицину и проверене *colony PCR*-ом на присуство инсерта. Позитивне колоније су сачуване у виду глицерол штока.



Слика 78. Места везивања прајмера дизајнираних да потврде правилно клонирање *amiRNA* инсерта су означена стрелицама.

### 4.3.2 Провера конструктора агроинфилтрацијом

Функционалност експресионих вектора за *amiRNA* проверена је агроинфилтрацијом на зеленој салати. Флуоресценција DsRED маркера детектована је након 5 и 11 дана по инфилтрацији, код свих конструисаних вектора, потврђујући интегритет вектора и ефикасност маркера. Експресија је уочена искључиво у инфилтрираним деловима листа, док је на увећаном приказу флуоресценција уочена у цитоплазми и једру ћелија епидермиса (слика 79).



Слика 79. Флуоресценција DsRED маркера у листовима инфилтрираним *GasL1* (а) и *GasS1* (б) конструкторима. На увећаним деловима лица (в) и наличја листа (г), уочљива је флуоресценција цитоплазме и једара.



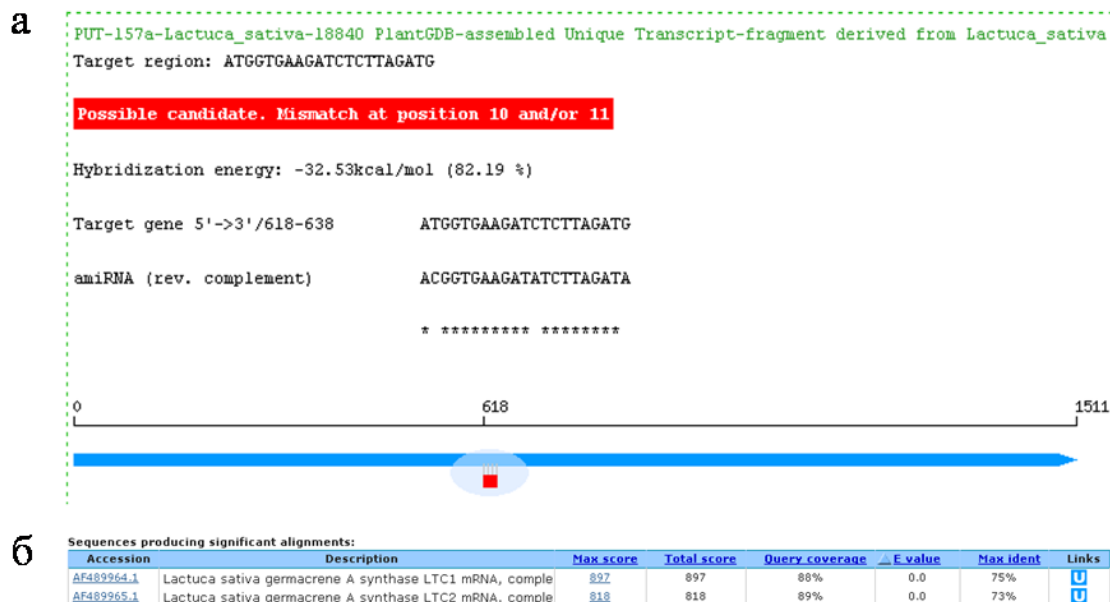
#### 4.3.2.1 Ефекат пролазне трансформације агроинфилтрацијом на садржај гвајанолида и експресију *GAS* гена салате

Пошто је салата биљка сродна цикорији и синтетише исте типове гвајанолида, проверена је могућност везивања *amiRNA* конструктора за *LTC1* и *LTC2*, две варијанте *mRNA* за гермакрен А синтазу салате (*GenBank AF489964.1* и *AF489965.1*). Претрагом *EST* базе секвенци салате у *Target search* делу *WMD3* сајта, и упоређивањем са сваком од шест дизајнираних *amiRNA*, пронађене су *EST* секвенце које се везују за пет од шест *amiRNA* конструктора (слика 80), са максимално три мисмеча (*GasS1* конструктор се није везивао ни за једну секвенцу са мање од пет мисмечева). Од тога су *GasL1*, *GasL2* и *GasL&Sm* конструктори имали по једну *EST* секвенцу коју су везивали енергетски повољно (енергија хибридизације је била мања од  $-35 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). BLAST-овањем тих *EST* секвенци у NCBI бази нуклеотида, утврђено је да постоји висока подударност са секвенцама *LTC1* и *LTC2 mRNA* (слика 80) за сваку од пронађених *EST* секвенци. На основу овога је закључено да постоји могућност да барем три *amiRNA* направљене за утишавање гена цикорије, *GasL1*, *GasL2* и *GasL&Sm*, утишавају и *LTC* гене салате. Будући да постоје разлике у секвенцама изолованих *LTC* гена, *mRNA* и *EST* секвенци, а не постоје секвенце генотипа салате коришћеног у агроинфилтрацији, очекивана ефикасност утишавања *LTC* гена може да варира.

Пет дана након инфилтрације, листови инфилтрирани конструкторима *GasL1*, *GasL2*, *GasS2* и *GasL&Sm* су тестирани *UPLC-MS* и *qRT-PCR* техникама на промене у садржају једињења и експресији гена.

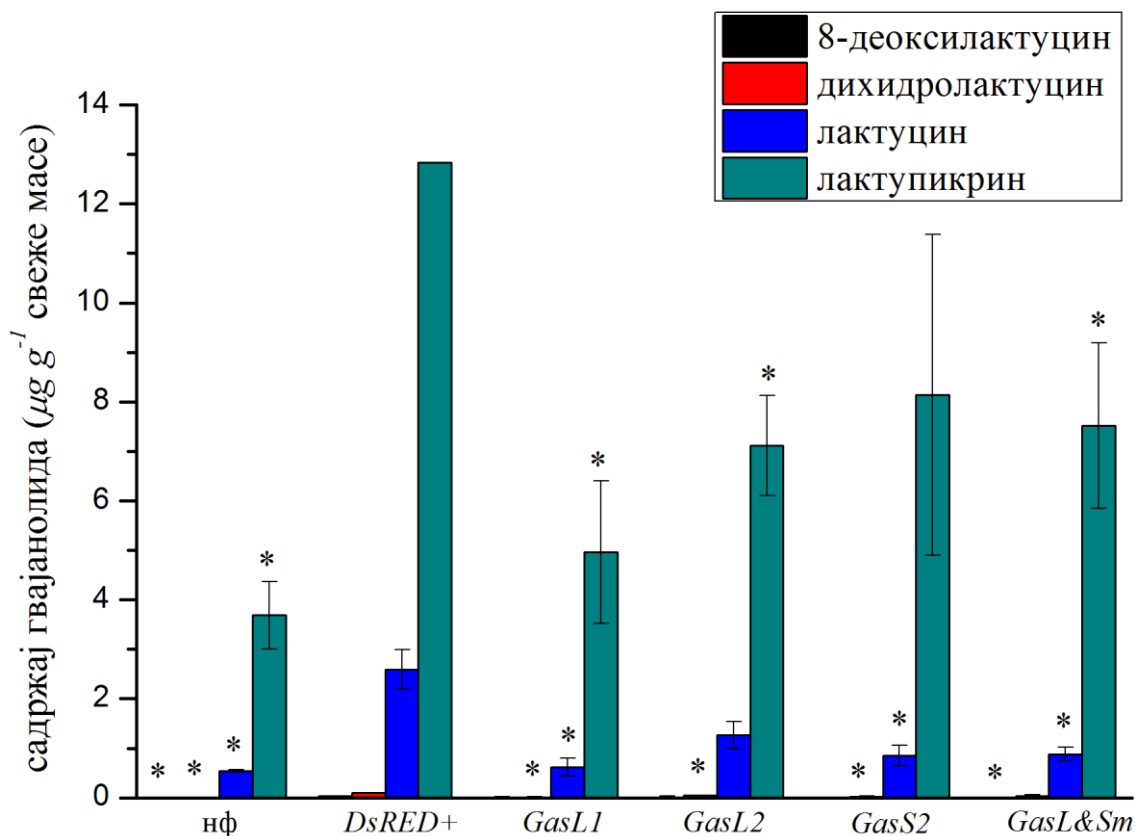
Гвајанолиди су детектовани у ниској концентрацији у листовима зелене салате (слика 81). Лактуцин и лактупикрин су били присутни у мерљивој концентрацији, док су друга два једињења у веома ниској концентрацији, често испод границе детекције уређаја. Инфилтрација *DsRED+* контролним вектором, без *amiRNA* конструктора, довела је до пораста посматраних једињења у односу на неинфилтрирану контролу (слика 81). Ни у једном од узорака инфилтрираних конструкторима за утишавање није уочено смањење концентрације једињења у односу на неинфилтрирану контролу, али је уочен статистички значајан пад

дихидролактуцина, лактуцина и лактупикрина у односу на узорке инфилтриране контролним вектором.



Слика 80. Пример једне *EST* секвенце за коју се потенцијално везује *GasL1* конструктор, са повољном енергијом хибридизације (а). Упоредивањем те секвенце са *mRNA* секвенцама салате (б), установљена је висока сличност са *LTC1 mRNA* (75% идентичних нуклеотида са 88% покривености секвенце) и *LTC2 mRNA* салате (73% идентичних нуклеотида са 89% покривености секвенце).

Из истих инфилтрираних узорака, анализирана је експресија *LTC1* и *LTC2* гена. За сваки конструктор мерена је експресија у три инфилтрирана листа различитих биљака, и постојала је велика варијабилност у броју копија транскрипата (табела 27). На основу увида у појединачне вредности броја копија транскрипата, могуће је да није у свим листовима дошло до утишавања гена, већ само у неким. Узорци где је детектовано драстично смањење броја копија у односу на контроле су обележени црвеним у табели.



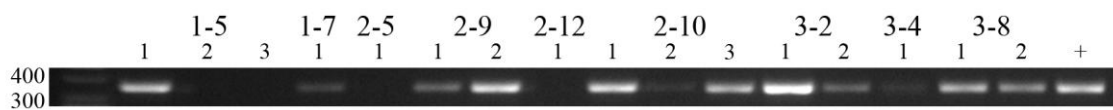
Слика 81. Садржај гвајанолида у нефилтрираним листовима салате (неф), листовима инфилтрираним контролним *DsRED+* вектором и конструктима за утишавање гена. Приказане вредности представљају средњу вредност и стандардну грешку мерења три инфилтриране биљке. Поређење средњих вредности је вршено у оквиру једног једињења, у односу на *DsRED+* контролу. "\*" означава вредности статистички значајно различите у односу на *DsRED+* контролу ( $p < 0,05$ ).

Табела 27. Појединачне вредности броја копија транскрипата *LTC* гена у три различите биљке (1-3). Црвеним су обележене вредности где је могуће да је дошло до утишавања гена.

	<i>LTC1-1</i>	<i>LTC1-2</i>	<i>LTC1-3</i>	<i>LTC2-1</i>	<i>LTC2-2</i>	<i>LTC2-3</i>
неинфилтрирана контрола	620,73	646,09	349,66	4102,07	308,74	395,59
<i>DsRED+</i>	4291,29	13491,19	-	845,75	5720,29	25160,51
<i>GasL1</i>	5335,54	90844,01	786,31	6604,15	131614,3	1482,58
<i>GasL2</i>	41838,13	15,73	4496,5	25920,32	611,85	4218,88
<i>GasS2</i>	23398,86	35,87	11,24	24395,48	83,19	4,61
<i>GasL&amp;Sm</i>	18,11	10,45	566,41	81,67	85,97	246,16

### 4.3.3 Трансформација цикорије *A. rhizogenes* сојевима који носе конструкте за утишавање гена

За трансформацију цикорије конструктима за утишавање гена, изабран је *A4M70GUS* сој, због боље учесталости трансформације. Од конструисаних *amiRNA* вектора, изабрана су три за трансформацију цикорије - *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm*. Инокулисано је по два листа од по пет биљака старих 5-10 недеља за сваки конструкт посебно. После 10 дана од трансформације формирали су се први коренови, који су одсецани и гајени одвојено. Након месец дана, у култури коренова дошло је до спонтане регенерације пупољака, који су пажљиво одвајани, гајени засебно и након месец дана тестирани на присуство трансгена (слика 82, табела 28). Од укупног броја тестираних клонова, код око 63% је потврђено присуство трансгена. Код одређених клонова уочене су разлике у присуству трансгена у регенерантима (слика 82), и из тих разлога тестирано је до шест различитих биљака сваког клона. Трансформисани регенеранти су даље гајени до потпуног формирања свих вегетативних органа. Корен тих регенераната је изолован и даље субкултурисан, а остатак биљке узоркован за мерење експресије гена и садржаја секундарних метаболита. Добијени регенеранти се по морфологији нису значајно разликовали од осталих трансформисаних биљака цикорије.

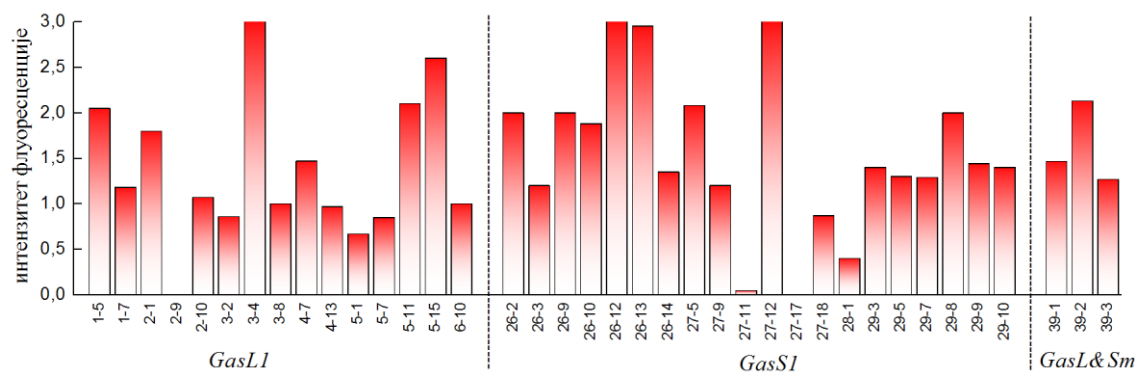


Слика 82. Провера трансгене природе (интеграција *DsRED* гена) дела клонова на примеру трансформисаних *GasL1* конструктом. Горњи ред бројева представља ознаке клонова, а доњи ознаке регенераната тих клонова (1 до 3). Присутни су клонови са мешовито трансформисаним регенерантима (клон 1-5), нетрансформисани клонови са по једним регенерантом (клонови 2-5 и 2-12) и трансформисани клонови са једним или више регенераната (клонови 1-7, 2-9, 2-10, 3-2, 3-4 и 3-8). "+" је векторска ДНК као позитивна контрола.

Табела 28. Збирни приказ ефикасности трансформације цикорије сојевима са векторима за утишавање гена. "+" означава број клонова или регенераната код којих је потврђена трансформација.

	иницијалних клонова	преживелих клонова	тестираних клонова	+	+
				клонова	регенераната
<i>GasL1</i>	90	37	27	15	46
<i>GasS1</i>	64	37	28	20	72
<i>GasL&amp;Sm</i>	23	8	5	3	7
<b>укупно</b>	<b>177</b>	<b>82</b>	<b>60</b>	<b>38</b>	<b>125</b>

За клонове код којих је потврђена трансформација, одређена је средња вредност интензитета флуоресценције користећи додељене нумеричке вредности (слика 83, базирано на прилогу 3). За сваки клон, поређени су интензитети флуоресценције корена примарне *HR* културе и културе корена регенераната потеклих од ње. Поређене су културе старости 1, и 1,5 месеци. Културе коренова мајки биљака нису поседовале DsRED флуоресценцију, што је било очекивано.



Слика 83. Интензитет DsRED флуоресценције *HR* клонова (обележених бројевима) трансформисаних конструктима *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm* конструктима.

Током праћења флуоресценције корена примарних *HR* култура и култура корена њихових регенераната, примећене су следеће правилности (прилог 3):

- Коренови примарних *HR* култура су имали јачу флуоресценцију од корена њихових регенераната при истој старости културе. Код 55% клонова регистрована је јача флуоресценција примарних култура, док је код 40% клонова флуоресценција била јача код регенераната.

- Различити регенеранти исте старости, а пореклом од истог клона, разликовали су се међусобно у нивоу флуоресценције, што је било уочљиво код 55,56% клонова.
- Интензитет флуоресценције је растао са дужином гајења културе, мерено током 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 и 5 месеци. Старији коренови истог регенеранта имали су јачу флуоресценцију од млађих код 60% регенераната.
- Код нешто већег броја регенераната (52,38%), ниво флуоресценције је опадао са бројем пасажа, односно са укупном старашћу културе од датума одвајања са биљке, док је код 40,48% остао исти.
- У 7,27% случајева, флуоресценција је била присутна само у првим пасажима изворног клона или регенеранта, док се у каснијим потпуно изгубила.
- 5,26% клонова није флуоресцирало ни у једном пасажу од трансформације.

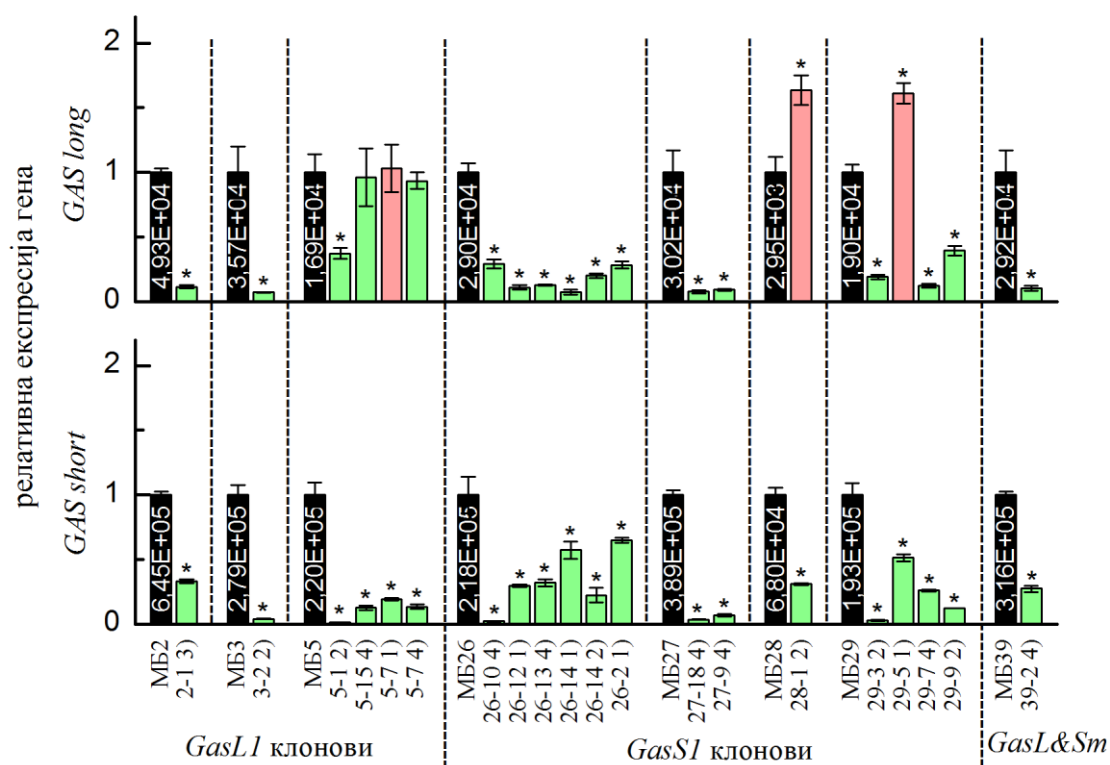
#### **4.3.4 Потврда утишавања *GAS* гена мерењем нивоа експресије гена**

Ради утврђивања ефекта утишавања гена код клонова трансформисаних *amiRNA* конструктима, поређена је експресија *GAS long* и *GAS short* гена између нетрансформисаних мајки биљака (МБ) одабраних регенераната неколико различитих трансформисаних клонова који су проистекли од њих (слике 84 и 85).

Генерално гледано, *GAS short* је имао вишу експресију за око један ред величине код већине мајки биљака, и у корену и у надземном делу биљке у односу на *GAS long*. Такође, оба гена су се више експримирала у корену него у изданку код скоро свих нетрансформисаних биљака (слике 84 и 85).

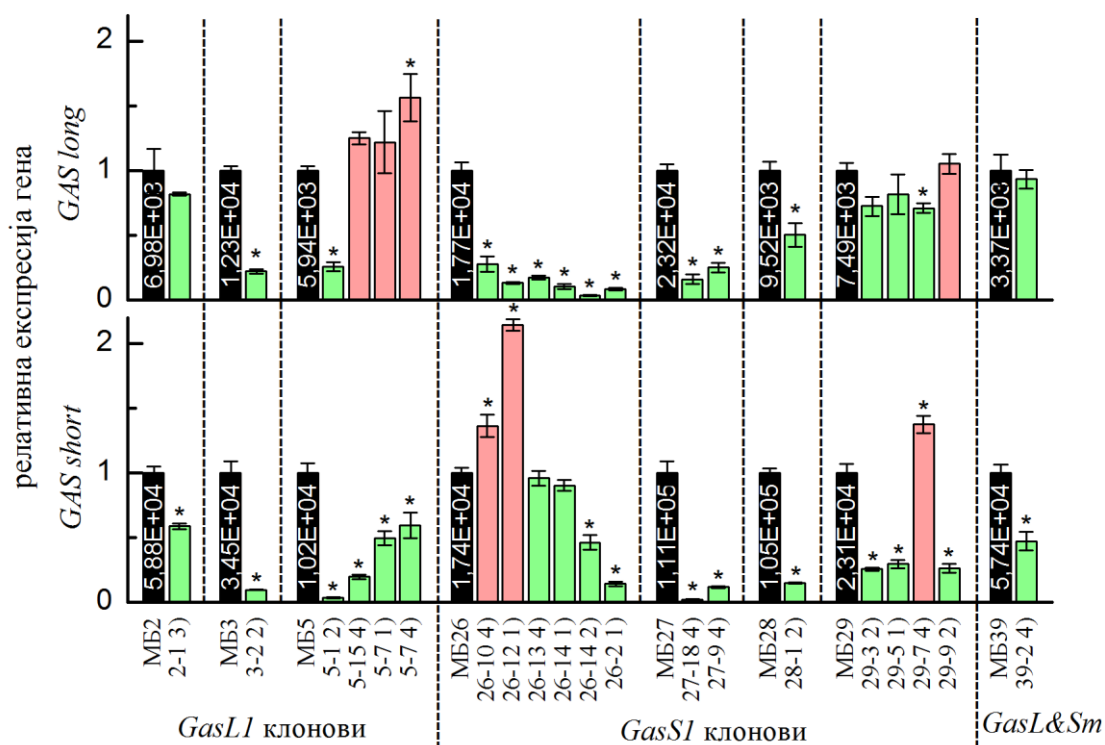
Утишавање гена примећено је бар код једног трансформисаног клона-регенеранта у свакој групи мајке биљке и њених клонова, а сви клонови су имали смањење експресије бар једног од ова два гена, у корену или у надземном делу. Конкретно стање експресије зависило је од посматраног клона, органа и гена, а

статистички значајно смањење експресије оба гена истовремено у оба посматрана дела биљке добијено је код 2 клона-регенеранта трансформисана са *GasL1* (3-2 2) и 5-1 2)) и 4 клона трансформисана са *GasS1* (26-14 2), 26-2 1), 27-18 4) и 27-9 4)) (слике 84 и 85). Ниво смањења експресије у односу на нетрансформисану биљку разликовао се међу клоновима, а ефекат утишавања је био више приметан на *GAS short* гену. За *GAS long* ген максимално смањење је било 30 пута у односу на мајку биљку (26-14 2) у изданку), док је за *GAS short* ген то било 70 пута (5-1 2) у корену). Уочено је да *amiRNA* конструкти - *GasL1* и *GasS1*, нису специфично утишавали *GAS long* или *GAS short* ген, већ су, као и *GasL&Sm*, утишавали оба истовремено.



Слика 84. Релативна експресија *GAS* гена у корену трансформисаних и нетрансформисаних биљака. МБ - мајка биљка, нетрансформисана биљка од које су добијени трансформисани клонови. Експресија је релативизирана за сваки регенерант одговарајућег клона према његовој МБ, а са "\*" су означене вредности статистички значајно различите од МБ ( $p < 0,05$ ). Приказане вредности представљају средњу вредност и грешку три мерења. Апсолутне вредности, пре релативизације, су дате у стубићима за сваку МБ. Црни стубићи означавају вредности МБ биљака, зелени представљају мање а црвени веће вредности од МБ. *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm* клонови су трансформисани одговарајућим *amiRNA* конструктом.

У корену биљака (слика 84), сви клонови су имали значајно смањење експресије *GAS short* гена у односу на мајке биљке, док смањење *GAS long* гена нису имали клонови чије су мајке биљке имале мању експресију од осталих МБ (испод  $1,90 \cdot 10^4$  копија). У надземном делу (слика 85), у свим клоновима је била смањена експресија барем једног од два гена - где није значајно смањен *GAS long*, смањен је *GAS short* и обрнуто. У изданку је примећено, у случају неких клонова, да је *GasL1* конструкт утишавао боље *GAS short* ген, а *GasS1* конструкт *GAS long* ген. Три од четири клона мајке биљке 5 имали су утишан искључиво *GAS short* ген, и у изданку и у корену.

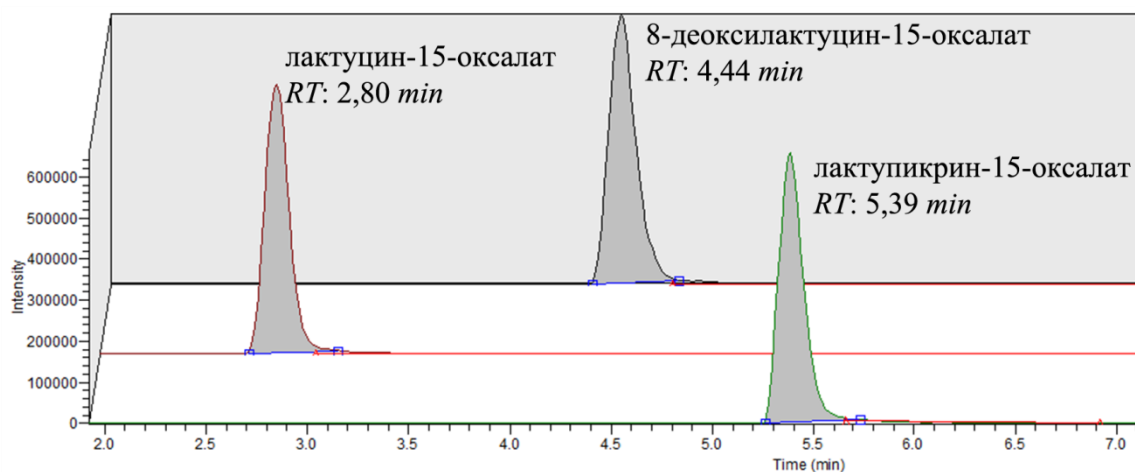


Слика 85. Релативна експресија *GAS* гена у изданку трансформисаних и нетрансформисаних биљака (МБ). Експресија је релативизирана за сваки регенерант одговарајућег клона према његовој МБ, а са "\*" су означене вредности статистички значајно различите од МБ ( $p < 0,05$ ). Приказане вредности представљају средњу вредност и грешку три мерења. Апсолутне вредности, пре релативизације, су дате у стубићима за сваку МБ. Црни стубићи означавају вредности МБ биљака, зелени представљају мање а црвени веће вредности од МБ. *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm* клонови су трансформисани одговарајућим *amiRNA* конструктом.

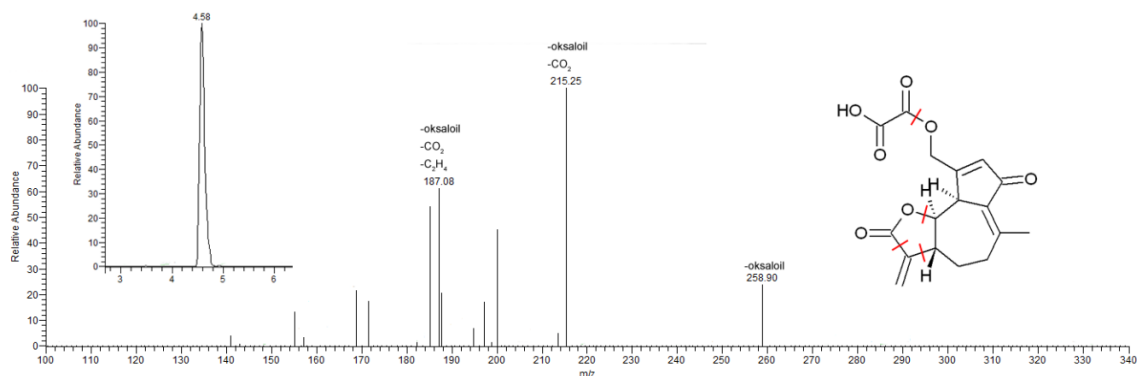


#### 4.3.5 Ефекат утишавања *GAS* гена на садржај секундарних метаболита

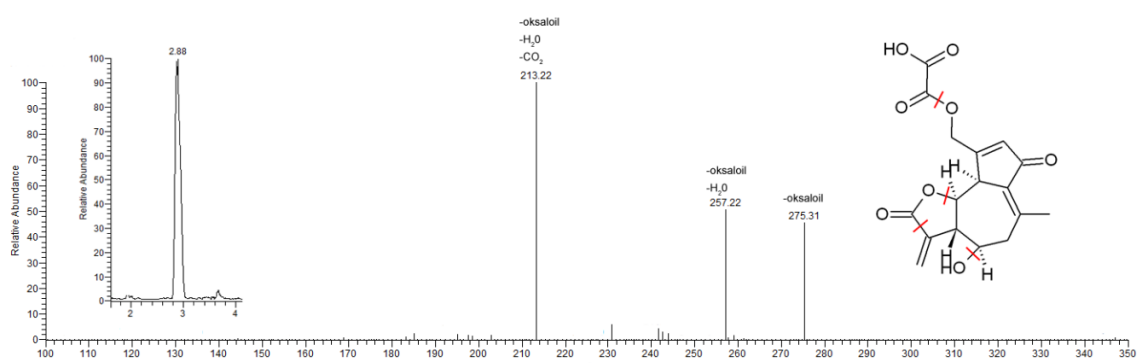
У циљу испитивања утицаја утишавања *GAS* гена на продукцију метаболита низводно у путу биосинтезе, поређен је садржај три сесквитерпенска лактона у форми оксалата: 8-деоксилактуцин-15-оксалата, лактуцин-15-оксалата и лактупикрин-15-оксалата, између нетрансформисаних мајки биљака и одговарајућих трансформисаних клонова. Анализе садржаја оксалата гвајанолида обављене су из истих узорака као за поређење експресије гена. Било је очекивано да смањење експресије *GAS* доведе до смањења продукције наведених сесквитерпенских лактона у трансформантима. Ова три сесквитерпенска лактона су идентификована на основу специфичне фрагментације у негативном *PrIS* моду (поглавље 3.21). Карактеристична ретенциона времена и масени прелази са позицијама фрагментација за свако од три једињења су дати на сликама 86-89.



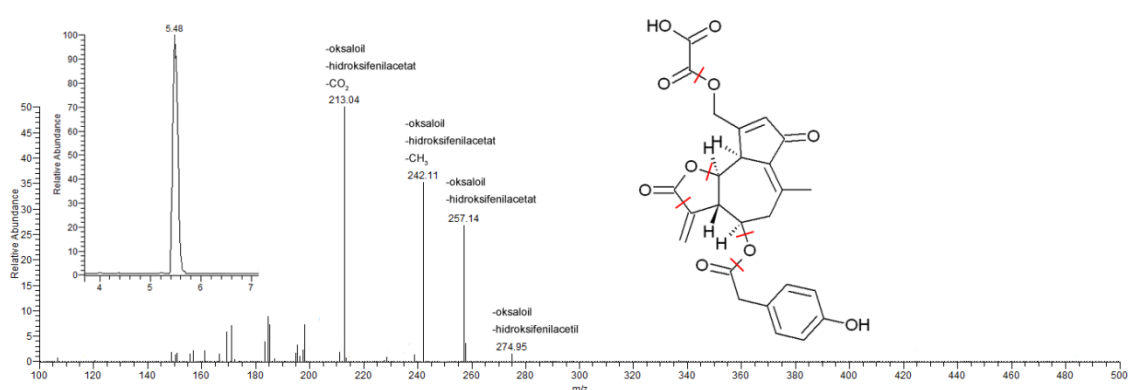
Слика 86. Детектована једињења са ретенционим временима (*RT*).



Слика 87. Карактеристични масени прелази за 8-деоксилактучин-15-оксалат су 331→259 (-72 = C<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, губитак оксалоил групе), 331→215 (-116 = губитак оксалоил групе и угљен-диоксида) и 331→187 (-144 = губитак оксалоил групе, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> и угљен-диоксида). Позиције фрагментација су назначене шематски на слици.



Слика 88. Карактеристични масени прелази за лактуцин-15-оксалат су 347→275 (-72 = C<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, губитак оксалоил групе), 347→257 (-90 = губитак оксалоил групе и воде) и 347→213 (-134 = губитак оксалоил групе, воде и угљен-диоксида). Позиције фрагментација су назначене шематски на слици.

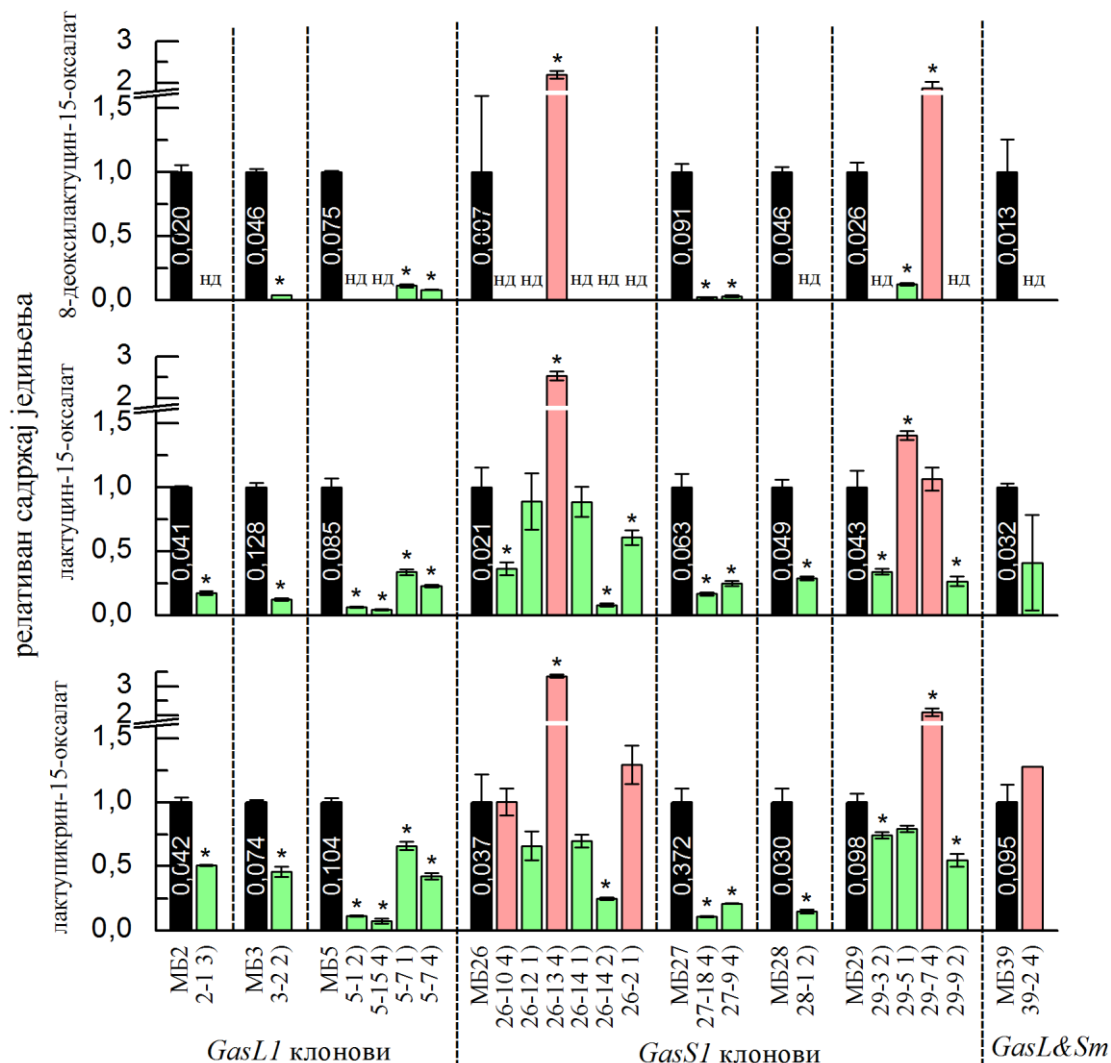


Слика 89. Карактеристични масени прелази за лактупикрин-15-оксалат су 481→275 (-206 = губитак оксалоил и хидроксифенилацетил групе), 481→257 (-224 = губитак оксалоил групе и хидроксифенилацетата), 481→242 (-239 = губитак оксалоил групе, хидроксифенилацетата и метил групе) и 481→213 (-268 = губитак оксалоил групе, хидроксифенилацетата и угљен-диоксида). Позиције фрагментација су назначене шематски на слици.

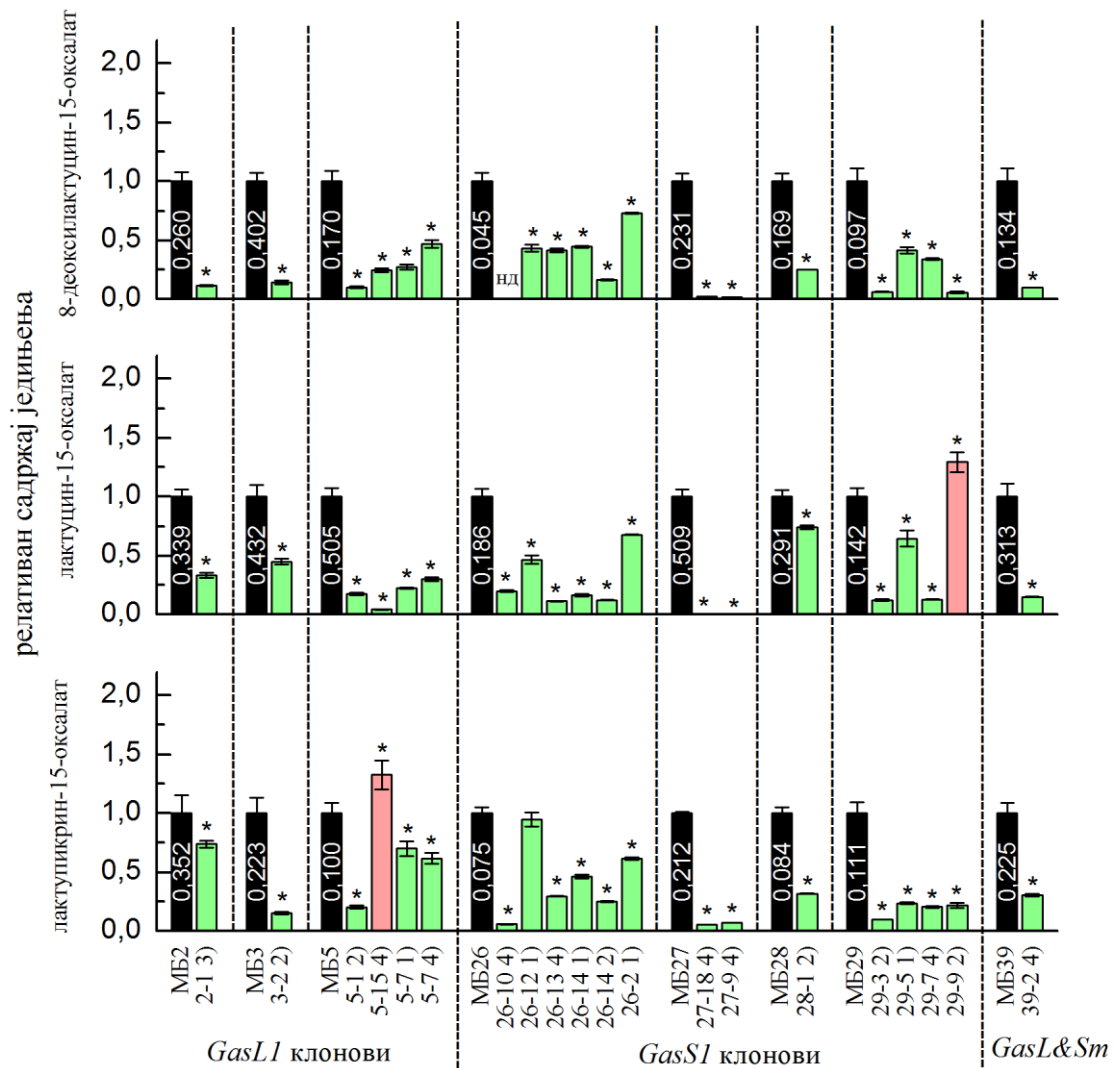
Генерално гледано, садржај сва три једињења је био већи за један ред величине у надземном делу у односу на корен биљака. Од сва три испитивана једињења, 8-деоксилактучин-оксалат је имао најнижи сигнал, у корену клонова често испод границе детекције уређаја (слика 90).

У оквиру сваке групе мајке биљке и њених клонова, барем један клон-регенерант је имао смањење садржаја оксалата (слике 90 и 91), а сви клонови су имали смањење нивоа бар једног од ова три једињења, у корену или у изданку. Садржај једињења зависио је од посматраног клона, органа и једињења, али статистички значајно смањење садржаја сва три метаболита у оба дела биљке добијено је код 5 клонова трансформисаних са *GasL1* и 5 клонова са *GasS1* конструктом (слике 90 и 91), од чега је 5 клонова такође имало и смањену експресију оба гена у корену и изданку (3-2 2), 5-1 2) од *GasL1* клонова, и 26-14 2), 27-18 4) и 27-9 4) од *GasS1* клонова). Ниво смањења количине једињења разликовао се међу клоновима и међу једињењима, а ефекат утишавања је био видљивији у надземном делу биљке. 8-деоксилактучин-15-оксалат је био смањен максимално 60 пута у односу на мајку биљку (27-9 4) изданак), али могуће и више, код клонова чије су вредности биле испод границе детекције уређаја. Лактуцин-15-оксалат је био 200 пута мањи у односу на МБ у изданку клонова 27-18 4) и 27-9 4), док је лактупикрин-15-оксалат био максимално смањен 18 пута (27-18 4) изданак).

У корену биљака (слика 90), само два клона нису имала смањење ни једног од три једињења - 26-13 4) и 29-7 4), док су многи други, посебно *GasL1* клонови, имали сва три једињења или неко од њих, у мањој количини у поређењу са мајкама биљкама. У надземном делу (слика 91) смањење је било још значајније - сви клонови су имали смањен садржај 8-деоксилактучин-оксалата, један клон (29-9 2)) није показивао смањење лактуцин-оксалата и два клона (5-15 4) и 26-12 1)) нису имала смањење лактупикрин-оксалата. Код свих клонова који у једном делу биљке, на пример корену, нису имали смањен садржај неког од једињења, имали су, међутим, смањење истог једињења у надземном делу, и обрнуто.



Слика 90. Релативни садржај оксалата сесквитерпенских лактона у корену трансформисаних и нетрансформисаних биљака (МБ). Садржај једињења је релативизован за сваки регенерант одговарајућег клона према његовој МБ, а са "\*" су означене вредности значајно различите од МБ ( $p < 0,05$ ). "нд" - није детектовано, вредности које су биле ниже од границе детекције уређаја. Приказане вредности представљају средњу вредност и грешку три мерења. Апсолутне вредности, пре релативизације, су дате у стубићима за сваку МБ. Црни стубићи означавају вредности МБ биљака, зелени представљају мање а црвени веће вредности од МБ. *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm* клонови су трансформисани одговарајућим *amiRNA* конструктом.



Слика 91. Релативни садржај оксалата сесквитерпенских лактона у изданку трансформисаних и нетрансформисаних биљака (МБ). Садржај једињења је релативизиран за сваки регенерант одговарајућег клона према његовој МБ, а са "\*" су означене вредности значајно различите од МБ ( $p < 0,05$ ). "нд" - није детектовано, вредности које су биле ниже од границе детекције уређаја. Приказане вредности представљају средњу вредност и грешку три мерења. Апсолутне вредности, пре релативизације, су дате у стубићима за сваку МБ. Црни стубићи означавају вредности МБ биљака, зелени представљају мање а црвени веће вредности од МБ. *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm* клонови су трансформисани одговарајућим *amiRNA* конструктом.

Гледано у целокупној биљци, ако је постојало смањење садржаја једињења, барем један од два гена је био утишан у тој биљци. Према томе, чинило се да се два гена допуњују по функцији, и да је довољно да један од два гена буде смањене експресије, да би се то одразило на смањен садржај једињења. Будући да је примећено да постоји подударност између количине једињења и експресије гена, одређен је коефицијент корелације између експресије *GAS* гена и садржаја метаболита (табела 29). Два гена су међусобно високо корелисала у корену ( $r = 0,81$ ), и нешто слабије у надземном делу ( $r = 0,53$ ), што је потврдило да су конструкти неспецифично утишавали оба гена. Сва три једињења међусобно су имала статистички значајну корелацију у корену и у изданку (од  $r = 0,44$  до  $0,84$ ), што указује да су у питању сродна једињења, чија је синтеза зависна од *GAS* гена са почетка биосинтетског пута. Када је у питању корелација између *GAS* гена и појединачних оксалата, у надземном делу биљке постојала је статистички значајна корелација оба гена са свим једињењима (од  $r = 0,39$  до  $0,57$ ), док је у корену *GAS long* корелисао са лактуцин-оксалатом ( $r = 0,53$ ), а *GAS short* са 8-деоксилактучин-оксалатом и лактуцин-оксалатом ( $r = 0,47$  и  $0,46$ ).

Табела 29. Коефицијенти корелације између појединачних *GAS* гена и оксалата. "\*" означава статистички значајну корелацију ( $p < 0,05$ ).

<b>корен</b>	<i>GAS long</i>	<i>GAS short</i>	8-деокси- лактучин-оксалат	лактучин- оксалат	лактучин- оксалат
<i>GAS long</i>	1,00	0,81*	0,35	0,53*	0,23
<i>GAS short</i>	0,81*	1,00	0,47*	0,46*	0,33
8-деоксилактучин- оксалат	0,35	0,47*	1,00	0,75*	0,73*
лактучин-оксалат	0,53*	0,46*	0,75*	1,00	0,44*
лактучин-оксалат	0,23	0,33	0,73*	0,44*	1,00
<b>изданак</b>	<i>GAS long</i>	<i>GAS short</i>	8-деокси- лактучин-оксалат	лактучин- оксалат	лактучин- оксалат
<i>GAS long</i>	1,00	0,53*	0,53*	0,57*	0,39*
<i>GAS short</i>	0,53*	1,00	0,57*	0,57*	0,56*
8-деоксилактучин- оксалат	0,53*	0,57*	1,00	0,84*	0,72*
лактучин-оксалат	0,57*	0,57*	0,84*	1,00	0,62*
лактучин-оксалат	0,39*	0,56*	0,72*	0,62*	1,00

## 5. ДИСКУСИЈА

---

### 5.1 Могућности пропагације цикорије у *in vitro* условима

Цикорија је једна од биљака најлакших за манипулацију *in vitro* и један од главних модел организама развојне биологије (Caffaro и сар., 1982; Grazia и сар., 1985; Profumo и сар., 1985; Demeulemeester и сар., 1995; Varotto и сар., 1997; Demeulemeester и De Proft, 2000; Bais и Ravishankar, 2001).

Цикорија се *in vitro* лако умножава преко експлантата коренова и изданака, често без додатка хормона, или коришћењем IAA и BAP у различитим концентрацијама (Bais и Ravishankar, 2001). Регенеранти се појављују на одсечцима коренова спонтано или индуковано различитим регулаторима растења (Bais и Ravishankar, 2001), а регенерација пупољака је била могућа и из лисних одсечака додавањем IAA и кинетина (Rehman и сар., 2003). Проксимални експлантати коренова обично имају већи регенеративни потенцијал од дисталних делова, којима је било потребно додати кинетин да би регенерисали пупољке (Profumo и сар., 1985). Цикорија се и у нашем систему показала погодном за гајење *in vitro* техникама. Умножавање је било могуће преко експлантата коренова и вегетативних изданака, без додатка биљних хормона (слика 20). Регенерација пупољака на одсечцима коренова је била спонтана, најпре на проксималним деловима корена (слика 20), без потребе за додавањем хормона. Културе коренова цикорије су дуго задржавале потенцијал за раст и регенерацију.

*C. intybus* је једна од ретких биљака способна да формира цветове и семена у *in vitro* условима (Bais и Ravishankar, 2001). У природи, цикорија, као двогодишња биљка, цвета у условима дугог дана након 7-9 недеља вернализације (Limami и сар., 1998; Bais и Ravishankar, 2001). У култури *in vitro*, регенеранти цикорије могу да цветају без вернализације, вероватно због ефеката културе ткива, будући да је цветање присутно само у  $R_0$  генерацији, не и у  $R_1$  генерацији (Sun и сар., 1991). Међутим, спонтано цветање *in vitro* није увек било примећено код цикорије, и у неким случајевима је захтевало додавање путресцина или  $AgNO_3$  (Bais и сар., 2000b). Неке биљке цикорије, добијене из семена или регенерисане из

културе корена, цветале су спонтано након 2-3 месеца гајења, док је већина спорије прелазила у генеративну фазу, захтевајући око шест месеци пасажирања изданака (поглавље 4.1). Цветање је код свих биљака било спонтано, без вернализације и додатка регулатора растења. Процветале биљке, међутим, није било могуће ефикасно умножавати преко културе изданака, будући да преласком у фазу цветања достижу финалну диференцијацију и углавном губе регенеративни потенцијал.

## **5.2 Подложност цикорије трансформацији сојевима *A. rhizogenes* и фенотипске одлике регенераната**

*C. intybus* је до сада трансформисана различитим сојевима *A. rhizogenes* у сврху добијања *HR* култура (*Sun* и сар., 1991; *Kamada* и сар., 1992; *Limami* и сар., 1998; *Bais* и сар., 2000a; *Bais* и *Ravishankar*, 2001; *Malarz* и сар., 2002). Познато је да успешност трансформације зависи од биљне врсте и соја бактерија, па тако сој *MSU440* није био погодан за трансформацију цикорије, дајући низак проценат трансформисаних коренова (слика 24). Овим сојем успешно су трансформисани *Medicago truncatula* и *Arabidopsis*, са 20-30% ефикасности (*Limpens* и сар., 2004). Сој *A4M70GUS*, са друге стране, дао је задовољавајући број трансформаната (12,76% од првобитно изолованих *HR* клонова), чију је трансгену природу било могуће потврдити како *PCR* техникама, тако и *GUS* бојењем, захваљујући *Uida* гену интегрисаном у *Ri* плазмид бактерија (слика 22). Сојем *A4M70GUS* успешно су трансформисане биљке *Brassica oleracea* са учесталошћу између 1,3% до 9,3% (*Sretenović-Rajičić* и сар., 2006), *Chenopodium murale* са учесталошћу од највише 11,1% (*Mitić* и сар., 2012).

На трансформисаним кореновима уочена је спонтана регенерација изданака, што је било очекивано, будући да је показано за *C. intybus* да може спонтано да регенерише у *HR* култури (*Sun* и сар., 1991), и да је овај сој при трансформацији других биљака такође индуковао развиће коренова код којих се јављала спонтана регенерација (*Momčilović* и сар., 1997; *Sretenović-Rajičić* и сар., 2006; *Vinterhalter* и сар., 2006; *Subotić* и сар., 2009). Цикорија трансформисана сродним *A4* сојем (*A4RSII*) спонтано је регенерисала изданке након месец дана



(*Sun* и сар., 1991), као и у нашем систему. Други аутори су, међутим, показали да је за успешну регенерацију изданака потребно додати *VAP* у хранљиву подлогу (*Kamada* и сар., 1992) или различите комбинације регулатора растења (*Inoguchi* и сар., 1995; *Bais* и сар., 2001b).

Трансформација са *A. rhizogenes* обично индукује формирање регенераната специфичног *hairy-root* фенотипа (*Christey*, 2001; *Casanova* и сар., 2005), али клонови добијени у нашем систему, осим врло гранатих, брзорастућих коренова и појаве ранијег цветања код регенераната у односу на контролу, нису имали изражене друге симптоме *HR* фенотипа (слика 21). Биљке цикорије нормалног фенотипа пореклом од *HR* коренова су добили и *Kamada* и сар. (1992), за разлику од *Sun* и сар. (1991) који су добили биљке израженог трансформисаног фенотипа - јако гранате, стерилне, изувјаних листова.

Познато је да се коренови настали *A. rhizogenes* трансформацијама карактеришу брзим растом (*Giri* и *Narasu*, 2000; *Christey*, 2001). У нашем систему се показало да клонови задржавају потенцијал за брзи раст и приликом регенерације (слика 25), нарочито у розетастој форми. Потенцијал за регенерацију изданака, међутим, био је обрнуто пропорционалан брзини растења корена, те су тако нетрансформисане биљке, чији коренови најспорије расту, дале највећи број изданака, док је клон 13 који најбрже расте дао најмањи број изданака (слика 26). Овакав инверзан однос раста корена и регенерације је и раније забележен (*Moriuchi* и сар., 2004), а вероватно је последица експресије *Rol* гена у трансформисаним клоновима, који успоравају регенерацију, али поспешују растење. *Vinterhalter* и сар. (2011) су, на пример, показали да је спонтана регенерација из *HR* код врсте *Gentiana punctata* веома редак догађај, и да регенерисани трансформанти не садрже *Rol* гене у геному, вероватно због делеције, иако су их првобитне *HR* културе садржале. Приликом регенерације може доћи и до утишавања трансгена, као последица интеграције вишеструких копија гена у директним и обрнутим поновцима, а понекад до утишавања трансгена долази и у трансформисаним линијама са једном интегрисаном копијом (*Domínguez* и сар., 2002). Експресија *Rol* гена генерално фаворизује растење корена у односу на изданке, вероватно преко померања равнотеже ауксина и

цитокинина, чији однос и у култури нетрансформисаних биљака представља стимулус за развијање корена или изданака од недиференцираних ћелија, при чему виши ниво цитокинина углавном доводи до формирања изданака, а ауксина до образовања коренова (Pretto и Santarém, 2000).

Трансформисане биљке су, као и нетрансформисане, цветале *in vitro* без претходне вернализације (слика 21). Примећено је да су трансформисане биљке брже прелазиле у генеративну фазу од нетрансформисаних биљака, а добијени клонови су се међусобно разликовали у брзини цветања. Цветови су се најраније појавили на биљкама клонова 36 и 35, који су се одликовали мањом брзином растења у односу на клон 13, али већом учесталашћу регенерације изданака у култури коренова. Показано је у неколико случајева да трансформација цикорије са *A. rhizogenes* доводи до цветања у првој години, без вернализације, али при дугом дану (Sun и сар., 1991; Kamada и сар., 1992; Limami и сар., 1998). Трансформисана цикорија ипак није увек спонтано цветала *in vitro*, па је у неким случајевима било потребно додавање путресцина или  $AgNO_3$  (Bais и сар., 2001b).

### **5.3 Котрансформација цикорије и DsRED као репортер котрансформације**

Пошто је установљено да се цикорија ефикасно трансформише *A4M70GUS* сојем и да се спонтаном регенерацијом добијају биљке скоро нормалног фенотипа, овај сој је искоришћен и за унос страних гена са бинарног вектора путем котрансформације. Приликом котрансформације (слика 7), може доћи до трансфера онкогена са Т-ДНК *pRiA4* плаزمида, трансфера страних гена са Т-ДНК бинарног плаزمида, или истовременог трансфера обе Т-ДНК у биљку. Учесталост ових догађаја зависи, између осталог, од селекције која се примењује на потенцијалне трансформанте. Т-ДНК на којој се налази ген према коме се врши селекција биће присутна са већом учесталашћу у трансформантима од Т-ДНК која се не селекује (Tzfira и Citovsky, 2008). Трансформацијом изданака банане, на пример, уз помоћ *A4* соја *A. rhizogenes* и директном регенерацијом трансформисаних изданака селектованих на хигромицину (ген на бинарном вектору), добијено је 43% клонова који су носили само Т-ДНК са бинарног

плазмида, не и са *Ri* вектора, потврђујући независну интеграцију ових Т-ДНК (*Venkatachalam* и сар., 2011). У случајевима када је селекција трансформаната обављена на основу брзог раста *HR* култура на медијуму без хормона, захваљујући експресији *Rol* гена, 30% трансформаната *Lotus japonicus* је носило само Т-ДНК са *Ri* плазмида, не и са бинарног вектора (*Stiller* и сар., 1997). При трансформацији цикорије *A4M70GUS* сојем са бинарним векторима, трансформација *Ri* плазмидом је детектована преко *HR* фенотипа и интеграције *RolA* гена (слике 51 и 52), док је котрансформација бинарног вектора праћена преко интеграције *DsRED* гена (слике 52 и 82). Експресија трансгена са бинарног вектора праћена је преко *DsRED* флуоресценције (слике 56 и 83). Антибиотска селекција котрансформисаних коренова није коришћена, јер је показано да није ефикасна у селекцији мозаично трансформисаних коренова, који су очекивани при котрансформацији (*Limpens* и сар., 2004).

Око 67% тестираних *HR* клонова цикорије (који су добро расли и давали регенеранте), имало је интеграцију Т-ДНК са бинарног плазмида (табеле 23 и 28). Висок проценат котрансфера (70%) Т-ДНК са бинарног вектора показан је и за друге сојеве *A. rhizogenes*, укључујући и *MSU440* сој при трансформацији биљака *L. japonicus* (*Stiller* и сар., 1997). Велики број клонова показивао је и експресију трансгена са бинарног плазмида, што је детектовано преко флуоресценције *DsRED* маркера (слике 56 и 83). Учесталост експресије *DsRED*-а у оквиру колекције клонова трансформисаних једним конструктом, кретала се од 63,16% за *ProGasL* клонове до 100% за клонове трансформисане *ProP450*, *ProGasS29* и *GasL&Sm* конструктима. Учесталост експресије *DsRED*-а при трансформацији *MSU440* сојем, износила је око 30% за *M. truncatula* и 20% за *Arabidopsis* (*Limpens* и сар., 2004). У случају *A4* соја, 50% добијених коренова детелине и парадајза је експримирало трансген са бинарног плазмида (*Simpson* и сар., 1986).

Тестирањем више регенераната истог клона, установљено је да неки добијени регенеранти немају интегрисан трансген са бинарног вектора, док га други регенеранти поседују (слике 53 и 82). Уочено је да су први изданци на корену и они који су се појављивали при основи корена, често били нетрансформисани. То може бити последица химеричне структуре примарних *HR*

коренова, који у својој основи задржавају неке нетрансформисане ћелије које имају већу способност регенерације у односу на трансформисане захваљујући непоремећеном односу ендогених хормона. Добијање нетрансформисаних регенераната од трансформисане културе корена може бити и последица генетичких реаранжмана и делеције трансгена током регенерације (*Vinterhalter* и сар., 2011). Важно је било, дакле, тестирати сваку регенерисану биљку, да би у даљим експериментима користили само линије корена и изданака добијене од биљке код које је потврђена интеграција трансгена са бинарног вектора.

Конструисан *LED* систем (слика 18), којим је визуелизована DsRED флуоресценција, показао се флексибилан и довољно прецизан у разликовању различитих нивоа флуоресценције маркера, без проблема аутофлуоресценције (слика 54). Флуоресценција је често била видљива и голим оком при белој светлости у кореновима и изданцима са мање хлорофила (слика 58). Видљиву флуоресценцију DsRED-а на белој светлости детектовали су и *Nishizawa* и сар. (2006), у избелиеним соматским ембрионима и семенима соје. Културе корена цикорије често нису имале униформну флуоресценцију - неки делови корена и цели бочни коренови нису флуоресцирали (слика 57), па је било пожељно повремено проверавати флуоресценцију сукцесивних пасажа корена, да се не би изгубили клонови који експримирају репортер. Најјача флуоресценција DsRED-а детектована је у кортексу корена цикорије (слика 57). Варијабилну експресију DsRED маркера под контролом убиквитинског промотора, детектовали су и *Limpens* и сар. (2004) у кореновима детелине и *Arabidopsis*-а. Најјача флуоресценција у корену трансформисане детелине била је присутна такође у кортексу, а у неким бочним кореновима је изостала експресија маркера, дајући мозаичне коренове (*Limpens* и сар., 2004). Интензитет флуоресценције корена трансформисане цикорије је био варијабилан, како међу различитим клоновима, тако и у оквиру једног клона пореклом из различитих пасажа (прилози 1 и 3). Будући да су коренови примарних *HR* култура у већини случајева имали јачу флуоресценцију него културе корена регенераната потеклих од њих (поглавља 4.2.3 и 4.3.3), и да је флуоресценција опадала са бројем сукцесивних пасажа, може се рећи да се експресија DsRED-а, а самим тим и флуоресценција, смањивала са протоком времена од трансформације, вероватно као последица утишавања

трансгена у неким ћелијама. Други разлог може бити случајна селекција дела корена са мозаичном експресијом приликом пасажирања, па је у том смислу било најбоље проверавати флуоресценцију нових култура непосредно после пасажа. Мања флуоресценција корена регенераната у односу на изворне *HR* културе можда сугерише и да су регенеранти настали деобом и диференцијацијом ћелија примарног експлантата корена у којима се трансгени слабије експримирају. У одређеном броју случајева, флуоресценција је била присутна само у кореновима почетних пасажа (прилози 1 и 3), и ту се вероватно ради о пролазној експресији трансгена или брзом утишавању интегрисаних гена. Постојали су и случајеви где је показана интеграција трансгена, али није уочена флуоресценција ни у једном пасажу (прилози 1 и 3), што је вероватно последица интеграције трансгена у део генома који се не експримира. Утишавање трансгена приликом трансформације и регенерације трансгених биљака је релативно честа појава, која је вероватно последица урођене одбране биљака од инвазивних ДНК и РНК секвенци, као што су транспозони, вируси и Т-ДНК (*Matzke и Matzke, 1998*). Када се приликом трансформације ни на који начин не врши селекција линија које експримирају трансгене, преко 30% регенерисаних биљака цитруса показује утишавање свих трансгена присутних на Т-ДНК, док су при двострукој селекцији, употребом антибиотске резистенције и GUS бојења, регенеранти који не експримирају трансгене у потпуности елиминисани (*Domínguez и сар., 2002*). Будући да је DsRED селекција неинвазивна, јефтинија и једноставнија од GUS бојења, а да је селекција канамицином често непоуздана при дискриминацији химерних *HR* култура (*Limpens и сар., 2004*), селекција на основу праћења флуоресцентних маркера је напреднији метод детекције *A. rhizogenes* трансформације.

Узевши у обзир учесталост трансформације и експресије трансгена, као и лакоћу умножавања и регенерације трансформисаних клонова, *A4M70GUS* сој се показао погодан за котрансформацију цикорије бинарним и *Ri* плазмидом. Трансфер и интеграција Т-ДНК са конструисаних бинарних плазида дешавали су се са довољном учесталошћу, а код развијених коренова се у веома високом проценту експримира DsRED маркер, што олакшава детекцију трансформаната.

## 5.4 Утицај трансформације са *A. rhizogenes* и фенофазе на продукцију секундарних метаболита цикорије

### 5.4.1 Продукција сесквитерпенских лактона

Нетрансформисане и трансформисане биљке цикорије *in vitro* продуковале су слободне сесквитерпенске лактоне који су карактеристични за корен цикорије гајене у природи (*Rees* и *Harborne*, 1985; *Van Beek* и сар., 1990; *Kisiel* и *Zielinska*, 2001) - лактуцин, лактупикрин, 8-деоксилактунин и 11,13-дихидролактунин (слике 27 и 29). Костунолид, заједнички прекурсор сесквитерпенских лактона код цикорије, није детектован, вероватно због његове брзе конверзије у друга једињења. *HR* културе одабраних клонова такође су производиле ова једињења, у количини истој или нижој у односу на културе нетрансформисаног корена (слика 27). Имајући у виду њихово интензивније растење у односу на контролу, могуће је одабрати оне *HR* клонове (у нашем случају клон 13) код којих је могуће изоловати вишеструко веће количине ових једињења по запремини културе у односу на контролу. Овим је потврђено да корен цикорије, чак и без формираног изданка има способност за синтезу гвајанолида, као што је раније показано (*Malarz* и сар., 2002).

Корен регенерисане биљке цикорије је генерално садржао већу количину гвајанолида у односу на корен гајен у течной култури (слика 27). Та особина је посебно изражена код коренова нетрансформисаних регенераната у фази розете, сугеришући ипак значајан утицај надземног дела биљке на синтезу гвајанолида. У овим културама доминантан је био садржај лактупикрина, као и у случају корена биљака у вегетативној фази гајених у стакленику (*Malarz* и сар., 2013). У листовима биљака у фази розете садржај гвајанолида је био нешто мањи него у кореновима, и сличан међу трансформисаним и *wt* биљкама. Гвајанолиди лактуцинског типа у слободном стању су присутни у латексу корена и изданка цикорије гајене у пољу током целог периода вегетације, где су чинили просечно 0,42% суве масе корена и 0,26% листа (*Rees* и *Harborne*, 1985).

Прелазак у фазу цветања утицао је различито на садржај слободних гвајанолида код трансформисаних и нетрансформисаних биљака (слике 27 и 29).

Код трансформисаних биљака уочен је пораст садржаја СЛ у листу и корену, као последица веће продукције и/или ослобађања из везаних форми, док је код нетрансформисаних биљака садржај СЛ смањен. Уочене промене садржаја код *wt* биљака могу се дискутовати у контексту сезонских варијација код цикорије гајене у пољу (*Rees* и *Harborne*, 1985). У пролеће, током вегетативне фазе, садржај гвајанолида је већи у корену него у зеленим деловима биљке, али са почетком цветања, концентрација једињења у надземном делу се повећава на уштрб садржаја у корену. У јесен се поново повећава садржај у корену током сенесценције биљке. У нашем систему није уочен пораст садржаја гвајанолида у листовима *wt* биљака у току цветања, али могуће је да се ова једињења премештају у стабљике или цветове, који овом приликом нису анализирани.

С обзиром да је пораст садржаја гвајанолида у току цветања био приметан само код трансгених биљака, предложено је да цветање под утицајем експресије *Rol* гена утиче на акумулацију гвајанолида. У регенерисаним биљкама цикорије, експримирали су се *RolA* и *RolC* гени, док је експресија *RolB* гена била испод нивоа детекције (слика 31). *RolB* ген се сматра неопходним за индукцију *HR* (*Casanova* и сар., 2005), а одсуство његове експресије у регенерантима могло би се објаснити постојањем регулаторних механизма који спречавају истовремену експресију *RolA* и *RolB* гена (*Veena* и *Taylor*, 2007). У нашем систему нисмо квантификовали експресију *RolB* гена током успостављања *HR* култура, када је могуће да је овај ген био активан, мада је раније показано да његова експресија и у *HR* културама може бити нестабилна и неуједначена (*Terato* и сар., 2011).

Експресија *RolA* гена (слика 31) је била релативно ниска у корену и листу вегетативних биљака као и корену цветалих биљака, док је у листу цветалих биљака уочен виши ниво експресије. Ткивно-специфична експресија *RolA* гена уочена је и код других биљних врста, где је слабија експресија била присутна у корену и листовима, а јача у стаблу (*Veena* и *Taylor*, 2007). *RolA* ген углавном одлаже цветање (*Casanova* и сар., 2005; *Veena* и *Taylor*, 2007) под контролом нативног промотора или га потпуно инхибира ако је под контролом конститутивног *35S* промотора (*Bais* и *Ravishankar*, 2001), те је уочен пораст

експресије овог гена у цветалим биљкама цикорије вероватно пре последица него узрок ранијег цветања.

Експресија *RolC* гена је, међутим, показивала разлике у зависности од онтогенетске фазе биљке. Код цветалих биљака, експресија овог гена је била на знатно вишем нивоу, посебно у корену (слика 31). Самостална експресија *RolC* гена и код осталих биљних врста специфично је локализована у флоему корена, док се у листу експримира врло слабо (*Veena* и *Taylor*, 2007). У присуству и осталих *Rol* гена, међутим, овај ген има различиту орган-специфичну експресију. *RolC* се највише експримирао у корену и стаблу код трансгених *Nicotiana tabacum* (*Nakamura* и сар., 1988) или у листу код исте врсте дувана у другој студији (*Leach* и *Aoyagi*, 1991). Од свих *Rol* гена, *RolC* је најуже повезан са индукцијом цветања. Када се *RolC* унесе у биљке самостално, под контролом нативног или конститутивног промотора, примећено је раније цветање код неколико врста биљака (*Casanova* и сар., 2005), укључујући соју (*Zia* и сар., 2010), дуван (*Bais* и *Ravishankar*, 2001) и цикорију (*Kamada* и сар., 1992). Биљке цикорије трансформисане *RolC* геном су цветале без вернализације у условима дугог дана, слично као и биљке трансформисане са *Ri* плазмидом *A. rhizogenes* (*Kamada* и сар., 1992).

Примећена је и подударност експресије *RolC* гена и акумулације гвајанолида у трансформисаним биљкама цикорије - оба параметра су била виша у цветалим биљкама у односу на биљке у фази розете, и оба су била виша у кореновима у односу на листове. За *RolC* је показано да стимулише продукцију различитих секундарних метаболита, укључујући тропанске, пиридинске и индолне алкалоиде, гинсенозиде и антраквиноне, у трансформисаним биљкама и ћелијским културама (*Bulgakov*, 2008). Подударност експресије овог гена и садржаја гвајанолида сугерише стимулаторни ефекат *RolC* гена на продукцију или ослобађање гвајанолида из везаних форми, али и на цветање трансформисане цикорије гајене *in vitro*. Позитиван ефекат овог гена на биосинтезу секундарних метаболита може бити видљив преко његовог стимулаторног ефекта на раст *HR* култура (*Palazón* и сар., 1997) или директно на секундарни метаболизам, будући да у неким случајевима ниво експресије тог гена веома добро корелише са



акумулацијом посматраних једињења (*Palazón* и сар., 1998), или са експресијом кључних ензима у биосинтетском путу метаболита (*Shkryl* и сар., 2008). Стимулаторни ефекат осталих *Rol* гена на секундарни метаболизам и цветање се, наравно, не може искључити. Подаци о дејству *RolA* гена на секундарни метаболизам су малобројни. Забележено је да овај ген делује стимулаторно на продукцију антраквинаона и никотина (*Palazón* и сар., 1997; *Shkryl* и сар., 2008). *RolB* ген је познат као снажан покретач секундарног метаболизма (*Bulgakov*, 2008), и понекад је одговоран за раније цветање (*Zia* и сар., 2010), али је истовремено и снажан супресор ћелијског раста, за разлику од *RolC*, због чега је његова примена у биотехнологији за повећање продукције метаболита ограничена. *RolB* експресија није детектована у регенерантима цикорије, те је могуће да *RolC* својом високом експресијом делује антагонистички на ефекте *RolB* гена (*Bulgakov*, 2008).

На крају, комбинован ефекат сва три *Rol* гена на секундарни метаболизам је у случају великог броја трансформисаних биљака био стимулаторан (*Giri* и *Narasu*, 2000), а трансформација биљака са конструктима који носе ова три гена довела је до сличног пораста секундарног метаболизма као трансформација *wt* сојевима *A. rhizogenes* (*Palazón* и сар., 1997), што сугерише да су најпре ови бактеријски гени одговорни за примећену стимулацију, мада појединачни механизми деловања сваког од ових гена могу бити другачији (*Shkryl* и сар., 2008). Конкретне функције ових гена још увек нису познате, али је евидентно да они делују на биљку преко њених одбрамбених сигналних путева, мада заобилазећи уобичајене сигналне путеве етилена, јасмонске и салицилне киселине (*Bulgakov*, 2008).

#### **5.4.2 Продукција хлорогене киселине**

Акумулација хлорогене киселине је генерално била већа у корену цикорије него у листовима (слика 30). Код нетрансформисаних биљака, садржај је био већи у целим биљкама него у култури корена, а транзиција у фазу цветања није имала очигледан утицај на акумулацију хлорогене киселине, као у случају гвајанолида (поглавље 5.4.1). Код трансформисаних биљака, пораст садржаја хлорогене

киселине приликом цветања био је уочљив у листовима, али не и у кореновима (слика 30), што је корелисало са нивоом експресије *RolA* гена, који је такође био виши у листовима цветалих биљака (слика 31). Листови цветалих трансформаната су такође једини имали благи пораст нивоа хлорогене киселине у односу на нетрансформисане биљке - коренови биљака у фази розете и цветалих биљака, као и листови трансформисаних розета имали су мањи садржај. Антиоксидативно дејство хлорогене киселине и њен потенцијал за уклањање слободних радикала (енг. *reactive oxigene species, ROS*) су претходно потврђени (*Chen* и *Ho*, 1997). За *Rol* гене је такође откривено да утичу на интрацелуларни ниво слободних радикала (*Bulgakov* и сар., 2011). *RolA* је најмање утицао на ниво *ROS* у ћелији, док су друга два гена донекле смањивала њихов ниво, балансирајући међусобне ефекте (*Bulgakov* и сар., 2011). *RolC* утиче на смањење продукције слободних радикала преко инхибиције *NADPH* оксидазе, а *RolB* активира њихову деградацију преко активације истог ензима, што доводи до пораста антиоксидативне одбране ћелије - индукције пероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза у трансформисаним ћелијама (*Bulgakov* и сар., 2011). Будући да у регенерантима цикорије нема експресије *RolB* гена, а да је висока експресија *RolC* гена, могуће је да је продукција *ROS* у трансформисаним биљкама снижена у односу на нетрансформисане, те није дошло до значајне индукције антиоксидативног система, укључујући синтезу хлорогене киселине. Велики прираст масе коренова клона 13 омогућио је изолацију веће количине овог једињења у односу на нетрансформисану биљку, па се тако одабрани клонови трансформисане цикорије могу искористити као добар извор овог фармаколошки активног једињења.

## **5.5 Проблеми детекције активности репортер гена - аутофлуоресценција и конфликт репортера**

Репортер гени омогућавају визуелну идентификацију ћелија и ткива у којима се експримирају. Ови гени представљају незаменљив алат при проучавању активности промотора, али и других функција и структура у ћелији. У генетичком инжењерству, репортери се користе за праћење ефикасности трансформације и визуелну селекцију трансгених ткива (*Rosellini*, 2012), за шта смо ми користили

DsRED и GUS маркере. Осетљивост репортер гена у биљкама зависи од присутних пигмената, нативних флуоресцентних молекула, конкуренције репортер протеина за супстрате са ендогеним ензимима и ендогене емисије светлости, због чега одабир репортера треба да одговара врсти биљке, ткива и експерименталним условима (Rosellini, 2012).

*UidA* ген за синтезу GUS је један од најчешће коришћених репортер гена код биљака. До сада је успешно коришћен за детекцију трансформаната, као и хистолошку локализацију експресије гена код великог броја врста биљака, укључујући и комерцијалне (Rosellini, 2012). Једна од негативних страна његовог коришћења је деструктивност хистохемијског есеја (Miki и McHugh, 2004), мада је ово могуће превазићи коришћењем другачијег супстрата који уместо обојеног даје флуоресцентни продукт (Rosellini, 2012). Овај приступ, међутим, није примерен за тестирање великог броја трансформаната (Breyer и сар., 2014). У нашем систему, GUS маркер је било могуће употребити само за селекцију трансформаната добијених трансформацијом "празним" *A4M70GUS* сојем (слика 22), не и за визуелизацију активности промотора, иако су конструисани вектори под контролом испитиваног промотора носили GUS-GFP фузију, из разлога што је *Ri* плазмид овог соја *A. rhizogenes* модификован тако да садржи GUS касету.

Употреба флуоресцентних маркера као репортер гена омогућава недеструктивну визуелизацију активности гена на свим нивоима организације - од целе биљке до ћелијских компартмента. Ови протеини су једноставнији за коришћење будући да не захтевају додавање супстрата нити било коју другу манипулацију трансформисаним ткивима ради активације, нису токсични за ћелије, могу се детектовати релативно брзо након трансформације и не мењају морфологију биљке (Miki и McHugh, 2004; Manimaran и сар., 2011). Флуоресцентна детекција, међутим, захтева постојање одговарајуће опреме за визуелизацију флуоресценције која је често врло скупа, а чије компоненте треба да буду специфично одабране за дати експериментални систем, попут комбинације филтера за визуелизацију флуоресценције у биљним ткивима.

До сада је изоловано неколико различитих флуоресцентних протеина из биолуминисцентних животиња, али најчешће коришћени су GFP и DsRED, и

њихове модификоване варијанте (*Stewart Jr*, 2006; *Rosellini*, 2012). За разлику од GFP-а који је мономер, DsRED је у својој изворној форми хомотетрамер (*Wall и сар.*, 2000), што ограничава његову употребу у транслационим фузијама (*Stewart Jr*, 2006), али не у детекцији трансформаната, што је и у нашем систему потврђено. DsRED се одликује високим интензитетом флуоресценције, који је последица високог екстинкционог коефицијента и квантног приноса, али његова хромофора спорије сазрева у односу на GFP (*Berg и Beachy*, 2008). GFP, са друге стране, је мали протеин, који се без проблема фузионише за друге протеине, али због величине, може да пасивно дифундује између ћелија преко плазмодезми, што отежава прецизну локализацију експресије (*Rosellini*, 2012). Из тог разлога GFP се често експримира са сигналом за субћелијску локализацију, на пример у једру или ендоплазматични ретикулум, када је потребна визуелизација његове експресије без праћења специфичне локализације, на пример за потврду трансформације. Када је потребно праћење субћелијске локализације, дифузија се спречава експресијом GFP у тандемским поновцима или везивањем за други протеин (на пример GUS) (*Rosellini*, 2012). Познате су комбинације GUS и GFP маркера у експериментима детектовања активности промотора, фузијом ова два гена, чиме се комбинује висока осетљивост GUS маркера и неинвазивност флуоресцентног протеина (*Quaedvlieg и сар.*, 1998). Резолуција и осетљивост детекције GFP-а *in vivo* зависе у великој мери од структуре посматраног дела биљке (*De Ruijter и сар.*, 2003). Најпоузданија је визуелизација у ситнијим структурама и појединачним ћелијама, уз помоћ конфокалне микроскопије. Што је узорак крупнији, долази до већег расипања светлости флуоресценције, и израженијих ефеката аутофлуоресценције биљних ткива, па је у тим ситуацијама могуће детектовати средњу до јачу флуоресценцију овог маркера, али не и слабу (*De Ruijter и сар.*, 2003).

Аутофлуоресценција у биљним ткивима је често озбиљан проблем при визуелизацији флуоресцентних протеина, нарочито када је њихова емисија у зеленом и плавом делу спектра, а експресија ниска. Аутофлуоресценција може бити пореклом од хлорофила, компоненти задебљалог ћелијског зида, посебно лигнина, разноврсног ћелијског садржаја - нарочито фенолних једињења или некротичних ћелија (*Stewart C.N*, 2001; *De Ruijter и сар.*, 2003). Већина биљне

аутофлуоресценције је локализована у плавом и зеленом делу спектра, са изузетком хлорофила који флуоресцира у црвеном делу (*Berg и Beachy, 2008*). Овај проблем се може донекле превазићи избором одговарајућих филтера за ексцитацију и детекцију емисије флуоресцентног сигнала. Напредним техникама конфокалне микроскопије, на пример снимањем спектра флуоресценције (енг. *spectral imaging*), могуће је раздвојити аутофлуоресценцију од сигнала репортер гена (енг. *spectral unmixing*) (*Berg и Beachy, 2008*). Важно је такође имати одговарајућу контролу (енг. *background control*), нетрансформисано ткиво у истом развојном ступњу и физиолошком стању, будући да аутофлуоресценција може доста да варира у зависности од начина гајења, дебљине ткива и старости биљке (*De Ruijter и сар., 2003*). Зато су за евалуацију флуоресценције ткива цикорије увек коришћене нетрансформисане контроле, гајене и припремане за микроскопију на исти начин као трансформисане. Аутофлуоресценција ткива цикорије под *UV LED* осветљењем и филтером за визуелизацију GFP флуоресценције, била је присутна у одређеним малим деловима корена (слика 59), како код нетрансформисаних биљака, тако и код трансформисаних клонова, а њено порекло није утврђено. При ексцитацији плавом светлошћу (слика 60) која је оптимална за ексцитацију GFP-а, аутофлуоресценција у зеленом делу спектра је била изражена у задебљалим деловима корена, новоформираним кореновима и калусима, а није била присутна у листовима. Веома изражена аутофлуоресценција на зеленом каналу флуоресцентног микроскопа (слике 61 и 62), и нешто слабија на конфокалном микроскопу (слика 65), била је пореклом од ћелијских зидова, ксилемских судова и ћелијског садржаја паренхимских ћелија, а интензитет је зависио од увећања - озбиљнија аутофлуоресценција је била примећена на већем увећању. У недостатку квалитетне *GFP<sup>+</sup>* контроле, није познато да ли је детектована аутофлуоресценција ткива цикорије препрека визуелизацији експресије GFP репортера. Аутофлуоресценција ткива при подешавањима за визуелизацију DsRED-а је била готово занемарљива у свим системима, и лако се разликовала од праве флуоресценције (слике 60-62 и 65). Црвени флуоресцентни протеини су лакши за визуелизацију у биљкама од зелених, будући да је аутофлуоресценција ткива у црвеном делу спектра далеко слабија него у зеленом делу (*Stewart Jr, 2006*).

Осим аутофлуоресценције, потенцијалан проблем приликом коришћења више флуоресцентних протеина у биљном ткиву представља мешање сигнала емисије флуорофора (енг. *bleed-through, crossover*) (Berg и Beachy, 2008). Раздвајање сигнала DsRED и GFP се показало посебно проблематично. Мада је након открића ова два флуоресцентна репортера и описа њихових спектралних карактеристика, предложено да се могу користити заједно (Stewart C.N, 2001), успешно раздвајање њихових сигнала углавном је показано на микроорганизмима и гљивама (Jakobs и сар., 2000; Nancharaiah и сар., 2003; Helber и Requena, 2008; Nizam и сар., 2012). Код биљака, истовремена употреба ова два маркера углавном је била успешна на протопластима, вероватно јер се тиме елиминишу друге врсте аутофлуоресценције (Kim и сар., 2001; Karimi и сар., 2007; Chen и сар., 2009). Релативно лако је било разликовати флуоресценцију ова два маркера приликом пролазне трансформације листова агроинфилтрацијом или биолистичком трансформацијом, и визуелизацијом бинокуларном лупом или флуоресцентним микроскопом са одговарајућим филтер сетовима, уз релативно мало мешање сигнала (Dietrich и Maiss, 2002; Goodin и сар., 2002). При пролазној трансформацији, страни гени се експримирају у великој мери без интеграције у геном домаћина, експресија не зависи од позиционих ефеката и ниво експресије трансгена је углавном виши у односу на стабилну трансформацију (Wroblewski и сар., 2005). Виши ниво експресије маркера вероватно олакшава разликовање флуоресценције пореклом од DsRED и GFP маркера, и дискриминацију од аутофлуоресценције биљног ткива. У случају наших конструката, који су садржали DsRED под контролом убиквитинског промотора, и GFP под контролом 35S промотора или промотора GAS и GAO гена, било је могуће визуелизовати ова два протеина заједно у ткиву листа салате након агроинфилтрације (слика 45). Са одговарајућим сетовима филтера, аутофлуоресценција биљног ткива је била готово елиминисана, сем у случају некрозираног ткива, чију је аутофлуоресценцију опет лако било разликовати од флуоресценције репортера (слика 45). Коришћењем одговарајућих контрола - узорак инфилтрираних конструктима који су садржали само један од два репортера, установљено је да мешање сигнала при оваквој експерименталној поставци није значајно велико (слика 45), вероватно захваљујући довољно високом нивоу експресије

флуоресцентних маркера, који је омогућио бољи визуелни контраст између аутофлуоресценције и реалне флуоресценције репортера. Јачина флуоресценције DsRED маркера је ипак била значајно већа од GFP флуоресценције, чак и у односу на *35S-GFP* контролу, што је вероватно било последица коришћења различитог промотора и већег оптичког интензитета флуоресценције DsRED-а. Већи интензитет осветљености флуорофоре (енг. *brightness*) флуоресцентног протеина је последица његовог вишег екстинкционог коефицијента - мерила ефикасности апсорпције ексцитационе светлости, и вишег квантног приноса - мерила јачине емисије спрам употребљене ексцитационе светлости (*Berg и Beachy, 2008*).

Код стабилно трансформисаних биљака, флуоресценцију оба маркера било је могуће визуелизовати на макро нивоу само у једном специфичном случају, посматрањем коренова на флуоресцентној бинокуларној лупи и затим на конфокалном микроскопу (*Limpens и сар., 2004*). Аутори су у овом случају користили линију *Arabidopsis*-а стабилно трансформисану са GFP конструктом под контролом јаког промотора и појачивача (енг. *enhancer*), у коју су *HR* трансформацијом убацили *hpRNA* конструкт за утишавање *GFP* гена на коме је DsRED био маркер за котрансформацију, под контролом убиквитинског промотора. Захваљујући томе, флуоресценција оба маркера није била присутна у истим ћелијама, већ у различитим ћелијама истог корена, или у различитим листовима, што је сигурно олакшавало раздвајање сигнала. Са друге стране, аутори наводе да су код друге линије *Arabidopsis*-а, где није дошло до утишавања *GFP* гена, истовремено детектовали DsRED и GFP флуоресценцију у истом ткиву уз помоћ бинокуларне лупе, али не наводе коришћене филтере и не приказују одговарајуће контроле. За дискриминацију флуоресценције ова два маркера у овом специфичном случају вероватно је био одговоран и висок ниво експресије *GFP* гена, захваљујући јаком промотору и *enhancer*-у.

При посматрању ткива трансформисане цикорије на флуоресцентном и конфокалном микроскопу, уочен је DsRED *crossover* у GFP канал (слике 61, 62 и 65). Овај феномен смо детектовали у корену, стаблу и листу трансгених биљака трансформисаним векторима који носе DsRED и GFP маркере (конструкти за анализу промотора), а потврдили на биљкама трансформисаним DsRED<sup>+</sup>

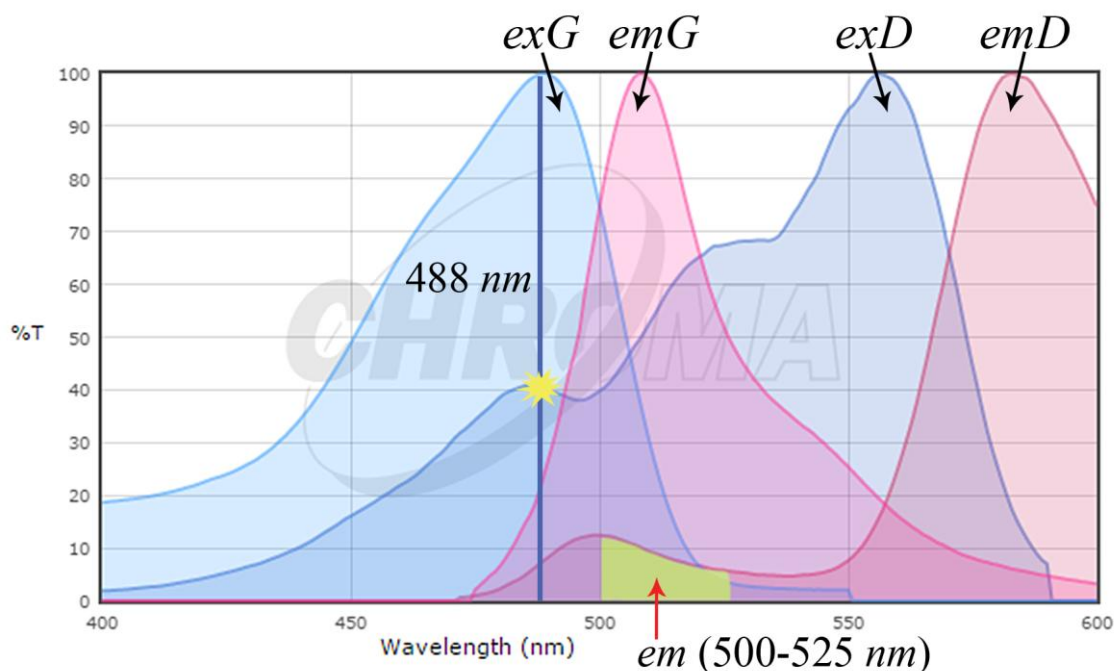
контролом (без *GFP* гена). Без обзира на коришћење препоручених комбинација филтера и подешавања микроскопа, поред озбиљне аутофлуоресценције биљног ткива (присутне и у нетрансформисаној контроли), уочили смо додатну флуоресценцију на *GFP* каналу у биљкама које су експримирале *DsRED* маркер. Ова флуоресценција је, гледано под флуоресцентним микроскопом и забележено камером у боји, била жуто-зелено обојена, за разлику од аутофлуоресценције околних ћелијских зидова и ћелијског садржаја која је била плаво-зелена (слике 61 и 62). Распоред ове жуто-зелене флуоресценције је перфектно корелисао са распоредом *DsRED* флуоресценције на *DsRED* каналу, нарочито где је *DsRED* флуоресценција била јачег интензитета. Из овога је закључено да је могуће да долази до "цурења" *DsRED* сигнала у *GFP* канал, што је и потврђено на конфокалном микроскопу (слика 65). На неким пресецима уочено је да су ћелије најјаче флуоресцирале на *GFP* каналу, а интензитет њихове флуоресценције је био слабији на *DsRED* каналу (слика 61), те није било могуће потпуно одбацити могућност постојања *GFP* флуоресценције. Не може се, међутим, искључити ни могућност да је уочена флуоресценција на зеленом каналу пореклом од неког другог извора аутофлуоресценције, који су у младим кореновима и калусима, као метаболички врло активним ткивима, вероватно веома бројни. Провера оваквих случајева захтевала је интензивну претрагу у контролним културама, нетрансформисаним или трансформисаним *DsRED+* вектором, ради проналажења што сличнијих ситуација, што није увек било могуће.

Увидом у комплетан емисиони спектар *DsRED*-а (слика 92), датог на сајту *Chroma* (<http://www.chroma.com/>), и делимичног емисионог спектра у комбинацији са *Zeiss* филтерима који су нам били на располагању на флуоресцентном микроскопу (слике 63 и 64, <https://www.micro-shop.zeiss.com>), постаје јасан разлог оваквог мешања сигнала репортера.

*DsRED* поседује мањи емисиони максимум у опсегу 475-525 *nm* који се у потпуности преклапа са емисијом *GFP*-а (слика 92), због чега је немогуће раздвојити ова два маркера избором другачијег сета филтера или сужавањем опсега детекције. Проблем је посебно изражен када је висок интензитет флуоресценције *DsRED*-а, као што је случај код већине наших клонова, а низак



ниво флуоресценције GFP-а, као што можемо претпоставити из резултата агроинфилтрације (поглавље 4.2.2).



Слика 92. Комбинација ексцитационе светлости ласера (488 nm) и региона детектоване емисије (500-525 nm) за визуелизацију GFP маркера на конфокалном микроскопу (GFP канал). Приказани су спектри ексцитације и емисије за eGFP (*exG* и *emG*) и DsRED (*exD* и *emD*). DsRED се такође ексцитује плавом светлошћу (жута звездица). Црвеном стрелицом је обележена зона "цурења" DsRED сигнала емисије на GFP каналу (*em*).

За емисију DsRED-а у зеленом делу спектра је вероватно одговоран интермедијер у сазревању протеина, који показује зелену флуоресценцију (са емисионим максимумом на 499 nm (*Baird* и сар., 2000)). Зелена флуоресценција достиже свој максимум након седам сати на собној температури, а затим опада у току два дана, док црвена флуоресценција расте током времена и за пун интензитет је потребно неколико дана сазревања (*Baird* и сар., 2000). Захваљујући овоме, *in vivo* је могуће детектовати интермедијерну флуоресценцију жуто наранџасте боје, као последицу емисије у зеленом и црвеном делу спектра (*Baird* и сар., 2000; *Mirabella* и сар., 2004). Будући да смо ми посматрали нефиксирана ткива цикорије изолована са биљке истог дана када је вршена микроскопска анализа, у ткиву су вероватно били присутни и ови интермедијери хромофоре, пошто је експресија DsRED-а у стабилно трансформисаним клоновима континуирана.

Ова проблематика није детаљно обрађена у литератури, шта више, неки аутори су користили ове две хромофоре ради показивања колокализације експресије, да при томе нису приказивали контролне ћелије трансформисане само једним од ова два маркера, а детекцију су вршили у сличном опсегу таласних дужина, где је такође могло да дође до мешања сигнала (*Chen* и сар., 2009; *Marton* и сар., 2010).

У литератури на тему мешања DsRED и GFP сигнала, која је веома скромна, углавном се спомиње GFP *crossover* у DsRED канал - супротно од тога што смо ми приметили, и да се овај проблем може превазићи само коришћењем *spectral unmixing* техника (*Berg* и *Beachy*, 2008). Ове технике подразумевају компјутерску деконволуцију мешовитог сигнала, пореклом од аутофлуоресценције и више флуоресцентних протеина, поређењем са референтним спектрима репортера и аутофлуоресценцијом нетрансформисаног ткива. У том смислу је изузетно корисно имати више врста контрола - нетрансформисане биљке (*background* контроле) и биљке трансформисане са по једним од репортера (енг. *bleed-through controls*). У анализама трансформисане цикорије, користили смо као контроле нетрансформисане биљке и биљке трансформисане *DsRED*<sup>+</sup> контролом (поглавље 4.2.3), али, на жалост, нисмо добили клонове трансформисане *GFP*<sup>+</sup> контролом који су имали довољно јаку експресију репортера да би могли да их употребимо за даље развијање методе. *Spectral unmixing* такође захтева дуго скенирање ткива серијом таласних дужина светлости, што може довести до оштећења хромофора и смањења интензитета флуоресценције (енг. *photobleaching*) (*Berg* и *Beachy*, 2008). DsRED и GFP флуоресценција је успешно визуелизована и раздвојена уз помоћ *spectral unmixing* технике у ћелијама листа *Arabidopsis*-а, где су DsRED и GFP имали различит сигнал за субћелијску локализацију, али су били колокализовани у неким компартментима (*Ishida* и сар., 2008).

## 5.6      **Анализа промотора *GAS* и *GAO* гена**

Промотори гена су ДНК секвенце смештене узводно од кодирајућег дела секвенце гена, које садрже више *cis*-регулаторних елемената - места везивања транскрипционих фактора и других протеина који учествују у транскрипцији. Дужина промотора је варијабилна, али је реда величине 1 *kb* (Simonović, 2011). Код већине гена постоји минимални промотор, или језгро промотора (енг. *core promoter*), који је регион најближи кодирајућој секвенци и садржи главне елементе за функционисање промотора - *TATA* и *CAAT* блок (Simonović, 2011; Hernandez-Garcia и Finer, 2014). Ова два елемента, заједно са још неким *cis*-елементима, учествују у правилној иницијацији транскрипције. Узводно од језгра промотора, налазе се друге регулаторне секвенце - проксималне и дисталне, које садрже различите елементе као што су појачивачи, утишавачи (енг. *silencers*), *GC* острвца, *G*-блок и друге регулаторне секвенце које доприносе прецизној регулацији експресије на нивоу транскрипције. Неке од ових секвенци могу се налазити прилично далеко узводно од језгра промотора, али и у деловима низводно од кодирајуће секвенце, као и унутар ње. Далеки региони се могу приближити језгру промотора ради модификације транскрипције променама конформације ДНК и хроматина.

Откривање функционалних делова регулаторних секвенци гена биљака важно је како у основним истраживањима, на пример при проучавању биосинтезе одређене групе секундарних метаболита, тако и у биоинжењерству биљних врста ради појачавања постојећих или стицања нових квалитета.

За испитивање активности промотора гена из биосинтетског пута сесквитерпенских лактона, изабрани су гени са почетка пута биосинтезе СЛ код цикорије. Одабрана су два гена за гермакрен А синтазу - *CiGASlo* (*GAS long*) и *CiGASsh* (*GAS short*) (Bouwmeester и сар., 2002), и ген за гермакрен А оксидазу - *P450* (Cankar и сар., 2011). Ови гени су претходно изоловани из цикорије и њихова функција је окарактерисана у хетерологим системима (Bouwmeester и сар., 2002; Cankar и сар., 2011). Промотори ових гена су идентификовани по први пут у геному цикорије *in silico* (поглавље 4.2.1). За *GAS long* ген, пронађене су две копије у геному, али пошто је једна садржала ретротранспозонски инсерт у

секвенци промотора и стога вероватно није активна, одабрана је копија без транспозона. Пронађене су две копије *GAS short* гена, које су имале значајно различите секвенце промотора (*S29* и *S83*), обе су деловале функционално и одабране су за анализу. За *P450* ген, пронађене су три секвенце, а једна је била погодна за амплификацију - садржала је довољно информације узводно од кодирајуће секвенце. Код свих одабраних промотора, амплификован је максимум доступне секвенце на *BAC*-овима. Четири промотора су клонирана *Gateway* рекомбинацијама у *destination* векторе за трансформацију биљака, тако да је испитиван промотор фузионисан за *eGFP-GUS* касету, ради евалуације активности промотора преко експресије репортера (слика 42). Вектор је садржао *DsRED* под контролом убиквитинског промотора као маркер за котрансформацију.

Захваљујући растућем броју геномских секвенци, могуће је *in silico* претраживање и идентификација претпостављених региона промотора и *cis*-елемената у различитим базама података (*Hehl* и *Wingender*, 2001), попут интернет сервиса *Transcriptional Factor Search* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), која је искоришћена за претрагу секвенци промотора *GAS* и *GAO P450* гена цикорије. Овом претрагом, међутим, добија се велики број претпостављених *cis*-елемената, од којих је за само мали број показано да су функционални у биљци (*Hernandez-Garcia* и *Finer*, 2014). Функција тих елемената проверава се мутацијом или делецијом *cis*-елемената, фузијом таквих измењених промотора са репортер геном и експресијом у биљкама. Претрага *cis*-елемената је врло корисна и приликом клонирања промотора, ради утврђивања региона минималног промотора, и евалуације евентуалних грешака приликом амплификације и клонирања, да би се избегли клонови који имају мутације у језгру промотора. На основу овакве претраге, изабрани су клонови промотора *GAS* и *GAO* гена цикорије који су имали нетакнуте минималне промоторе (поглавље 4.2.1).

Мада праћење експресије гена са нативним промоторима у биљци даје одређене информације о функцији гена, дефинитивна потврда функције промотора и његових делова се врши експресијом промоторских фузија у

биљкама. Пролазна експресија, на пример агроинфилтрација, представља релативно брз и једноставан систем за проверу функционалности изолованих промотора, са којим је могуће брзо тестирати велики број конструката. Овај тип трансформације пружа основне информације о функционалности промотора и његовој јачини, мада не даје информације о временској и ткивној специфичности (Hernandez-Garcia и Finer, 2014). Пролазна експресија је обично јачег интензитета него стабилна експресија, што се објашњава екстрахромозомалном експресијом великог броја копија трансгена, која може да доведе и до утишавања гена. Осим тога, пролазна експресија не подлеже истој регулацији генске експресије као када се трансген интегрише у геном, па тако не даје потпуну информацију о тестираним промоторима (Hernandez-Garcia и Finer, 2014). Агроинфилтрација је искоришћена за проверу функционалности конструката и изолованих секвенци промотора цикорије. Провера је вршена GUS хистохемијским бојењем и мерењем GFP флуоресценције, а праћена је и DsRED флуоресценција ради евалуације генералног интензитета експресије трансгена (поглавље 4.2.2). Сва четири конструкта са промоторима имала су експресију оба флуоресцентна маркера, а поређена су са контролним конструктима  $DsRED^+$  и  $GFP^+$ , који су садржали по један од два маркера (слика 45). DsRED флуоресценција је била јача од GFP код сва четири конструкта са промоторима, и од  $GFP^+$  контроле (35S промотор), што је вероватно последица веће јачине убиквитинског промотора и/или веће оптичке јачине DsRED-а (поглавље 5.5). Флуоресценција је мерена након 5 и 11 дана од инфилтрације и уочен је пораст интензитета експресије оба маркера са временом. Такође, флуоресценција DsRED маркера је након 11 дана била врло уједначена међу узорцима са различитим конструктима (слика 46), док је GFP флуоресценција остала варијабилног интензитета (слика 47), што се вероватно може приписати различитој јачини промотора под чијом је контролом GFP маркер. Најјачи промотор је био конститутивни 35S промотор, док је код тестираних јачина била следећим редом:  $ProGasL \geq ProP450 > ProGasS83 \geq ProGasS29$ . Варијабилност експресије истог трансгена приликом агроинфилтрације може бити веома висока, и до 40% (Sheludko и сар., 2007), а она зависи од инфилтрираног листа, старости биљке, биљне врсте и времена узорковања (Buyel и сар., 2013), због чега је важна оптимизација протокола

инфилтрације и постојање одговарајућих контрола (неинфилтриране контроле, контроле инфилтриране једним маркером и празним сојем бактерија). Време узорковања може значајно утицати на уједначеност детектоване експресије, па је тако установљено да се варијабилност DsRED флуоресценције међу понављањима смањује након петог дана од инфилтрације (Buyel и сар., 2013), што је било и наше запажање, те је, за поређење нивоа експресије међу испитиваним промоторима и генерално повећање уједначености експресије трансгена, боље узорковати листове након више од 5 дана, уколико не долази до приметног утишавања трансгена.

Најпотпунији начин карактеризације промотора ипак представља стабилна трансформација биљака конструктима са промоторским фузијама. То могу бити биљке из којих је промотор изолован, или хетерологи системи као што су *Arabidopsis* и дуван. Промотори изоловани из биљака могу задржати своју нативну функционалност у трансгеним биљкама, али није редак случај и да се експресија трансгена разликује квалитативно или квантитативно у односу на оригиналан промотор у биљци, посебно када је у питању трансформација хетерологих система, будући да различите биљне врсте поседују различите транскрипционе факторе. ДНК трансгена се у већини случајева интегрише насумично у геном домаћина, па тако ниво експресије зависи, осим од употребљених регулаторних секвенци, и од места уградње, што је познато као позициони ефекат (Hernandez-Garcia и Finer, 2014). Зато је важна евалуација експресије што већег броја трансгених биљака. Добијање стабилно трансформисаних линија биљака је дуготрајан процес. Трансформације са *A. rhizogenes* у том смислу имају велики потенцијал, будући да је за добијање *HR* култура потребно неколико недеља, за разлику од других типова трансформације где је изналажење одговарајућих медијума и комбинације регулатора растења за одржавање трансгених ћелија често врло дуготрајан процес. *HR* културе могу бити добар систем за детекцију експресије флуоресцентних репортера, пошто углавном не садрже хлорофил који може да буде извор аутофлуоресценције. Уколико се жељени промотор не експримира у корену, могуће је добити целе регенерисане биљке у којима се онда детектује активност промотора.

Трансформација цикорије конструктима за анализу промотора била је врло ефикасна уз помоћ *A4M70GUS* соја *A. rhizogenes* (табела 23). Добијен је велики број клонова и њихових регенераната који су имали експресију трансгена са бинарног вектора, а селекцију је било могуће вршити преко DsRED флуоресценције (слика 57). Евалуација активности промотора *GAS* и *P450* гена је покушана детекцијом GFP флуоресценције на свим нивоима визуелизације - *LED* системом, флуоресцентном лупом, флуоресцентним микроскопом и конфокалним микроскопом, али није дала резултате, због озбиљног проблема аутофлуоресценције, конфликта DsRED и GFP репортера и немогућности раздвајања њихових спектра емисије (поглавље 5.5), а вероватно и због ниског нивоа експресије GFP-а под контролом испитиваних промотора. Додатно отежавајућа околност је била немогућност добијања квалитетне контроле - биљака трансформисаних *35S-GFP* вектором, а које би имале довољан ниво експресије маркера, ради развијања методе (поглавље 4.2.5). Ниво експресије трансгена, рецимо GUS маркера, могуће је пак утврдити на више начина: визуелно, хистохемијским бојењем, квантитативним есејом GUS активности, али и *qPCR*-ом на *uidA* транскрипт. У случају трансгених *Catharanthus roseus* коренова, на пример, ниво експресије GUS гена, установљене у различитим линијама *HR* култура, одлично је корелисао са детектованом GUS активношћу (Yang и сар., 2013b), сугеришући да је *qPCR* добра метода за предвиђање очекиване активности репортера.

Да би се утврдило да ли су интродуковани промотори активни у трансформисаним биљкама цикорије и у којој мери, урађена је анализа експресије GFP-а *RT-PCR*-ом и *qRT-PCR*-ом (поглавље 4.2.5). Тестиран је велики број регенерисаних биљака, у развојном стадијуму розете или цветања, а изолована је РНК из различитих биљних органа (корен, лист, стабло и цвет), ради утврђивања евентуалне орган-специфичне експресије. Готово све тестиране биљке су имале експресију GFP-а, барем у неком од органа, а већина биљака је експримирала маркер у свим тестираним органима (табела 25), сугеришући да ни један од четири тестирана промотора нема изразиту орган-специфичну експресију, али да су сви активни у биљкама цикорије. Јачина експресије GFP-а је прецизније окарактерисана *real-time PCR*-ом, на уједначеном узорку биљака исте старости, у

фази цветања (слика 67). По просечном броју копија *GFP* транскрипта, јачина промотора је била редом: *ProP450*>*ProGasL*>*ProGasS83*>*ProGasS29*, што је било слично резултату добијеном при агроинфилтрацији. Код две биљке трансформисане *ProGasS29* или *ProP450* конструктом, ниво експресије је био испод нивоа детекције (слика 67), што је могуће било последица утишавања трансгена у регенерантима, будући да је и *DsRED* експресија у овим регенерантима изостала, иако је била присутна у првим пасажима трансгених коренова. По детектованом броју копија *GFP*-а, постојала је тенденција ка орган-специфичности код клонова *ProGasS83*, *ProGasS29* и *ProP450* конструкта, где је већина тестираних биљака имала највећу експресију у корену (слика 67). За разлику од њих, биљке трансформисане *ProGasL* конструктом нису показивале никакву специфичност и све су се међусобно разликовале по нивоу експресије у различитим органима (слика 67).

Диференцијална експресија *GAS long* и *GAS short* гена код цикорије примећена је раније (*Bouwmeester* и сар., 2002). Експресија ова два гена, процењена *northern blot* техником, сугерисала је да се *GAS short* преференцијално експримира у ткиву задебљалог корена и зеленим и етиолираним клијанцима, а нема експресије у надземним деловима биљке - у развијеним листовима и у чиконима, док се *GAS long* форма експримира универзалније - у спољашњем делу корена, целим чиконима и клијанцима, али веома слабо у зеленим листовима (*Bouwmeester* и сар., 2002), што корелише са нашим запажањима о тенденцији експресије *GAS short* у корену, а универзалнијој експресији *GAS long*. Разлике у детектованој експресији у надземном делу биљке, могу се можда објаснити различитом осетљивошћу *northern* и *qRT-PCR* техника, или чињеницом да су аутори *Bouwmeester* и сар. анализирали биљке гајене у стакленику, не у *in vitro* условима. Могуће је такође да изоловане секвенце промотора ипак нису обухватале све регулаторне елементе (проксималне или дисталне) присутне нормално у биљци, који би додатно регулисали време и место експресије (*Hernandez-Garcia* и *Finer*, 2014). У случају *T. parthenium*, *GAS* ген се експримирао у свим надземним деловима биљке, а највише у цветовима, односно у жлезданим трихомима, посебно током биосинтетски најактивнијих фаза развића цвета, где је и концентрација партенолида, сесквитерпенског лактона



гермакранолидне структуре, била највиша (Majdi и сар., 2011). Са друге стране, главни сесквитерпенски лактони цикорије - лактуцин, лактупикрин и 8-деоксилактунин, нису присутни у језичастим цветовима цвасти цикорије, мада није познат њихов садржај у осталим деловима цвасти и трихомима (Rees и Harborne, 1985). Код зелене салате, експресија две форме *GAS* гена - *LTC1* и *LTC2*, анализирана је семиквантитативно *RT-PCR*-ом, где је установљено да се обе форме конститутивно експримирају у корену, хипокотилу и развијеним листовима, али да је експресија *LTC1* у листовима значајно слабија од *LTC2*, сугеришући диференцијалну експресију ове две форме (Bennett и сар., 2002). У котиледонима салате, експресија оба гена је била видљива само при инфекцији патогеном салате (*Bremia lactucae*), што је корелисало са повећаном акумулацијом сесквитерпеноида летуценина А - фитоалексина који се акумулира у котиледонима при фунгалној инфекцији салате и других врста *Asteraceae* (Bennett и сар., 2002), који међутим није до сада изолован из цикорије (Sessa и сар., 2000). Код артичоке, највиша експресија *GAS* гена детектована је у зрелим листовима старим 6 недеља, док је драстично нижа експресија карактерисала старије листове (20 недеља), дршку (рецептакулум) и калус пореклом од листова (Menin и сар., 2012).

Експресија гена за *GAO* није до сада окарактерисана у биљкама цикорије, а *cDNA* овог гена изолована је из задебљалог корена цикорије ради експресије у хетерологим домаћинима (Cankar и сар., 2011), док је *cDNA GAO* гена код зелене салате изолована из листова, и такође експримирана у хетерологим домаћинима - квасцима (Nguyen и сар., 2010). Промотор сродног гена за цитохром *P450* монооксигеназу код артемизије - *cyp71av1*, која каталише тростепену реакцију у биосинтези сесквитерпенског лактона артемизинина, активан је само у трихомима, где је претпостављена биосинтеза овог једињења (Wang и сар., 2011). Експресија сва три гена у путу биосинтезе костунолида од гермакрена А - *GAS*, *GAO* и *COS*, корелисала је међусобно код *T. cinerariifolium*, и била је највиша у жлезданим трихомима цветова, што је корелисало са акумулацијом сесквитерпенских лактона код ове врсте, док је експресија ових гена била знатно нижа у листовима, а испод нивоа детекције у клијанцима (Ramirez и сар., 2013). С тога је очекивано да експресиони профили *GAS* и *GAO* гена такође буду слични у

различитим деловима цикорије, будући да су гени из истог биосинтетског пута често заједно регулисани (*Schwab* и сар., 2010).

Еволутивни значај постојања две форме GAS ензима, са различитом специфичном активношћу, није јасан (*Bouwmeester* и сар., 2002). Могуће да различита активност ензима и преференцијална експресија у неком од органа омогућавају сезонске варијације у садржају сесквитерпенских лактона у различитим органима цикорије, што је најпре у вези са антихербиворном активношћу ових једињења и њиховом значају у одбрани биљке и њених органа (*Rees* и *Harborne*, 1985). Будући да садржај сесквитерпенских лактона у жлезданим трихомима сунцокрета није био стимулисан егзогено додатим метил-јасмонатом, вероватно је да ова једињења представљају пре конститутивну него индуцибилну одбрану од хербивора, или да индуцибилни сигнал за њихову синтезу иде другим сигналним путевима (*Rowe* и сар., 2012).

Тачан разлог за постојање два *GAS short* гена са различитим промоторима такође није познат. Будући да ова два гена имају готово исту кодирајућу секвенцу а различите промоторе (слика 35), разлике у њиховом нивоу експресије није могуће детектовати *qRT-PCR*-ом транскрипата гена. Једини начин утврђивања разлика у активности ових гена био је фузија њихових промотора са репортер геном (*GFP*) и мерење његове експресије у трансформантима. Судаћи по нивоу активности њихових промотора, *S29* ген се експримира слабије од *S83* гена у цикорији (слика 67). Две варијанте *GAS short* гена могле су настати дупликацијом, а затим променом секвенце промотора. Секвенца промотора често еволуира брже од кодирајуће секвенце гена, за коју је важно да задржи исти оквир читања и секвенцу нуклеотида да би се добио функционалан протеин (*Liang* и сар., 2008). Могуће је и да су два промотора еволуирала тако да везују различите транскрипционе факторе, па омогућавају диференцијалну регулацију гена у различитим ткивима или фазама развића биљке. Извор нових регулаторних *cis*-елемената могу бити транспозони и ретротранспозони, тј. њихове разноврсне регулаторне секвенце, који премештањем по геному биљака могу да допринесу еволуцији других гена и промотора (*Potenza* и сар., 2004; *Batut* и сар., 2013).

## 5.7 Утишавање *GAS* гена - ефекти на експресију и биосинтезу гвајанолида

Утишавање гена експресијом синтетичких *RNAi* конструката представља један од начина за проучавање функције одређеног гена у биљци. Трансформација биљака *amiRNA* конструктима, који по структури имитирају природне *miRNA*, полако преузима примат над дугим *hpRNA* конструктима, будући да је при конструкцији *amiRNA* лакше предвидети неспецифичне ефекте утишавања, нарочито користећи растући број доступних база секвенци генома и транскриптома (Ossowski и сар., 2008). За испитивање функције гена цикорије утишавањем, одабрани су гени за гермакрен А синтазу, са почетка биосинтетског пута сесквитерпенских лактона - *CiGASlo* (*GAS long*) и *CiGASsh* (*GAS short*). Утишавање ових гена, чији продукти синтетишу прекурсор сесквитерпенских лактона код цикорије - гермакрен А, претпостављено доводи до смањења садржаја свих једињења низводно у биосинтези - сесквитерпенских лактона и њихових деривата, па се ефекат утишавања очекивано може детектовати мерењем експресије утишаних гена и мерењем садржаја низводних једињења.

*AmiRNA* конструкти направљени су заменом постојеће секвенце природне микро РНК *Arabidopsis*-а секвенцом за утишавање ових гена, уз очување специфичности структуре микро РНК (поглавље 4.3.1). За оба гена, направљене су по две *amiRNA*, специфичне према *GAS long* или *GAS short*, дизајниране у различитим деловима секвенце, а направљена су и два конструкта за утишавање оба гена истовремено. *AmiRNA* у различитим деловима секвенце повећавају вероватноћу успешног утишавања, пошто понекад место везивања *amiRNA* на *mRNA* није приступачно због формирања секундарних структура (Schwab и сар., 2010). Склопљени конструкти су *Gateway* рекомбинацијама убачени у *destination* векторе за трансформацију биљака, под контролом *35S* промотора и терминатора (слика 77). Вектор је садржао и DsRED маркер под контролом убиквитинског промотора, за селекцију трансформаната. Промотор *35S* представља добар избор за конститутивну експресију *amiRNA* конструката у случајевима када утишавани ген кодира протеин који није кључан за функције ћелије, као што су гени

секундарног метаболизма, а ефекат утишавања у том случају може бити врло висок, налик *knockdown* мутацијама (Watson и сар., 2005).

За брзу проверу функционалности *amiRNA* конструката и интегритета вектора, употребљена је агроинфилтрација на салати (поглавље 4.3.2). Салата је сродна биљка цикорији (припадају племену *Cichorieae*), и синтетише исте типове гвајанолида (*Sessa* и сар., 2000). Салата поседује две варијанте гена за гермакрен А синтазу - *LTC1* и *LTC2* (*Bennett* и сар., 2002), а поређењем секвенце њихових *mRNA* са дизајнираним *amiRNA* конструката за цикорију, установљено је да барем три *amiRNA* имају потенцијал да утишавају гене салате, мада вероватно са слабијом ефикасношћу због постојања малих разлика у секвенци. Инфилтрирани листови су искоришћени за мерење експресије *LTC* гена и изолацију гвајанолида - 8-деоксилактучина, дихидролактучина, лактуцина и лактупикрина (слика 81, табела 27), од којих су само лактуцин и лактупикрин били присутни у значајној концентрацији. Инфилтрација *DsRED+* вектором, који не садржи конструкт за утишавање, довела је до пораста нивоа једињења и експресије гена у односу на неинфилтрирану контролу, што је вероватно последица генералне индукције синтезе секундарних метаболита, као вида одбране биљака од патогена, у овом случају бактерија (*Bennett* и *Wallsgrave*, 1994). С тога, при посматрању ефекта *amiRNA* конструката, листови инфилтрирани *DsRED+* вектором представљају бољу контролу од неинфилтрираних листова. У односу на ту контролу, листови инфилтрирани *amiRNA* конструктима имали су смањење дихидролактучина, лактуцина и лактупикрина (слика 81). У случају експресије гена, инфилтрирани листови су се међусобно разликовали у броју детектованих копија, сугеришући да није у свим листовима дошло до утишавања *LTC* гена, али је у неким листовима број транскрипата био значајно смањен, како у односу на инфилтрирану, тако и у односу на неинфилтрирану контролу (табела 27). Будући да је варијабилност у садржају једињења, а посебно у нивоу експресије гена, међу различитим инфилтрираним листовима била веома висока, није се могло засигурно закључити о ефекту примене конструката за утишавање гена у агроинфилтрацији салате, али је постојала индикација да конструкти делују. Агроинфилтрација *amiRNA* је, као релативно нова техника, до сада испитана на малом броју гена, углавном репортера или гена за резистенцију на вирусе, али показује велики потенцијал

(Liu и сар., 2009; Helm и сар., 2011; Jiang и сар., 2011; Jelly и сар., 2012; Roumi и сар., 2012).

Стабилна трансформација цикорије је искоришћена за проучавање дуготрајних ефеката утишавања *GAS* гена (поглавље 4.3.3). Од шест конструисаних *amiRNA* вектора, три су изабрана за *HR* трансформацију цикорије - *GasL1*, *GasS1* и *GasL&Sm*. Трансформација *A4M70GUS* сојем је дала велики број клонова и регенераната, од којих је већина експримирала DsRED маркер (табела 28, слика 83). Одређени број клонова сваког конструкта одабран је за евалуацију експресије циљаних *GAS* гена и метаболита низводно у путу биосинтезе. За анализу садржаја метаболита, одабрани су оксалати сесквитерпенских лактона - 8-деоксилактучин-15-оксалат, лактуцин-15-оксалат и лактупикрин-15-оксалат, који су били присутни у високој концентрацији у нетрансформисаним биљкама. Оксалати ових гвајанолида чине главну фракцију сесквитерпенских лактона цикорије и неколико врста салате, и присутни су у вишој концентрацији од слободних гвајанолида (*Sessa* и сар., 2000), па је било очекивано да ће ефекат утишавања гена са почетка биосинтезе на садржај ових једињења бити приметан у трансформисаним биљкама цикорије. Будући да постоји природна варијабилност међу јединкама цикорије добијеним из семена, ефекат утишавања гена код трансформаната процењен је поређењем трансформаната различитих клонова са мајком биљком - нетрансформисаном биљком од које су клонови потекли, ради максималног смањења варијабилности.

Сва три испитана конструкта - *GasL1*, *GasS2* и *GasL&Sm*, деловала су на утишавање *GAS* гена, што је било видљиво како на нивоу експресије гена, тако и у садржају једињења која су низводно у путу биосинтезе (слике 84, 85, 90 и 91). Код обе групе параметра смањење је било приметно барем код једног клона у свакој групи мајке биљке и њених клонова. Клонови исте мајке биљке су се међусобно разликовали у експресији гена и садржају метаболита, што се може вероватно објаснити позиционим ефектом уградње *amiRNA* трансгена (*Phillips* и сар., 1992). Варијабилан ниво утишавања гена који се добија код различитих трансгених линија трансформисаних истим конструктом, омогућава одабир линија са већим

или мањим нивоом утишавања, што може да помогне у карактеризацији функције гена (*Matthew, 2004*).

Конструкти, упркос дизајну, нису били специфични према једном од два *GAS* гена, већ су утишавали оба истовремено или један од њих, зависно од посматраног клона и органа (слике 84 и 85). Три добијена клона су имала пак утишан искључиво *GAS short* ген, и у изданку и у корену, па би се могли искористити за испитивање диференцијалног ефекта једног од два гена на биосинтезу гвајанолида. Будући да *GAS long* и *GAS short* гени имају делимично сличну кодирајућу секвенцу (слика 35), неспецифично утишавање ових сродних гена може бити последица директног деловања *amiRNA* на неспецифичан транскрипт (*Schwab и сар., 2010*). Други разлог неспецифичног утишавања може бити транзитивност *RNAi* механизма - преношење ефекта утишавања на гене који нису иницијално циљани. Транзитивност утишавања је омогућена синтезом *dsRNA* молекула од циљне *mRNA*. Синтеза *dsRNA* се врши уз помоћ *siRNA*, везаних за *mRNA* а насталих на пример од *hpRNA* конструката, који служе као прајмери, и *RDR* полимеразе (енг. *RNA dependent RNA polymerase*), која синтетише *antisense* РНК молекула према *mRNA* матрици (*Lipardi и сар., 2001*). Тај нови *dsRNA* молекула се изнова обрађује *DICER* ензимом и његови фрагменти могу да утишавају и секундарне *mRNA*, које првобитно нису биле предмет утишавања. Ови фрагменти се називају фазне секундарне *siRNA* (*phasiRNA*) или *tasiRNA* (енг. *trans-acting siRNA*) (*Fei и сар., 2013*). Сличан механизам је откривен и за *miRNA* молекуле, где је везивање *miRNA* за циљану *mRNA* секвенцу окидач синтезе комплементарног молекула РНК и стварања *dsRNA* која, обрађена *DICER* ензимима, даје секундарне *siRNA*, које садрже секвенце које нису биле првобитно присутне у *miRNA* или *amiRNA* конструкту (*Ronemus и сар., 2006*). Ове нове секвенце могу даље послужити као окидач за утишавање других гена, посебно ако су гени сличне секвенце, као што су *GAS* гени. Транзитивност утишавања донекле може бити смањена присуством разлика у секвенци нуклеотида између *miRNA* и циљне *mRNA* на 3'- крају (*Voinnet, 2008*), и *amiRNA* се дизајнирају имајући то у виду, али транзитивност утишавања може да зависи и од других фактора, као што су карактеристике примарног транскрипта, карактеристике структуре *amiRNA* конструкта, и дужине *miRNA* секвенце (*Fei и сар., 2013; McHale и сар., 2013*).

Сви тестирани клонови-регенеранти, за које је показано да постоји утишавање гена, имали су и DsRED флуоресценцију, мада средњи ниво флуоресценције корена регенеранта (прилог 3) није одговарао нивоу смањења експресије гена и садржаја једињења (слике 84, 85, 90 и 91). DsRED маркер се ипак показао корисним за селекцију клонова - ако је корен регенеранта флуоресцирао, велика је вероватноћа да ће бити присутно и утишавање гена у биљци. Ово је вероватно последица трансфера и уградње целе Т-ДНК бинарног плазида, на којој су и DsRED маркер и *amiRNA* конструкт. Захваљујући томе што се оба дела вероватно уграђују заједно у геном, било у део генома који се експримира, било у хетерохроматински део, на основу постојања експресије маркера могуће је предвидети експресију конструкта за утишавање, без обзира што су под контролом различитих промотора. Различити промотори су ипак условили разлике у нивоу експресије маркера и *amiRNA* конструкта, па ниво флуоресценције DsRED-а није увек могуће корелисати са нивоом утишавања гена.

Оба *GAS* гена су имала вишу експресију у корену него у изданку код нетрансформисаних биљака (слике 84 и 85), што се подударало са семи-квантитативним резултатима *northern blot*-а ова два гена које су добили *Bouwmeester* и сар. (2002). Ефекат утишавања гена је био више приметан на *GAS short* гену, који се одликовао и вишим нивоом експресије у корену и изданку нетрансформисаних биљака. Ниво смањења генске експресије у клоновима у односу на МБ контролу је био варијабилан. За *GAS long* ген, највеће смањење је било 30 пута у односу на контролу (3,25% од нивоа експресије у МБ), а *GAS short* 70 пута (1,42% нивоа МБ). У литератури, смањење експресије гена од 20% (80% од нивоа контроле) се сматра ефикасним утишавањем гена (*Wesley* и сар., 2001), док се најчешће пријављен ниво експресије утишаних гена кретао између 10 и 25% од контролног нивоа експресије, односно 4-10 пута мање од контроле (*Van Schie* и сар., 2007; *Runguphan* и сар., 2009; *Ré* и сар., 2012; *Luan* и сар., 2013; *Salim* и сар., 2013; *Yang* и сар., 2013a).

За разлику од гена, чија је експресија била виша у корену, садржај оксалата је био већи за ред величине у надземном делу биљке, где је било видљивије и смањење садржаја (слике 90 и 91). Лактупикрин-15-оксалат и лактуцин-15-

оксалат су били присутни у већој количини од 8-деоксилактучин-15-оксалата, који је у многим трансгеним узорцима био испод границе детекције, што је у складу са претходно описаном пропорцијом ових једињења у латексу цикорије (*Sessa* и сар., 2000). Смањење садржаја ових једињења у трансгеним клоновима у односу на садржај у МБ је било варијабилно, као и у случају нивоа експресије гена. Највеће смањење садржаја код трансгених клонова је било видљиво за лактуцин-15-оксалат - 200 пута мање од контроле (0,5% нивоа МБ) код неких узорака, док је за друга два једињења - 8-деоксилактучин-15-оксалат и лактупикрин-15-оксалат, максимално смањење било 60 пута (1,67% нивоа МБ) и 18 пута (5,49% нивоа МБ), редом. Карактеристично је било да клонови код којих није дошло до смањења садржаја једињења у једном делу биљке, имали су смањену количину у другом делу биљке, тако да гледано у целокупној биљци, сви тестирани клонови су показивали ефекте утишавања.

Судећи по променама у садржају једињења, ова два гена су највероватније заједно одговорна за биосинтезу гвајанолида у биљци, и од њиховог комплексног односа експресије, у корену и изданку, зависи и количина присутних гвајанолида и њихових деривата. Корелацијом експресије ових гена и садржаја три једињења (табела 29), установљена је значајна корелација између појединачних *GAS* гена и садржаја лактуцин-15-оксалата, 8-деоксилактучин-15-оксалата и лактупикрин-15-оксалата, у корену и изданку цикорије, мада није било могуће дискриминисати улоге ова два гена. Експресија *GAS long* и *GAS short* гена је међусобно значајно корелисала, сугеришући истовремено утишавање оба гена. Садржај три оксалата је такође био у међусобној корелацији, потврђујући да су у питању сродна једињења која деле заједничке кораке у биосинтези.

Истраживања утишавања гена у биосинтетском путу терпена код биљака су веома ретка. Код дувана, утишавање гена за 5-*epi*-аристолохен синтазу (*EAS*), који је кључан за биосинтезу сесквитерпеноида ове биљке, довело је до смањења нивоа *EAS* транскрипта на 14% од контроле код пролазно трансформисаних биљака дувана, и око 25% од контроле у стабилно трансформисаној линији дувана, док је код пролазно трансформисаних биљака примећено и смањење емисије испарљивих сесквитерпеноида  $\alpha$ - и  $\beta$ -кедрена на око 70% и 50% од



контролне вредности (Luan и сар., 2013). Код памука, откривене су две терпен синтазе (GhTPS1 и GhTPS2) одговорне за конверзију *FPP* у разноврсне сесквитерпене ( $\beta$ -кариофилен,  $\alpha$ -хумулен, гваја-1(10),11-диен,  $\beta$ -елемен) и једна монотерпен синтаза (GhTPS3) која синтетише испарљиве монотерпене -  $\alpha$ - и  $\beta$ -пинен (Yang и сар., 2013a). Пролазним утишавањем ових гена код памука, постигнуто је смањење експресије на око 15% од нивоа експресије у контроли, и детектовано је смањење нивоа датих једињења на око 10% контролних вредности. У оба ова примера, детектовани су директни производи утишаваних гена, без међузорака. У есеју пролазне трансформације код *Catharanthus roseus* (Salim и сар., 2013), праћена је експресија гена у једном делу биосинтетског пута, а детектован је производ који је удаљен три или више ензиматских корака у биосинтези, што је више налик систему који смо ми користили. Salim и сар. (2013) су тестирали три претпостављена гена за цитохром *P450* ензим који учествује у биосинтези секологанина, монотерпена иридоида који је прекурсор многих монотерпенских индолних алкалоида, укључујући антиканцерогене лекове винбластин и винкрестин. Утишавањем једног од тестираних гена, аутори су постигли утишавање експресије на 25% контролне вредности, и смањење секологанина (удаљеног три корака) на 30% од контроле, али и смањење два једињења још више удаљена у биосинтези - алкалоида катарантина и виндолина, који су били смањени на 40% и 70% контролне вредности.

Према доступној литератури, приказано смањење садржаја оксалата гвајанолида код цикорије је први успешан покушај редукције акумулације горких сесквитерпенских лактона, утишавањем гена из овог биосинтетског пута.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

---

- Цикорија је врло погодна за манипулацију *in vitro* техникама.
- Ефикасност трансформације цикорије зависи од употребљеног соја *A. rhizogenes*.
- Сој *A4M70GUS* је био погодан за трансформацију и котрансформацију бинарним векторима са задовољавајућом ефикасношћу.
- DsRED маркер се показао корисним за рану и недеструктивну селекцију трансформаната.
- Регенерација код нетрансформисаних и трансформисаних биљака је била спонтана.
- И трансформисане и нетрансформисане биљке су цветале *in vitro*.
- Цикорија *in vitro* продукује исте типове гвајанолида као и биљке гајене у природи.
- Флорална транзиција је имала супротан ефекат на садржај гвајанолида код трансформисаних и нетрансформисаних биљака:
- у трансформисаним биљкама, акумулација гвајанолида је била стимулисана приликом флоралне транзиције - и у листу и у корену регенераната.
- Ниво експресије *RolC* гена у различитим деловима регенераната подударала се са нивоом акумулације гвајанолида - оба параметра су била највиша у корену цветалих биљака.
- DsRED и GFP су инкомпатибилни као репортери услед мешања сигнала флуоресцентне емисије.
- Изоловани промотори *GAS long*, *GAS short* и *GAO* гена су активни у зеленој салати и цикорији, али су различите јачине.

- Промотор *GAS long* гена није ткивно специфичан, за разлику од *GAS short*, који је најактивнији у корену.
- *GAS long* и *GAS short* гени су имали вишу експресију у корену него у изданку код нетрансформисаних биљака.
- Утишавање *GAS long* и *GAS short* гена је успешно обављено, смањена је експресија ових гена и садржај метаболита низводно у путу биосинтезе - оксалата сесквитерпенских лактона.
- Утишавање *GAS long* и *GAS short* гена није било специфично без обзира на специфичан дизајн конструката.
- Ова два гена су највероватније заједно одговорна за биосинтезу гвајанолида у цикорији.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

---

- Abu-Reidah I. M., Contreras M. M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2013): Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *Journal of Chromatography A* 1313: 212-227
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. (2002): Studying gene expression and function. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science
- Asad M. (2006): RNA interference (RNAI) as a tool to engineer high nutritional value in chicory (*Chicorium intybus*). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 71: 75-78
- Baert J. R. A., Van Bockstaele E. J. (1992): Cultivation and breeding of root chicory for inulin production. *Industrial Crops and Products* 1: 229-234
- Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. (2000): Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11984-11989
- Bais H. P., George J., Ravishankar G. A. (1999): Influence of polyamines on growth of hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local) and formation of coumarins. *Journal of Plant Growth Regulation* 18: 33-37
- Bais H. P., Govindaswamy S., Ravishankar G. A. (2000a): Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.cv.Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90: 648-653
- Bais H. P., Ravishankar G. (2001): *Cichorium intybus* L – cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 467-484

- Bais H. P., Sudha G., Ravishankar G. A. (2001a): Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* and their regenerants. *Plant Cell Reports* 20: 547-555
- Bais H. P., Sudha G. S., Ravishankar G. A. (2000b): Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 238-248
- Bais H. P., Venkatesh R. T., Chandrashekar A., Ravishankar G. A. (2001b): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Witloof chicory - *In vitro* shoot regeneration and induction of flowering. *Current Science* 80: 83-87
- Barrero A. F., Oltra J. E., Álvarez M., Raslan D. S., Saúde D. A., Akssira M. (2000): New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia* 71: 60-64
- Batut P., Dobin A., Plessy C., Carninci P., Gingeras T. R. (2013): High-fidelity promoter profiling reveals widespread alternative promoter usage and transposon-driven developmental gene expression. *Genome Research* 23: 169-180
- Bennett M. H., Mansfield J. W., Lewis M. J., Beale M. H. (2002): Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry* 60: 255-261
- Bennett R. N., Wallsgrove R. M. (1994): Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633
- Berg R. H., Beachy R. N. (2008): Fluorescent protein applications in plants. *Methods in Cell Biology* 85: 153-177
- Bischoff T. A., Kelley C. J., Karchesy Y., Laurantos M., Nguyen-Dinh P., Arefi A. G. (2004): Antimalarial activity of lactucin and lactucopicrin: sesquiterpene

- lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 455-457
- Bocca C., Gabriel L., Bozzo F., Miglietta A. (2004): A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells. *Chemico-Biological Interactions* 147: 79-86
- Bogdanović M. D., Dragičević M. B., Tanić N. T., Todorović S. I., Mišić D. M., Živković S. T., Tissier A., Simonović A. D. (2013): Reverse transcription of 18S rRNA with poly(dT)18 and other homopolymers. *Plant Molecular Biology Reporter* 31: 55-63
- Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M. A. (2000): Effects of the *rolC* gene on hairy root: Induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *Journal of Natural Products* 63: 1249-1252
- Bouwmeester H. J., Kodde J., Verstappen F. W. A., Altug I. G., de Kraker J.-W., Wallaart T. E. (2002): Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology* 129: 134-144
- Breyer D., Kopertekh L., Reheul D. (2014): Alternatives to antibiotic resistance marker genes for *in vitro* selection of genetically modified plants - scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 286-330
- Bulgakov V., Veselova M. V., Tchernoded G. K., Kiselev K. V., Fedoreyev S. A., Zhuravlev Y. N. (2005): Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on ramosin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta* 221: 471-478
- Bulgakov V. P. (2008): Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances* 26: 318-324
- Bulgakov V. P., Khodakovskaya M. V., Labetskaya N. V., Chernoded G. K., Zhuravlev Y. N. (1998): The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry* 49: 1929-1934

- Bulgakov V. P., Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Gorpenchenko T. Y., Inyushkina Y. V. (2011): Application of *Agrobacterium rol* genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation. In: Genetic Transformation (Alvarez P. M.): InTech
- Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193
- Buyel J. F., Kaefer T., Buyel J. J., Fischer R. (2013): Predictive models for the accumulation of a fluorescent marker protein in tobacco leaves according to the promoter/5'UTR combination. *Biotechnology and Bioengineering* 110: 471-482
- Caffaro L., Dameri R. M., Profumo P., Bennici A. (1982): Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: 1. A cytological study. *Protoplasma* 111: 107-112
- Cankar K., Houwelingen A. v., Bosch D., Sonke T., Bouwmeester H., Beekwilder J. (2011): A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Letters* 585: 178-182
- Casanova E., Trillas M. I., Moysset L., Vainstein A. (2005): Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnology Advances* 23: 3-39
- Casanova E., Valdés A. E., Zuker A., Fernández B., Vainstein A., Trillas M. I., Moysset L. s. (2004): *rolC*-transgenic carnation plants: adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 167: 551-560
- Cervera M. (2004): Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection. In: Transgenic Plants: Methods and Protocols (Peña L.): Humana Press. pp: 203-214
- Chaudhuri K., Ghosh B., Tepfer D., Jha S. (2006): Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological

phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 25: 1059-1066

- Chawla H. S. (2000): Introduction to plant biotechnology, Enfield, N.H: Science Publishers
- Chen J. H., Ho C. T. (1997): Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2374-2378
- Chen S., Songkumarn P., Liu J., Wang G.-L. (2009): A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics. *Plant Physiology* 150: 1111-1121
- Cho W. K., Chen X. Y., Uddin N. M., Rim Y., Moon J., Jung J. H., Shi C., Chu H., Kim S., Kim S. W., Park Z. Y., Kim J. Y. (2009): Comprehensive proteome analysis of lettuce latex using multidimensional protein-identification technology. *Phytochemistry* 70: 570-578
- Christey M. (2001): Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37: 687-700
- Christian Z. (2008): Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Phytochemistry* 69: 2270-2296
- Cinkilic N., Cetintas S. K., Zorlu T., Vatan O., Yilmaz D., Cavas T., Tunc S., Ozkan L., Bilaloglu R. (2013): Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* 53: 359-363
- Conforti F., Ioele G., Statti G. A., Marrelli M., Ragno G., Menichini F. (2008): Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3325-3332
- Csupor-Löffler B., Hajdú Z., Réthy B., Zupkó I., Máthé I., Rédei T., Falkay G., Hohmann J. (2009): Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytotherapy Research* 23: 1109-1115



- Curtis M. D., Grossniklaus U. (2003): A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* 133: 462-469
- de Kraker J.-W., Franssen M. C. R., Dalm M. C. F., de Groot A., Bouwmeester H. J. (2001): Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene A hydroxylase and NADP+-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiology* 125: 1930-1940
- de Kraker J.-W., Franssen M. C. R., de Groot A., König W. A., Bouwmeester H. J. (1998): (+)-germacrene A biosynthesis. The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology* 117: 1381-1392
- de Kraker J.-W., Franssen M. C. R., Joerink M., de Groot A., Bouwmeester H. J. (2002): Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology* 129: 257-268
- De La Riva G. A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 25-48
- De Ruijter N. C. A., Verhees J., Van Leeuwen W., Van Der Krol A. R. (2003): Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biology* 5: 103-115
- Demeulemeester M. A., Voet A., Van De Mierop A., De Proft M. P. (1995): Stem elongation and floral initiation on *in vitro* chicory root explants: Influence of photoperiod. *Plant Growth Regulation* 16: 233-238
- Demeulemeester M. A. C., De Proft M. P. (2000): Use of chicory root explants *in vitro* as a model for the induction of different stem types. *Journal of Plant Physiology* 156: 413-418
- Dietrich C., Maiss E. (2002): Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma sp.* as a reporter protein in higher plants. *BioTechniques* 32: 286-293

- Domínguez A., Fagoaga C., Navarro L., Moreno P., Peña L. (2002): Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular Genetics and Genomics* 267: 544-556
- Drew D., Krichau N., Reichwald K., Simonsen H. (2009): Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 8: 581-599
- Evert R. F., Eichhorn S. E. (2006): Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development: Third Edition, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Fei Q., Xia R., Meyers B. C. (2013): Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 25: 2400-2415
- Feng R., Lu Y., Bowman L. L., Qian Y., Castranova V., Ding M. (2005): Inhibition of activator protein-1, NF- $\kappa$ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry* 280: 27888-27895
- Fernandes M. B., Scotti M. T., Ferreira M. J. P., Emerenciano V. P. (2008): Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43: 2197-2205
- Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Glorian V., Durand R. (2004): 24-Methyl/methylene sterols increase in monoxenic roots after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 163: 159-167
- Francisco V., Costa G., Figueirinha A., Marques C., Pereira P., Miguel Neves B., Celeste Lopes M., García-Rodríguez C., Teresa Cruz M., Teresa Batista M. (2013): Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 148: 126-134

- Frulleux F., Weyens G., Jacobs M. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of shoot-buds of chicory. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 107-112
- Gasic K., Hernandez A., Korban S. S. (2004): RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 437a-437g
- Gelvin S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16-37
- Genga A., Giansante L., Bernacchia G., Allavena A. (1994): Plant regeneration from *Cichorium intybus* L. leaf explants transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Genetics and Breeding* 48: 25-32
- Georgiev M. I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J. (2012): Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology* 30: 528-537
- Georgiev M. I., Pavlov A. I., Bley T. (2007): Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 1175-1185
- Giri A., Narasu M. L. (2000): Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18: 1-22
- Gonthier L., Bellec A., Blassiau C., Prat E., Helmstetter N., Rambaud C., Huss B., Hendriks T., Bergès H., Quillet M. C. (2010): Construction and characterization of two BAC libraries representing a deep-coverage of the genome of chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae). *BMC Research Notes* 3
- Goodin M. M., Dietzgen R. G., Schichnes D., Ruzin S., Jackson A. O. (2002): pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant Journal* 31: 375-383

- Göpfert J. C., MacNevin G., Ro D. K., Spring O. (2009): Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitata glandular trichomes. *BMC Plant Biology* 9
- Grazia S., Rocchetta G., Pieragostini E. (1985): Somatic variation in micropropagated clones of *Cichorium intybus*. *Experientia* 41: 393-395
- Hagel J. M., Yeung E. C., Facchini P. J. (2008): Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science* 13: 631-639
- Halfhill M. D., Millwood R. J., Stewart Jr C. N. (2005): Green fluorescent protein quantification in whole plants. In: *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (Peña L.): Humana Press. pp: 215-226
- Hartley J. L., Temple G. F., Brasch M. A. (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* 10: 1788-1795
- Haymes K. M. (1996): Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 280-284
- Hehl R., Wingender E. (2001): Database-assisted promoter analysis. *Trends in Plant Science* 6: 251-255
- Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Romani A. (2009): Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry* 114: 765-770
- Helber N., Requena N. (2008): Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 177: 537-548
- Helm J. M., Dadami E., Kalantidis K. (2011): Local RNA silencing mediated by agroinfiltration. In: *RNAi and Plant Gene Function Analysis* (Kodama H., Komamine A.): Springer. pp: 97-108

- Hernandez-Garcia C. M., Finer J. J. (2014): Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 217-218: 109-119
- Hwang H. J., Ko B., Baek K., Choi G. W. (2009): Transformation of chicory with  $\gamma$ -*TMT* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 27: 287-292
- Ikezawa N., Göpfert J. C., Nguyen D. T., Kim S. U., O'Maille P. E., Spring O., Ro D. K. (2011): Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 286: 21601-21611
- Inoguchi M., Nishimura H., Okada S., Kato J. (1995): Influence of day-length on flowering of Ri-transformed *Cichorium intybus* plants. *Plant Tissue Culture Letters* 12: 209-213
- Ishida H., Yoshimoto K., Izumi M., Reisen D., Yano Y., Makino A., Ohsumi Y., Hanson M. R., Mae T. (2008): Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology* 148: 142-155
- Jagtap U. B., Gurav R. G., Bapat V. A. (2011): Role of RNA interference in plant improvement. *Naturwissenschaften* 98: 473-492
- Jakobs S., Subramaniam V., Schönle A., Jovin T. M., Hell S. W. (2000): EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Letters* 479: 131-135
- Jelly N. S., Schellenbaum P., Walter B., Maillot P. (2012): Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Research* 21: 1319-1327

- Jiang F., Song Y., Han Q., Zhu C., Wen F. (2011): The choice of target site is crucial in artificial miRNA-mediated virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76: 2-8
- Jin P., Zhao Y., Ngalame Y., Panelli M. C., Nagorsen D., Monsurró V., Smith K., Hu N., Su H., Taylor P. R., Marincola F. M., Wang E. (2004): Selection and validation of endogenous reference genes using a high throughput approach. *BMC Genomics* 5
- Joh L. D., Wroblewski T., Ewing N. N., VanderGheynst J. S. (2005): High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnology and Bioengineering* 91: 861-871
- Kabir M. H., Qadir S. A., Hassan S. A., Ahn J., Wang M. H. (2008): RNAi: An emerging field of molecular research. *African Journal of Biotechnology* 7: 4784-4788
- Kamada H., Ono A., Saitou T., Harada H. (1992): No requirement of vernalization for flower formation in Ri-transformed *Cichorium* plants. *Plant Tissue Culture Letters* 9: 206-213
- Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. (1997): An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 122: 101-108
- Karimi M., Bleys A., Vanderhaeghen R., Hilson P. (2007): Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology* 145: 1183-1191
- Karimi M., Inzé D., Depicker A. (2002): GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195
- Kim D. H., Eu Y.-J., Yoo C. M., Kim Y.-W., Pih K. T., Jin J. B., Kim S. J., Stenmark H., Hwang I. (2001): Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *The Plant Cell Online* 13: 287-301

- Kiselev K. V., Dubrovina A. S., Veselova M. V., Bulgakov V. P., Fedoreyev S. A., Zhuravlev Y. N. (2007): The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology* 128: 681-692
- Kisiel W., Zielinska K. (2001): Guaianolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 57: 523-527
- Kohlen W., Charnikhova T., Liu Q., Bours R., Domagalska M. A., Beguerie S., Verstappen F., Leyser O., Bouwmeester H., Ruyter-Spira C. (2011): Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 974-987
- Komori T., Imayama T., Kato N., Ishida Y., Ueki J., Komari T. (2007): Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiology* 145: 1155-1160
- Krak K., Mráz P. (2008): Trichomes in the tribe Lactuceae (Asteraceae) - Taxonomic implications. *Biologia* 63: 616-630
- Kusaba M. (2004): RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 139-143
- Lange B. M., Ahkami A. (2013): Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes—current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal* 11: 169-196
- Lange M. B., Turner G. W. (2013): Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal* 11: 2-22
- Leach F., Aoyagi K. (1991): Promoter analysis of the highly expressed *rolC* and *rolD* root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 79: 69-76
- Lee M. W., Yang Y. (2006): Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. In: *Arabidopsis Protocols* (Salinas J., Sanchez-Serrano J.): Humana Press. pp: 225-229

- Lessard P. A., Kulaveerasingam H., York G. M., Strong A., Sinskey A. J. (2002): Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering* 4: 67-79
- Liang H., Lin Y. S., Li W. H. (2008): Fast evolution of core promoters in primate genomes. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1239-1244
- Limami M. A., Sun L.-Y., Douat C., Helgeson J., Tepfer D. (1998): Natural genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Annual flowering in two biennials, Belgian endive and carrot. *Plant Physiology* 118: 543-550
- Limpens E., Ramos J., Franken C., Raz V., Compaan B., Franssen H., Bisseling T., Geurts R. (2004): RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 55: 983-992
- Lipardi C., Wei Q., Paterson B. M. (2001): RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107: 297-307
- Liu C., Zhang L., Sun J., Luo Y., Wang M. B., Fan Y. L., Wang L. (2009): The artificial microRNA mediates GUS-GFP gene silencing using ath-miR169d precursor as backbone. *Life Science Journal* 6: 86-94
- Liu Q., Majdi M., Cankar K., Goedbloed M., Charnikhova T., Verstappen F. W. A., de Vos R. C. H., Beekwilder J., van der Krol S., Bouwmeester H. J. (2011): Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 6: e23255
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408
- Luan J. B., Yao D. M., Zhang T., Walling L. L., Yang M., Wang Y. J., Liu S. S. (2013): Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. *Ecology Letters* 16: 390-398



- Majdi M., Liu Q., Karimzadeh G., Malboobi M. A., Beekwilder J., Cankar K., Vos R. D., Todorović S., Simonović A., Bouwmeester H. (2011): Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry* 72: 1739-1750
- Malarz J., Stojakowska A., Kisiel W. (2002): Sesquiterpene lactones in a hairy root culture of *Cichorium intybus*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 57: 994-997
- Malarz J., Stojakowska A., Kisiel W. (2013): Long-term cultured hairy roots of chicory—a rich source of hydroxycinnamates and 8-deoxylactucin glucoside. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 1-13
- Manimaran P., Ramkumar G., Sakthivel K., Sundaram R. M., Madhav M. S., Balachandran S. M. (2011): Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances* 29: 703-714
- Mansoor S., Amin I., Hussain M., Zafar Y., Briddon R. W. (2006): Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends in Plant Science* 11: 559-565
- Marton I., Zuker A., Shklarman E., Zeevi V., Tovkach A., Roffe S., Ovadis M., Tzfira T., Vainstein A. (2010): Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiology* 154: 1079-1087
- Matthew L. (2004): RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Functional Genomics* 5: 240-244
- Matvieieva N. A., Kishchenko O. M., Potrochov A. O., Shakhovsky A. M., Kuchuk M. V. (2011): Regeneration of transgenic plants from hairy roots of *Cichorium intybus* L. var. *Foliosum* Hegi. *Cytology and Genetics* 45: 277-281
- Matvieieva N. A., Shakhovsky A. M., Gerasymenko I. M., Kvasko O. Y., Kuchuk N. V. (2009): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cichorium intybus* L. with interferon- $\alpha 2b$  gene. *Biopolymers and Cell* 25: 120-125

- Matzke M. A., Matzke A. J. M. (1998): Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 54: 94-103
- McHale M., Eamens A. L., Finnegan E. J., Waterhouse P. M. (2013): A 22-nt artificial microRNA mediates widespread RNA silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 76: 519-529
- Mekky H., Mohamed M., Lazarus C., Power J. B., Davey M. R. (2011): Biosynthesis of very long chain polyunsaturated fatty acids in the leafy vegetable chicory. *Agricultural and Food Science* 20: 327-340
- Meng S., Cao J., Feng Q., Peng J., Hu Y. (2013): Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013
- Menin B., Comino C., Portis E., Moglia A., Cankar K., Bouwmeester H. J., Lanteri S., Beekwilder J. (2012): Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 190: 1-8
- Meyers B. C., Galbraith D. W., Nelson T., Agrawal V. (2004): Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant Physiology* 135: 637-652
- Michiels A., Van Laere A., Van Den Ende W., Tucker M. (2004): Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *Journal of Experimental Botany* 55: 1325-1333
- Miki B., McHugh S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107: 193-232
- Mirabella R., Franken C., Van Der Krogt G. N. M., Bisseling T., Geurts R. (2004): Use of the fluorescent timer DsRED-E5 as reporter to monitor dynamics of gene activity in plants. *Plant Physiology* 135: 1879-1887

- Mišić D., Šiler B., Skorić M., Djurickovic M. S., Nestorović Živković J., Jovanović V., Giba Z. (2013): Secoiridoid glycosides production by *Centaureum maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochemistry* 48: 1587-1591
- Mitić N., Dmitrović S., Djordjević M., Zdravković-Korać S., Nikolić R., Raspor M., Djordjević T., Maksimović V., Živković S., Krstić-Milošević D., Stanišić M., Ninković S. (2012): Use of *Chenopodium murale* L. transgenic hairy root *in vitro* culture system as a new tool for allelopathic assays. *Journal of Plant Physiology* 169: 1203-1211
- Momčilović I., Grubišić D., Kojić M., Nešković M. (1997): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and plant regeneration of four *Gentiana* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 1-6
- Moriuchi H., Fujikawa Y., Aly M. A. M., Saneoka H., Fujita K., Yamashita I., Tanaka N. (2004): Hairy root-mediated transgenic-plant regeneration in Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *Plant Biotechnology* 21: 165-168
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Nakamura T., Handa T., Oono Y., Kanaya K., Michikawa M., Uchimiya H. (1988): Organ-specific mRNA in transgenic tobacco plants possessing T-DNA of Ri plasmids. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 56: 213-218
- Nancharaiah Y. V., Wattiau P., Wuertz S., Bathe S., Mohan S. V., Wilderer P. A., Hausner M. (2003): Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for *in situ* monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4846-4852
- Nandagopal S., Kumari B. D. R. (2007): Phytochemical and antibacterial studies of chicory (*Cichorium intybus* L.) - a multipurpose medicinal plant. *Advances in Biological Research* 1: 17-21

- Negrouk V., Eisner G., Lee H.-i., Han K., Taylor D., Wong H. C. (2005): Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Science (Amsterdam, Netherlands)* 169: 433-438
- Nestorov J., Matic G., Elakovic I., Tanic N. (2013): Gene expression studies: How to obtain accurate and reliable data by quantitative real-time RT PCR. *Journal of Medical Biochemistry* 32: 325-338
- Nguyen D. T., Göpfert J. C., Ikezawa N., MacNevin G., Kathiresan M., Conrad J., Spring O., Ro D. K. (2010): Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae. *Journal of Biological Chemistry* 285: 16588-16598
- Nilsson O., Olsson O. (1997): Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum* 100: 463-473
- Nishimura H., Satoh A. (2006): Antimicrobial and nematicidal substances from the root of chicory (*Cichorium intybus*). In: Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases (Inderjit, Mukerji K. G.): Springer. pp: 177-180
- Nishizawa K., Kita Y., Kitayama M., Ishimoto M. (2006): A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean. *Plant Cell Reports* 25: 1355-1361
- Nizam S., Verma S., Singh K., Aggarwal R., Srivastava K. D., Verma P. K. (2012): High reliability transformation of the wheat pathogen *Bipolaris sorokiniana* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Microbiological Methods* 88: 386-392
- Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. (1990): Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant and Cell Physiology* 31: 805-813
- Op den Camp R. H. M., De Mita S., Lillo A., Cao Q., Limpens E., Bisseling T., Geurts R. (2011): A phylogenetic strategy based on a legume-specific whole genome

- duplication yields symbiotic cytokinin type-A response regulators. *Plant Physiology* 157: 2013-2022
- Ossowski S., Schwab R., Weigel D. (2008): Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* 53: 674-690
- Özçelik B., Kartal M., Orhan I. (2011): Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology* 49: 396-402
- Palazón J., Cusidó R. M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales C., Piñol M. T. (1998): Relation between the amount of *rolC* gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* transformed root cultures. *Journal of Plant Physiology* 153: 712-718
- Palazón J., Cusidó R. M., Roig C., Piñol M. T. (1997): Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 155-162
- Park S. H., Choi S. U., Lee C. O., Yoo S. E., Yoon S. K., Kim Y. K., Ryu S. Y. (2001): Costunolide, a sesquiterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*, inhibits the RAS-farnesyl-proteintransferase. *Planta Medica* 67: 358-359
- Petrovic J., Stanojkovic A., Comic L., Curcic S. (2004): Antibacterial activity of *Cichorium intybus*. *Fitoterapia* 75: 737-739
- Phillips J. P., Xing T., Gartland J. S., Gartland K. M. A., Elliott M. C. (1992): Variation in  $\beta$ -glucuronidase activity of clones of transformed sugar beet roots. *Plant Growth Regulation* 11: 319-325
- Piéron S., Watillon B. (2001): Expression of a chimeric GUS gene construct as a tool to study nodule morphogenesis in chicory leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 159-165
- Pitzschke A. (2013): *Agrobacterium* infection and plant defense-transformation success hangs by a thread. *Frontiers in Plant Science* 4

- Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan C. (2004): Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40: 1-22
- Pretto R. F., Santarém R. E. (2000): Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 107-113
- Preuss S., Pikaard C. S. (2003): Targeted gene silencing in plants using RNA interference. In: RNA Interference (RNAi) - Nuts & Bolts of siRNA Technology (Engelke D.): DNA Press, LLC. pp: 23-36
- Price K. R., Dupont M. S., Shepherd R., Chan H. W. S., Fenwick G. R. (1990): Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53: 185-192
- Profumo P., Gastaldo P., Caffaro L., Dameri R. M., Michelozzi G. R., Bennici A. (1985): Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: II. Effect of different hormonal treatments. *Protoplasma* 126: 215-220
- Qi S., Gomez-Barrios M. L., Hopper E. L., Hjortso M. A., Fischer N. H. (1995): Biosynthetic studies of lactucin derivatives in hairy root cultures of *Lactuca floridana*. *Phytochemistry* 40: 1659-1665
- Quaedvlieg N. M., Schlaman H. M., Admiraal P., Wijting S., Stougaard J., Spalink H. (1998): Fusions between green fluorescent protein and  $\beta$ -glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. *Plant Molecular Biology* 38: 861-873
- Ramirez A. M., Saillard N., Yang T., Franssen M. C. R., Bouwmeester H. J., Jongma M. A. (2013): Biosynthesis of sesquiterpene lactones in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*). *PLoS One* 8
- Ré D. A., Raud B., Chan R. L., Baldwin I. T., Bonaventure G. (2012): RNAi-mediated silencing of the HD-Zip gene HD20 in *Nicotiana attenuata* affects benzyl

acetone emission from corollas via ABA levels and the expression of metabolic genes. *BMC Plant Biology* 12

Rees S. B., Harborne J. B. (1985): The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry* 24: 2225-2231

Rehman R. U., Israr M., Srivastava P. S., Bansal K. C., Abdin M. Z. (2003): *In vitro* regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 39: 142-146

Rhodes M. J. C., Parr A. J., Giulietti A., Aird E. L. H. (1994): Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 143-151

Ronemus M., Vaughn M. W., Martienssen R. A. (2006): MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1559-1574

Rosellini D. (2012): Selectable markers and reporter genes: A well furnished toolbox for plant science and genetic engineering. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 401-453

Roumi V., Afsharifar A., Saldarelli P., Niazi A., Martelli G. P., Izadpanah K. (2012): Transient expression of artificial microRNAs confers resistance to grapevine virus A in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Pathology* 94: 643-649

Rowe H. C., Ro D.-k., Rieseberg L. H. (2012): Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaf surface defenses to exogenous methyl jasmonate. *PLoS One* 7: e37191

Runguphan W., Maresh J. J., O'Connor S. E. (2009): Silencing of tryptamine biosynthesis for production of nonnatural alkaloids in plant culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 13673-13678

- Saito K., Yamazaki M., Murakoshi I. (1992): Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products* 55: 149-162
- Salim V., Yu F., Altarejos J., De Luca V. (2013): Virus-induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Plant Journal* 76: 754-765
- Sambrook J. J., Green M. R. (2012): Molecular cloning: A laboratory manual, 4th edn, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp 5
- Schöb H., Kunz C., Meins Jr F. (1997): Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics MGG* 256: 581-585
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D. (2006): Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 18: 1121-1133
- Schwab R., Ossowski S., Warthmann N., Weigel D. (2010): Directed gene silencing with artificial microRNAs. In: Plant MicroRNAs (Meyers B. C., Green P. J.): Humana Press. pp: 71-88
- Sessa R. A., Bennett M. H., Lewis M. J., Mansfield J. W., Beale M. H. (2000): Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species: MAJOR LATEX COMPONENTS ARE NOVEL OXALATE AND SULFATE CONJUGATES OF LACTUCIN AND ITS DERIVATIVES. *Journal of Biological Chemistry* 275: 26877-26884
- Sheludko Y. V., Sindarovska Y. R., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Kuchuk N. V. (2007): Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering* 96: 608-614



- Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Mischenko N. P., Fedoreyev S. A., Zhuravlev Y. N. (2008): Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 118-125
- Simonović A. (2011): *Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka*, Beograd: NNK internacional
- Simonsen H., Weitzel C., Christensen S. (2013): Guaianolide sesquiterpenoids: Pharmacology and biosynthesis. In: *Natural Products* (Ramawat K. G., Mérillon J.-M.): Springer Berlin Heidelberg. pp: 3069-3098
- Simpson R. B., Spielmann A., Margossian L., McKnight T. D. (1986): A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology* 6: 403-415
- Small I. (2007): RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 148-153
- Sprenger N., Schellenbaum L., Van Dun K., Boller T., Wiemken A. (1997): Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase. *FEBS Letters* 400: 355-358
- Sretenović-Rajičić T., Ninković S., Miljuš-Dukić J., Vinterhalter B., Vinterhalter D. (2006): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Brassica oleracea* var. *sabauda* and *B. oleracea* var. *capitata*. *Biologia Plantarum* 50: 525-530
- Srivastava S., Srivastava A. K. (2007): Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 27: 29-43
- Stewart C.N, Jr. (2001): The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports* 20: 376-382
- Stewart Jr C. N. (2006): Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotechnology* 24: 155-162

- Stiller J., Martirani L., Tuppale S., Chian R.-J., Chiurazzi M., Gresshoff P. M. (1997): High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 48: 1357-1365
- Street R. A., Sidana J., Prinsloo G. (2013): *Cichorium intybus*: Traditional Uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 13
- Subotić A., Jevremović S., Grubisić D., Janković T. (2009): Spontaneous plant regeneration and production of secondary metabolites from hairy root cultures of *Centaurea erythraea* Rafn. In: Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, *Methods in Molecular Biology* (Saxena P. K., Jain S. M.): Humana Press. pp: 205-215
- Sujatha G., Zdravković-Korać S., Čalić D., Flamini G., Ranjitha Kumari B. D. (2013): High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products* 44: 643-652
- Sun L.-Y., Touraud G., Charbonnier C., Tepfer D. (1991): Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering. *Transgenic Research* 1: 14-22
- Talano M. A., Wevar Oller A. L., González P. S., Agostini E. (2012): Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Patents on Biotechnology* 6: 115-133
- Tepfer M., Casse-Delbart F. (1987): *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Sciences* 4: 24-28
- Terato M., Ishikawa A., Yamada K., Ozeki Y., Kitamura Y. (2011): Increased furanocoumarin production by *Glehnia littoralis* roots induced via *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Biotechnology* 28: 317-321

- Ting H. M., Wang B., Rydén A. M., Woittiez L., Van Herpen T., Verstappen F. W. A., Ruyter-Spira C., Beekwilder J., Bouwmeester H. J., Van der Krol A. (2013): The metabolite chemotype of *Nicotiana benthamiana* transiently expressing artemisinin biosynthetic pathway genes is a function of CYP71AV1 type and relative gene dosage. *New Phytologist* 199: 352-366
- Toplak N., Okršlar V., Stanič-Racman D., Gruden K., Žel J. (2004): A high-throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants with real-time PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 237-250
- Tzfira T., Citovsky V., Eds. (2008): *Agrobacterium: from biology to biotechnology*: Springer
- Upadhyay R. (2011): Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. *International Journal of Green Pharmacy* 5: 169-180
- Valvekens D., Montagu M. V., Lijsebettens M. V. (1988): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 5536-5540
- Van Beek T. A., Maas P., King B. M., Leclercq E., Voragen A. G. J., De Groot A. (1990): Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1035-1038
- Van Schie C. C. N., Ament K., Schmidt A., Lange T., Haring M. A., Schuurink R. C. (2007): Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *Plant Journal* 52: 752-762
- Varotto S., Lucchin M., Parrini P. (1997): Plant regeneration from protoplasts of Italian red chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 51: 17-22
- Veena V., Taylor C. (2007): *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 383-403

- Venkatachalam L., Lokesh V., Bhagyalakshmi N. (2011): A rare event of *Agrobacterium rhizogenes*-assisted genetic transformation of 'silk' Banana (genotype-AAB). *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 3: 13-17
- Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. (1992): *Agrobacterium* mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Plant Cell Reports* 11: 243-247
- Vertrees G. L., Mahlberg P. G. (1978): Structure and ontogeny of laticifers in *Cichorium intybus* (Compositae). *American Journal of Botany* 65: 764-771
- Vinterhalter B., Ninković S., Cingel A., Vinterhalter D. (2006): Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia Plantarum* 50: 767-770
- Vinterhalter B., Zdravković-Korać S., Ninković S., Mitić N., Janković T., Miljuš-Djukić J., Vinterhalter D. (2011): Variability in shoot cultures regenerated from hairy roots of *Gentiana punctata*. *Biologia Plantarum* 55: 414-422
- Vitha S., Benes K., Phillips J. P., Gartland K. M. (1995): Histochemical GUS analysis. In: *Agrobacterium Protocols* (Gartland K. A., Davey M.): Springer New York. pp: 185-193
- Voinnet O. (2008): Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* 13: 317-328
- Wall M. A., Socolich M., Ranganathan R. (2000): The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature Structural Biology* 7: 1133-1138
- Wang D., Zhang C., Hearn D., Kang I.-H., Punwani J., Skaggs M., Drews G., Schumaker K., Yadegari R. (2010): Identification of transcription-factor genes expressed in the *Arabidopsis* female gametophyte. *BMC Plant Biology* 10: 110
- Wang Q., Cui J. (2011): Perspectives and utilization technologies of chicory (*Cichorium intybus* L.): A review. *African Journal of Biotechnology* 10: 1966-1977

- Wang Y., Yang K., Jing F., Li M., Deng T., Huang R., Wang B., Wang G., Sun X., Tang K. X. (2011): Cloning and characterization of trichome-specific promoter of *cpr71av1* gene involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Molecular Biology* 45: 751-758
- Watson J. M., Fusaro A. F., Wang M., Waterhouse P. M. (2005): RNA silencing platforms in plants. *FEBS Letters* 579: 5982-5987
- Wenck A., Pugieux C., Turner M., Dunn M., Stacy C., Tiozzo A., Dunder E., Van Grinsven E., Khan R., Sigareva M., Wang W. C., Reed J., Drayton P., Oliver D., Trafford H., Legris G., Rushton H., Tayab S., Launis K., Chang Y. F., Chen D. F., Melchers L. (2003): Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Reports* 22: 244-251
- Wenk K. (2012): Sesquiterpene lactone-related allergic contact dermatitis after exposure to tulip poplar wood and bark. *Journal of the American Academy of Dermatology* 66: AB74
- Wesley S. V., Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27: 581-590
- Wong M. L., Medrano J. F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85
- Wroblewski T., Tomczak A., Michelmore R. (2005): Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 3: 259-273
- Yang C. Q., Wu X. M., Ruan J. X., Hu W. L., Mao Y. B., Chen X. Y., Wang L. J. (2013a): Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry* 96: 46-56
- Yang Y., Li R., Qi M. (2000): *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant Journal* 22: 543-551

- Yang Z., Patra B., Li R., Pattanaik S., Yuan L. (2013b): Promoter analysis reveals *cis*-regulatory motifs associated with the expression of the WRKY transcription factor CrWRKY1 in *Catharanthus roseus*. *Planta* 238: 1039-1049
- Zafar R., Mujahid Ali S. (1998): Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 63: 227-231
- Zhang L., Cheng L., Du J., Hao Y., Wang Y., Li G., Sun Y. (2011): Introduction of TaNHX2 gene enhanced salt tolerance of transgenic puna chicory plants. *Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica* 31: 5264-5272
- Zhou M. L., Zhu X. M., Shao J. R., Tang Y. X., Wu Y. M. (2011): Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1229-1239
- Zia M., Mirza B., Malik S. A., Chaudhary M. F. (2010): Expression of *rol* genes in transgenic soybean (*Glycine max* L.) leads to changes in plant phenotype, leaf morphology, and flowering time. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 227-236
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32

## 8. ПРИЛОЗИ

### 8.1 Интензитет флуоресценције DsRED-а у корену клонова трансформисаних *DsRED+*, *GFP+* и конструктима са промоторима

Флуоресценција (ф.) је бележена код различитих клонова примарних *HR* култура и култура корена регенераната добијених од њих. Посматране су културе кроз више пасажа (датум) и различите дужине гајења (старост у месецима). Тамније сивим су обележене културе које су узимане за одређивање средње вредности интензитета флуоресценције по клону.

конструкт	клон/регенерант	датум	старост (месеци)	интензитет ф.
<i>DsRED+</i>	11-1	март 2013.	1,0	1,0
<i>DsRED+</i>	11-1 1)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-1 1)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>DsRED+</i>	11-1 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-1 1)	април 2014.	1,5	0,8
<i>DsRED+</i>	11-1 1)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-1 1)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	јануар 2014.	3,5	0,4
<i>DsRED+</i>	11-1 3)	децембар 2013.	5,0	0,2
<i>DsRED+</i>	11-10	март 2013.	1,0	0,0
<i>DsRED+</i>	11-19	март 2013.	1,0	1,0
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	јануар 2014.	3,5	1,0
<i>DsRED+</i>	11-19 1)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>DsRED+</i>	11-19 2)	март 2013.	1,0	1,0
<i>DsRED+</i>	11-20	март 2013.	1,0	2,0
<i>DsRED+</i>	11-20	март 2013.	1,0	2,0

<i>DsRED+</i>	11-20 2)	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-20 2)	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-20 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-20 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-20 2)	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-20 2)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-21 4)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 4)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 4)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 4)	март 2013.	1,0	2,0
<i>DsRED+</i>	11-21 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	април 2014.	1,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-21 5)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	април 2014.	1,5	1,8
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-21 6)	јануар 2014.	3,5	2,8
<i>DsRED+</i>	11-3	март 2013.	1,0	1,0
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	април 2014.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 1)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	април 2014.	1,5	1,8
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>DsRED+</i>	11-3 2)	децембар 2013.	5,0	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 4)	август 2013.	1,5	2,0



<i>DsRED+</i>	11-3 4)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-3 4)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-3 4)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-3 4)	април 2014.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-3 4)	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>DsRED+</i>	11-3 4)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	март 2013.	1,0	2,0
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	април 2014.	1,5	1,8
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>DsRED+</i>	11-8	март 2013.	1,0	1,0
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	април 2014.	1,5	1,0
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>DsRED+</i>	12-12 1)	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>DsRED+</i>	12-13	март 2013.	1,0	0,0
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	април 2014.	1,5	1,2
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8	март 2013.	1,0	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	мај 2014.	0,5	1,8
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	април 2014.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 1)	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	август 2013.	1,5	3,0

<i>DsRED+</i>	12-8 2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	март 2013.	1,0	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	октобар 2013.	1,5	2,8
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	април 2014.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 2)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	март 2013.	1,0	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	април 2014.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 3)	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	август 2013.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	април 2014.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 4)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	април 2014.	1,5	2,0
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 5)	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	август 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	март 2013.	1,0	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	април 2014.	1,5	2,2
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	фебруар 2014.	2,5	2,8
<i>DsRED+</i>	12-8 6)	јануар 2014.	3,5	2,8
<i>GFP+</i>	26-101	август 2013.	2,0	0,0

<i>GFP+</i>	26-101	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-101 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-101 5)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-101 5)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-101 5)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-105	август 2013.	2,0	0,0
<i>GFP+</i>	26-105	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-105 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-105 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-105 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-105 1)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-108	август 2013.	2,0	0,0
<i>GFP+</i>	26-108	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-108 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-108 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	26-108 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-101	август 2013.	2,0	0,0
<i>GFP+</i>	3-101	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-101 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-101 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-101 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-101 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-103	август 2013.	2,0	0,0
<i>GFP+</i>	3-103	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-103 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-103 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-103 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105	август 2013.	2,0	0,0
<i>GFP+</i>	3-105	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105 7)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105 7)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105 9)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105 9)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105 9)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	3-105 9)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	5-128	август 2013.	2,0	0,0
<i>GFP+</i>	5-128	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	5-128 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>GFP+</i>	5-128 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>GFP+</i>	5-128 3)	март 2014.	2,5	0,0
<i>GFP+</i>	5-128 3)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	мај 2014.	0,5	1,2

<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	фeбpуap 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	јануap 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	децембар 2013.	5,0	1,8
<i>ProGasL</i>	31-1 1/2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 1/2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	октобар 2013.	1,5	2,8
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	мај 2014.	0,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	април 2014.	1,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	фeбpуap 2014.	2,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	јануap 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-1 2/1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 2/1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	април 2014.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	фeбpуap 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	јануap 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	фeбpуap 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-6	март 2013.	1,0	2,0
<i>ProGasL</i>	31-6	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-6	мај 2014.	0,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-6	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	31-6	фeбpуap 2014.	2,5	2,0
<i>ProGasL</i>	31-6	јануap 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	31-6	децембар 2013.	5,0	1,8
<i>ProGasL</i>	32-1	март 2013.	1,0	2,0
<i>ProGasL</i>	32-1	октобар 2013.	1,5	2,8
<i>ProGasL</i>	32-1	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProGasL</i>	32-1	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasL</i>	32-1	фeбpуap 2014.	2,5	2,2
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	април 2014.	1,5	2,0

<i>ProGasL</i>	32-1 1)	фeбpуap 2014.	2,5	2,2
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	януap 2014.	3,5	2,0
<i>ProGasL</i>	32-1 2)	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	32-1 2)	мapт 2013.	1,0	2,0
<i>ProGasL</i>	32-1 2)	октoбap 2013.	1,5	2,8
<i>ProGasL</i>	32-1 2)	октoбap 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	32-3	мapт 2013.	1,0	2,0
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	октoбap 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	aпpил 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	фeбpуap 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	януap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-10	мapт 2013.	1,0	1,0
<i>ProGasL</i>	35-10	октoбap 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-10	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-10	aпpил 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-10	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-10	януap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	октoбap 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	октoбap 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	aпpил 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	фeбpуap 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	януap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	октoбap 2013.	1,5	0,8
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	октoбap 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	aпpил 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	януap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	октoбap 2013.	1,5	0,4
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	aпpил 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	фeбpуap 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	януap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	октoбap 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	октoбap 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	aпpил 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	фeбpуap 2014.	2,5	0,0

<i>ProGasL</i>	35-17 3)	јануар 2014.	3,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	децембар 2013.	5,0	1,0
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	децембар 2013.	5,0	0,2
<i>ProGasL</i>	35-21	март 2013.	1,0	0,0
<i>ProGasL</i>	35-22	март 2013.	1,0	0,0
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	децембар 2013.	5,0	0,2
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	фебруар 2014.	2,5	0,8
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	јануар 2014.	3,5	0,8
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	децембар 2013.	5,0	1,8
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	мај 2014.	0,5	0,0

<i>ProGasL</i>	35-23 1)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	фебруар 2014.	2,5	0,4
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	јануар 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	децембар 2013.	5,0	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	јануар 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	фебруар 2014.	2,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	јануар 2014.	3,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	јануар 2014.	3,5	0,8
<i>ProGasL</i>	I 1	март 2013.	1,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 16	март 2013.	1,0	2,0
<i>ProGasL</i>	I 17	март 2013.	1,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-2	фебруар 2014.	2,5	0,0

<i>ProGasL</i>	I 17-2	децембар 2013.	5,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-3	децембар 2013.	5,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-5	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-5	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-5	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-5	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 17-5	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 19-1	децембар 2013.	5,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 2	март 2013.	1,0	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-1	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-1	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-1	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-1	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-1	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-1	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-1	мај 2014.	0,5	0,4
<i>ProGasL</i>	I 2-1	април 2014.	1,5	0,4
<i>ProGasL</i>	I 2-1	фебруар 2014.	2,5	1,6
<i>ProGasL</i>	I 2-1	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-1	децембар 2013.	5,0	0,4
<i>ProGasL</i>	I 2-2	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	I 2-2	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-2	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-2	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-2	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-2	октобар 2013.	1,5	0,6
<i>ProGasL</i>	I 2-2	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-2	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 2-2	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	I 2-2	фебруар 2014.	2,5	1,2



<i>ProGasL</i>	I 2-2	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-2	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-3	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	I 2-3	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasL</i>	I 2-3	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-3	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-3	мај 2014.	0,5	0,8
<i>ProGasL</i>	I 2-3	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-3	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-3	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-5	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-5	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-5	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-5	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-5	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>ProGasL</i>	I 2-5	мај 2014.	0,5	0,8
<i>ProGasL</i>	I 2-5	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-5	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasL</i>	I 2-5	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasL</i>	I 2-5	децембар 2013.	5,0	0,4
<i>ProGasL</i>	I 21	март 2013.	1,0	1,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	децембар 2013.	5,0	0,2
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	април 2014.	1,5	0,0

<i>ProGasL</i>	I 22-3	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-3	јануap 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 22-4	јануap 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 24-1	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 24-1	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 24-1	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 24-1	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 24-1	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 24-1	јануap 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	август 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	јануap 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 26-2	децембар 2013.	5,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 27	март 2013.	1,0	0,0
<i>ProGasL</i>	I 27-1	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProGasL</i>	I 27-1	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	I 27-1	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	I 27-1	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasL</i>	I 27-1	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasL</i>	I 27-1	фeбpуap 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasL</i>	I 27-1	децембар 2013.	5,0	0,2
<i>ProGasS29</i>	1/11-101	август 2013.	2,0	1,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-101	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	фeбpуap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	фeбpуap 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-103	август 2013.	2,0	1,4
<i>ProGasS29</i>	1/11-103	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasS29</i>	1/11-103	мај 2014.	0,5	0,0

<i>ProGasS29</i>	1/11-103	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS29</i>	1/11-106	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-106	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasS29</i>	1/11-106	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	1/11-106	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS29</i>	1/11-106	фебруар 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasS29</i>	4-101	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProGasS29</i>	4-101 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	4-101 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	4-108	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProGasS29</i>	4-108	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	април 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	март 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	март 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	18-101	август 2013.	2,0	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109	август 2013.	2,0	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 2)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 2)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 6)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	2-109 6)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	29-103	август 2013.	2,0	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-103 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 1)	април 2014.	1,5	0,2

<i>ProGasS83</i>	29-103 1)	фeбpуap 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	мaj 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	aпpил 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	мapт 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	фeбpуap 2014.	3,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-103 4)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	29-103 4)	мapт 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	мaj 2014.	0,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	aпpил 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	мapт 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	фeбpуap 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	мaj 2014.	0,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	aпpил 2014.	1,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	мapт 2014.	2,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	фeбpуap 2014.	3,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-104	aвгyст 2013.	2,0	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	мaj 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	aпpил 2014.	1,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	aпpил 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 2)	мaj 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 2)	aпpил 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	29-104 2)	мapт 2014.	2,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	29-104 2)	мapт 2014.	2,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	мaj 2014.	0,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	aпpил 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	мapт 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	фeбpуap 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 4)	мaj 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 4)	aпpил 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 4)	мapт 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	29-104 4)	фeбpуap 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-101	aвгyст 2013.	2,0	2,8
<i>ProGasS83</i>	39-103	aвгyст 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-103	oктoбap 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-103	oктoбap 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-103 2)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-103 2)	aпpил 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-103 2)	мapт 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-103 2)	мapт 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-104	aвгyст 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-105	aвгyст 2013.	2,0	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105	oктoбap 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 2)	мaj 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 2)	aпpил 2014.	1,5	0,0

<i>ProGasS83</i>	39-105 2)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 2)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 3)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-105 3)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-106	октобар 2013.	1,5	0,6
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 6)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 6)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-106 6)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-108	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-109	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-109	октобар 2013.	1,5	0,6
<i>ProGasS83</i>	39-109 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 3)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 5)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-109 5)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-110	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-110	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-110 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-110 3)	мај 2014.	0,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-110 3)	април 2014.	1,5	2,8
<i>ProGasS83</i>	39-110 3)	март 2014.	2,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-110 3)	март 2014.	2,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-110 4)	мај 2014.	0,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-110 4)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-110 4)	март 2014.	2,5	2,8
<i>ProGasS83</i>	39-110 4)	март 2014.	2,5	2,8
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	март 2014.	2,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	март 2014.	2,5	2,2

<i>ProGasS83</i>	39-110 6)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-110 6)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-110 6)	март 2014.	2,5	2,8
<i>ProGasS83</i>	39-110 6)	март 2014.	2,5	2,8
<i>ProGasS83</i>	39-111	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-111	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	април 2014.	1,5	1,4
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	март 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-112	август 2013.	2,0	1,4
<i>ProGasS83</i>	39-114	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-114	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-114 1)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-114 1)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	39-114 4)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-115	август 2013.	2,0	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-115 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-116	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-116	октобар 2013.	1,5	0,6
<i>ProGasS83</i>	39-116 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-116 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-117	август 2013.	2,0	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-117	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-120	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-120	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	март 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	фебруар 2014.	3,5	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-122	август 2013.	2,0	1,0

<i>ProGasS83</i>	39-122	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	април 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	април 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	март 2014.	2,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	март 2014.	2,5	1,6
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	април 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	март 2014.	2,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	март 2014.	2,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	39-128	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-128	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	мај 2014.	0,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	април 2014.	1,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	март 2014.	2,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	март 2014.	2,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-137	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-137	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 2)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	март 2014.	2,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-137 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 4)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 4)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-137 5)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-137 5)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-138	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-138	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 1)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-138 1)	фебруар 2014.	3,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	фебруар 2014.	3,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-140	август 2013.	2,0	3,0

<i>ProGasS83</i>	39-140	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-140 1)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProGasS83</i>	39-140 1)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 1)	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 3)	мај 2014.	0,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	39-140 3)	април 2014.	1,5	1,4
<i>ProGasS83</i>	39-140 3)	март 2014.	2,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 3)	фебруар 2014.	3,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 3)	фебруар 2014.	3,5	2,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 5)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 5)	април 2014.	1,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 5)	март 2014.	2,5	1,4
<i>ProGasS83</i>	39-140 5)	фебруар 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	април 2014.	1,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	март 2014.	2,5	1,0
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	фебруар 2014.	3,5	1,2
<i>ProGasS83</i>	39-141	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-141	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-141 4)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-141 4)	април 2014.	1,5	0,8
<i>ProGasS83</i>	39-141 4)	април 2014.	1,5	0,4
<i>ProGasS83</i>	39-141 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-141 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-143	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-143	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProGasS83</i>	39-143 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-143 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-143 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-143 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	април 2014.	1,5	0,2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	април 2014.	1,5	1,8
<i>ProGasS83</i>	39-143 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProGasS83</i>	39-143 5)	фебруар 2014.	3,5	0,2
<i>ProP450</i>	14-3	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-3	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-3	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-3	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-3	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProP450</i>	14-3	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProP450</i>	14-3	фебруар 2014.	2,5	2,8



<i>ProP450</i>	14-3	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>ProP450</i>	14-3	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>ProP450</i>	14-4	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-4	август 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-4	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-4	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-4	мај 2014.	0,5	2,0
<i>ProP450</i>	14-4	април 2014.	1,5	2,2
<i>ProP450</i>	14-4	фебруар 2014.	2,5	2,8
<i>ProP450</i>	14-4	јануар 2014.	3,5	3,0
<i>ProP450</i>	14-5 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProP450</i>	14-5 3)	август 2013.	1,5	2,0
<i>ProP450</i>	14-5 3)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProP450</i>	14-5 3)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>ProP450</i>	14-5 3)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>ProP450</i>	14-5 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	14-5 3)	фебруар 2014.	2,5	0,8
<i>ProP450</i>	14-5 3)	јануар 2014.	3,5	0,8
<i>ProP450</i>	14-5 3)	децембар 2013.	5,0	0,8
<i>ProP450</i>	18-1	март 2013.	1,0	1,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	август 2013.	1,5	1,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>ProP450</i>	18-1 2)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	април 2014.	1,5	1,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>ProP450</i>	18-1 2)	јануар 2014.	3,5	1,0
<i>ProP450</i>	18-1 2)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>ProP450</i>	35-101	август 2013.	2,0	2,0
<i>ProP450</i>	35-102	август 2013.	2,0	3,0
<i>ProP450</i>	35-102	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	35-102 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProP450</i>	35-102 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	35-102 2)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102	август 2013.	2,0	1,0
<i>ProP450</i>	42-102	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>ProP450</i>	42-102 1)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 1)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 1)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 2)	март 2014.	2,5	0,0

<i>ProP450</i>	42-102 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 4)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 4)	март 2014.	2,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 5)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 5)	април 2014.	1,5	0,0
<i>ProP450</i>	42-102 5)	март 2014.	2,5	0,0

---

## 8.2 RT-PCR GFP гена код регенераната клонова трансформисаних GFP+ и конструктима са промоторима

Као негативне контроле употребљене су нетрансформисане биљке (*wt*) и биљке трансформисане *DsRED+* конструктом. Експресија је тестирана код биљака у генеративној (гф) или вегетативној (вф) фази развића, различите старости и у различитим биљним органима. Резултат анализе експресије гена (присуство траке на гелу после *RT-PCR*-а) приказан је са "+" (присутна трака) и "-" (нема траке).

конструкт	клон/регенерант	стадијум	орган	трака	старост (месеци)
<i>GFP+</i>	26-101 5)	гф	корен	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 5)	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 5)	гф	цвет	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 7)	гф	корен	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 7)	гф	лист	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 7)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-101 7)	гф	стабло	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 1)	гф	корен	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 1)	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 3)	гф	корен	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 3)	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 3)	гф	стабло	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 4)	гф	корен	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 4)	гф	лист	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 4)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 4)	гф	стабло	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 5)	гф	корен	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 5)	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 5)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-105 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-108 1)	гф	корен	-	2,5
<i>GFP+</i>	26-108 1)	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-108 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	26-108 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>GFP+</i>	3-101	гф	корен	-	2,5
<i>GFP+</i>	3-101	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	3-101	гф	цвет	+	2,5

<i>GFP+</i>	3-101	гф	стабло	-	2,5
<i>GFP+</i>	5-128 3)	гф	корен	+	2,5
<i>GFP+</i>	5-128 3)	гф	лист	+	2,5
<i>GFP+</i>	5-128 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>GFP+</i>	5-128 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	гф	корен	-	4
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	гф	лист	-	4
<i>DsRED+</i>	11-6 1)	гф	стабло	-	4
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	гф	корен	-	2,5
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	гф	лист	-	2,5
<i>DsRED+</i>	12-14 1)	гф	стабло	-	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	вф	корен	+	3
<i>ProGasL</i>	31-1 1)/2)	вф	лист	+	3
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 2)/1)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-1 5)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-6	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-6	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-6	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	31-6	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	32-1 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	32-3 3)	гф	стабло	+	4
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	гф	корен	+	2,5

<i>ProGasL</i>	35-10 4)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-10 4)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	гф	лист	+	2
<i>ProGasL</i>	35-17 4)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	корен	-	3,5
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	лист	-	3,5
<i>ProGasL</i>	35-21 1)	гф	стабло	-	3,5
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	вф	корен	+	4
<i>ProGasL</i>	35-22 1)	вф	лист	+	4
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	корен	+	4
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	лист	+	4
<i>ProGasL</i>	35-22 2)	гф	стабло	+	4

<i>ProGasL</i>	35-22 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	вф	корен	+	3,5
<i>ProGasL</i>	35-22 3)	вф	лист	+	3,5
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 1)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	корен	+	2
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	лист	+	2
<i>ProGasL</i>	35-23 3)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	гф	корен	+	3,5
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	гф	лист	+	3,5
<i>ProGasL</i>	35-23 4)	гф	стабло	+	3,5
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	35-23 5)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 17-2	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 17-2	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 17-2	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 17-2	гф	корен	-	6,5
<i>ProGasL</i>	I 17-2	гф	лист	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 17-2	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 17-5	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 17-5	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-1	гф	корен	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 2-1	гф	лист	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 2-1	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 2-2	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-2	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-2	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-2	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-2	гф	корен	+	3

<i>ProGasL</i>	I 2-2	гф	лист	+	3
<i>ProGasL</i>	I 2-3	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-3	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-3	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 2-5	гф	корен	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 2-5	гф	лист	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 2-5	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2	гф	корен	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2	гф	лист	-	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2a	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	корен	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	лист	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-2b	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	корен	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	лист	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-3	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	гф	корен	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	гф	лист	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 22-4	гф	стабло	+	6,5
<i>ProGasL</i>	I 24-1	гф	корен	-	5
<i>ProGasL</i>	I 24-1	гф	лист	+	5
<i>ProGasL</i>	I 24-1	гф	стабло	+	5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	корен	+	5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	лист	+	5
<i>ProGasL</i>	I 26-2	гф	стабло	-	5
<i>ProGasL</i>	I 27-1	вф	корен	+	2,5

<i>ProGasL</i>	I 27-1	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 6)	гф	стабло	-	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	1/11-101 7)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-101 1)	гф	корен	-	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-101 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-101 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-101 1)	гф	стабло	-	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS29</i>	4-108 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	гф	корен	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	гф	лист	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 6)	гф	стабло	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	гф	цвет	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	18-101 7)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 2)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 2)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 2)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 4)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 6)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 6)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	2-109 6)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 1)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 1)	вф	лист	+	2,5



<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	гф	лист	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 4)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 4)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 4)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 4)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-103 6)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	гф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	29-104 1)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 3)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 4)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 4)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 5)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 5)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 6)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 6)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	29-104 6)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39- 137 4)	гф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	39- 137 4)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39- 137 4)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	39- 137 4)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-105 2)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-105 2)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-106 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-109 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-109 3)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-109 5)	вф	корен	-	2
<i>ProGasS83</i>	39-109 5)	вф	лист	-	2
<i>ProGasS83</i>	39-110 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 3)	вф	лист	+	2,5

<i>ProGasS83</i>	39-110 4)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 4)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 6)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-110 6)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 4)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 4)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-111 4)	вф	стабло	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-115 1)	гф	стабло	-	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-117 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-120 1)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	гф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-120 3)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	гф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-122 3)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-122 4)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-122 6)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-128 1)	вф	стабло	+	2,5

<i>ProGasS83</i>	39-137 2)	вф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-137 2)	вф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-137 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-137 5)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-137 5)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-137 5)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-138 1)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	гф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-138 2)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-138 3)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-140 5)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-140 5)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	вф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	вф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-140 6)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-141 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-141 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-141 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-141 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-141 4)	вф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-141 4)	вф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-141 4)	вф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	корен	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	лист	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	цвет	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 3)	гф	стабло	+	2
<i>ProGasS83</i>	39-143 5)	гф	корен	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 5)	гф	лист	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 5)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProGasS83</i>	39-143 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-3	вф	корен	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-3	вф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-5 3)	гф	корен	+	2,5

<i>ProP450</i>	14-5 3)	гф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-5 3)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-5 3)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-5 3)	вф	корен	+	2,5
<i>ProP450</i>	14-5 3)	вф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	корен	+	2,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	корен	+	5,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	лист	+	5,5
<i>ProP450</i>	18-1 2)	гф	стабло	+	5,5
<i>ProP450</i>	42-102 1)	гф	корен	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 1)	гф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 1)	гф	цвет	-	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 1)	гф	стабло	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 2)	вф	корен	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 2)	вф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 2)	вф	стабло	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 4)	гф	корен	-	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 4)	гф	лист	-	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 4)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 4)	гф	стабло	-	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 5)	гф	корен	-	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 5)	гф	лист	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 5)	гф	цвет	+	2,5
<i>ProP450</i>	42-102 5)	гф	стабло	+	2,5
<i>wt</i>	МБ18	гф	корен	-	4
<i>wt</i>	МБ18	гф	лист	-	4
<i>wt</i>	МБ18	гф	стабло	-	4
<i>wt</i>	МБ35	гф	корен	-	4
<i>wt</i>	МБ35	гф	лист	-	4
<i>wt</i>	МБ35	гф	стабло	-	4

### 8.3 Интензитет флуоресценције DsRED-а у корену клонова трансформисаних конструктима за утишавање гена

Флуоресценција (ф.) је бележена код различитих клонова примарних *HR* култура и култура корена регенераната добијених од њих. Посматране су културе кроз више пасажа (датум) и различите дужине гајења (старост у месецима). Тамније сивим су обележене културе које су узимане за одређивање средње вредности интензитета флуоресценције по клону.

конструкт	клон/регенерант	датум	старост (месеци)	интензитет ф.
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-1	март 2013.	1,0	0,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-1 1)	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-1 2)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-1 2)	април 2014.	1,5	2,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-1 2)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-2	март 2013.	1,0	1,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-2 4)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-2 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-2 4)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-2 4)	април 2014.	1,5	2,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-2 4)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3 1)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3 1)	април 2014.	1,5	0,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3 1)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>AmiL&amp;Sm</i>	39-3 1)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-5	март 2013.	1,0	1,2
<i>AmiLl</i>	1-5 1)	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	1-5 1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiLl</i>	1-5 1)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-5 1)	април 2014.	1,5	1,8
<i>AmiLl</i>	1-5 1)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiLl</i>	1-5 1)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-5 6)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiLl</i>	1-5 6)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiLl</i>	1-5 6)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-5 6)	април 2014.	1,5	2,2
<i>AmiLl</i>	1-5 6)	фебруар 2014.	2,5	3,0
<i>AmiLl</i>	1-5 6)	јануар 2014.	3,5	2,2

<i>AmiLl</i>	1-5 8)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiLl</i>	1-5 8)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-5 8)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-5 8)	април 2014.	1,5	2,2
<i>AmiLl</i>	1-5 8)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiLl</i>	1-5 8)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>AmiLl</i>	1-5 8)	децембар 2013.	5,0	2,8
<i>AmiLl</i>	1-7	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-7 1)	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>AmiLl</i>	1-7 3)	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiLl</i>	1-7 3)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 4)	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiLl</i>	1-7 4)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>AmiLl</i>	1-7 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiLl</i>	1-7 4)	април 2014.	1,5	0,8
<i>AmiLl</i>	1-7 4)	фебруар 2014.	2,5	1,0
<i>AmiLl</i>	1-7 4)	јануар 2014.	3,5	0,2
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	октобар 2013.	3,0	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	април 2014.	1,5	0,8
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	фебруар 2014.	2,5	0,8
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiLl</i>	1-7 5)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>AmiLl</i>	2-1	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiLl</i>	2-1 2)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiLl</i>	2-1 2)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	октобар 2013.	3,0	2,2
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>AmiLl</i>	2-1 3)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>AmiLl</i>	2-10	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiLl</i>	2-10 3)	октобар 2013.	3,0	1,0
<i>AmiLl</i>	2-10 3)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	2-10 3)	мај 2014.	0,5	0,0

<i>AmiLl</i>	2-10 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>AmiLl</i>	2-10 3)	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>AmiLl</i>	2-10 3)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>AmiLl</i>	2-9	март 2013.	1,0	0,0
<i>AmiLl</i>	3-2 1)	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	октобар 2013.	3,0	1,8
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	април 2014.	1,5	0,8
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	фебруар 2014.	2,5	1,0
<i>AmiLl</i>	3-2 2)	јануар 2014.	3,5	1,0
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	април 2014.	1,5	0,0
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>AmiLl</i>	3-2 4)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>AmiLl</i>	3-4	март 2013.	1,0	3,0
<i>AmiLl</i>	3-8	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	4-13	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	4-13 2)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiLl</i>	4-13 2)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-13 2)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiLl</i>	4-13 2)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-13 2)	децембар 2013.	5,0	1,0
<i>AmiLl</i>	4-13 3)	октобар 2013.	3,0	1,2
<i>AmiLl</i>	4-13 3)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	октобар 2013.	3,0	1,2
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	април 2014.	1,5	0,2
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	фебруар 2014.	2,5	0,8
<i>AmiLl</i>	4-13 4)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-7	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiLl</i>	4-7 1)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-7 1)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiLl</i>	4-7 1)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	4-7 1)	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>AmiLl</i>	4-7 1)	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>AmiLl</i>	5-1	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	5-1 2)	октобар 2013.	3,0	1,0

<i>AmiLl</i>	5-1 2)	октобар 2013.	1,5	0,8
<i>AmiLl</i>	5-1 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiLl</i>	5-1 2)	април 2014.	1,5	0,2
<i>AmiLl</i>	5-1 2)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>AmiLl</i>	5-1 2)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiLl</i>	5-11 1)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-11 1)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>AmiLl</i>	5-11 1)	април 2014.	1,5	2,2
<i>AmiLl</i>	5-11 1)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-11 1)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-15	март 2013.	1,0	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	мај 2014.	0,5	2,2
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	април 2014.	1,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-15 1)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-15 2)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 2)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 4)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiLl</i>	5-15 4)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-15 4)	април 2014.	1,5	2,2
<i>AmiLl</i>	5-15 4)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiLl</i>	5-15 4)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>AmiLl</i>	5-7	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	октобар 2013.	3,0	1,2
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiLl</i>	5-7 1)	децембар 2013.	5,0	1,0
<i>AmiLl</i>	5-7 3)	октобар 2013.	3,0	1,2
<i>AmiLl</i>	5-7 3)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>AmiLl</i>	5-7 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiLl</i>	5-7 3)	април 2014.	1,5	0,2
<i>AmiLl</i>	5-7 3)	фебруар 2014.	2,5	1,0
<i>AmiLl</i>	5-7 3)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiLl</i>	5-7 4)	март 2013.	1,0	0,0
<i>AmiLl</i>	5-7 4)	октобар 2013.	3,0	1,8
<i>AmiLl</i>	5-7 4)	октобар 2013.	1,5	1,0
<i>AmiLl</i>	5-7 4)	мај 2014.	0,5	0,2



<i>AmiL1</i>	5-7 4)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiL1</i>	6-10	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiS1</i>	26-10	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiS1</i>	26-10	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiS1</i>	26-10 1)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>AmiS1</i>	26-10 4)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiS1</i>	26-10 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-10 4)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-10 4)	април 2014.	1,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-10 4)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-10 4)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-12	март 2013.	1,0	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 1)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 1)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 1)	мај 2014.	0,5	2,2
<i>AmiS1</i>	26-13 1)	април 2014.	1,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 1)	фебруар 2014.	2,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 1)	јануар 2014.	3,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	мај 2014.	0,5	2,8
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	април 2014.	1,5	2,8
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	фебруар 2014.	2,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	јануар 2014.	3,5	3,0
<i>AmiS1</i>	26-13 4)	децембар 2013.	5,0	3,0
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	октобар 2013.	3,0	1,8
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	октобар 2013.	1,5	1,2
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	април 2014.	1,5	1,0
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	фебруар 2014.	2,5	1,0
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	јануар 2014.	3,5	1,0
<i>AmiS1</i>	26-14 1)	децембар 2013.	5,0	1,2
<i>AmiS1</i>	26-14 2)	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiS1</i>	26-14 2)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-14 2)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiS1</i>	26-14 2)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiS1</i>	26-14 2)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-14 2)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-2 1)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiS1</i>	26-2 1)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-2 1)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-2 1)	април 2014.	1,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-2 1)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiS1</i>	26-2 1)	јануар 2014.	3,5	2,0

<i>AmiSI</i>	26-3	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiSI</i>	26-3 2)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>AmiSI</i>	26-3 2)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiSI</i>	26-3 2)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	26-3 2)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>AmiSI</i>	26-3 2)	јануар 2014.	3,5	1,2
<i>AmiSI</i>	26-3 2)	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>AmiSI</i>	26-9	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiSI</i>	27-11 2)	октобар 2013.	1,5	0,2
<i>AmiSI</i>	27-11 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 2)	април 2014.	1,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 2)	фебруар 2014.	2,5	0,2
<i>AmiSI</i>	27-11 2)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 3)	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 3)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 3)	фебруар 2014.	2,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-11 3)	јануар 2014.	3,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-12	март 2013.	1,0	3,0
<i>AmiSI</i>	27-17	март 2013.	1,0	0,0
<i>AmiSI</i>	27-18	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiSI</i>	27-18 4)	октобар 2013.	3,0	1,2
<i>AmiSI</i>	27-18 4)	октобар 2013.	1,5	0,4
<i>AmiSI</i>	27-18 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-18 4)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	27-18 4)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiSI</i>	27-18 4)	јануар 2014.	3,5	2,0
<i>AmiSI</i>	27-5 2)	октобар 2013.	1,5	2,2
<i>AmiSI</i>	27-5 2)	мај 2014.	0,5	1,2
<i>AmiSI</i>	27-5 2)	април 2014.	1,5	2,0
<i>AmiSI</i>	27-5 2)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiSI</i>	27-5 2)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>AmiSI</i>	27-5 2)	децембар 2013.	5,0	2,2
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	октобар 2013.	1,5	1,4
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	октобар 2013.	3,0	3,0
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	октобар 2013.	1,5	3,0
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	април 2014.	1,5	1,8
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	фебруар 2014.	2,5	2,2
<i>AmiSI</i>	27-5 5)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>AmiSI</i>	27-9	март 2013.	1,0	3,0
<i>AmiSI</i>	27-9 3)	октобар 2013.	3,0	1,0
<i>AmiSI</i>	27-9 3)	октобар 2013.	1,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 3)	мај 2014.	0,5	0,0

<i>AmiSI</i>	27-9 3)	април 2014.	1,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 3)	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 3)	јануap 2014.	3,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 4)	октoбap 2013.	3,0	1,8
<i>AmiSI</i>	27-9 4)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	27-9 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 4)	април 2014.	1,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 4)	фeбpуap 2014.	2,5	0,0
<i>AmiSI</i>	27-9 4)	јануap 2014.	3,5	0,2
<i>AmiSI</i>	27-9 5)	октoбap 2013.	3,0	3,0
<i>AmiSI</i>	27-9 5)	октoбap 2013.	1,5	3,0
<i>AmiSI</i>	28-1	мapт 2013.	1,0	0,4
<i>AmiSI</i>	29-10	мapт 2013.	1,0	1,4
<i>AmiSI</i>	29-3	мapт 2013.	1,0	1,0
<i>AmiSI</i>	29-3 1)	октoбap 2013.	1,5	1,0
<i>AmiSI</i>	29-3 1)	мај 2014.	0,5	0,2
<i>AmiSI</i>	29-3 1)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-3 2)	октoбap 2013.	3,0	2,0
<i>AmiSI</i>	29-3 2)	октoбap 2013.	1,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-3 2)	мај 2014.	0,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-3 2)	април 2014.	1,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-3 2)	фeбpуap 2014.	2,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-3 2)	јануap 2014.	3,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-5	мapт 2013.	1,0	1,0
<i>AmiSI</i>	29-5 1)	октoбap 2013.	3,0	2,0
<i>AmiSI</i>	29-5 1)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-5 1)	мај 2014.	0,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-5 1)	април 2014.	1,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-5 1)	фeбpуap 2014.	2,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-5 1)	јануap 2014.	3,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-5 2)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiSI</i>	29-5 2)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-5 2)	фeбpуap 2014.	2,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-5 2)	јануap 2014.	3,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-7	мapт 2013.	1,0	1,0
<i>AmiSI</i>	29-7 1)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-7 2)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-7 2)	мај 2014.	0,5	0,8
<i>AmiSI</i>	29-7 2)	април 2014.	1,5	0,8
<i>AmiSI</i>	29-7 2)	фeбpуap 2014.	2,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-7 2)	јануap 2014.	3,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-7 2)	дeцeмбap 2013.	5,0	2,0
<i>AmiSI</i>	29-7 3)	октoбap 2013.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-7 4)	октoбap 2013.	1,5	1,8

<i>AmiSI</i>	29-7 4)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiSI</i>	29-7 4)	април 2014.	1,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-7 4)	фебруар 2014.	2,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-7 4)	јануар 2014.	3,5	2,2
<i>AmiSI</i>	29-8	март 2013.	1,0	2,0
<i>AmiSI</i>	29-9	март 2013.	1,0	1,0
<i>AmiSI</i>	29-9 2)	октобар 2013.	3,0	2,0
<i>AmiSI</i>	29-9 2)	октобар 2013.	1,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-9 2)	мај 2014.	0,5	0,0
<i>AmiSI</i>	29-9 2)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-9 2)	фебруар 2014.	2,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-9 2)	јануар 2014.	3,5	1,8
<i>AmiSI</i>	29-9 4)	октобар 2013.	1,5	2,0
<i>AmiSI</i>	29-9 4)	мај 2014.	0,5	1,0
<i>AmiSI</i>	29-9 4)	април 2014.	1,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-9 4)	фебруар 2014.	2,5	1,2
<i>AmiSI</i>	29-9 4)	јануар 2014.	3,5	2,0

## Листа скраћеница са речником

- amiRNA* - /енг. *artificial micro RNA*/ - вештачки направљена микро РНК.
- ANOVA* - анализа варијансе, статистичка метода за поређење више група података.
- ATG* - старт кодон који означава место почетка транскрипције гена.
- att*- места - ДНК секвенце у оквиру *Gateway* вектора за рекомбинацију.
- AU* - /енг. *arbitrary units*/ - арбитрарне јединице, јединице притиска гаса у *UHPLC* систему.
- BAC* - /енг. *bacterial artificial chromosome*/ - вештачки бактеријски хромозом, ДНК конструкт базиран на *F*-плазмиду бактерија /енг. *functional fertility plasmid*/ који се користи за секвенцирање генома организама.
- BAP* - бензиламинопурин, биљни хормон.
- BP* - /енг. *band pass*/ - филтер који пропушта таласне дужине у дефинисаном опсегу.
- bp* - /енг. *base pairs*/ - базних парова.
- ccdB* ген - леталан ген који интерагује са ДНК жиразом бактерија и спречава њихов раст.
- cDNA* - комплементарна ДНК, ДНК синтетисана са РНК матрице помоћу ензима реверзне транскриптазе.
- CDS* - /енг. *coding sequence*/ - кодирајућа секвенца гена.
- CE* - /енг. *collision energy*/ - колизиона енергија.
- COS* - костунолид синтаза, ензим који каталише биосинтезу костунолида.
- CTAB* - хексадецил-триметил-амонијум-бромид (цетилтриметиламонијум-бромид), сурфактант који се користи у екстракцији нуклеинских киселина.
- DEPC* - диетилпирокарбонат, иреверзибилни инхибитор рибонуклеаза.
- DMAPP* - диметилалил дифосфат.
- dNTP* - дезоксирибонуклеотид фосфат.
- DsRED - црвени флуоресцентни протеин - репортер.
- dsRNA* - дволанчана РНК.
- EDTA* - етилендиаминтетрацетат, хелирајући агенс.
- eGFP - /енг. *enhanced GFP*/ - побољшани зелени флуоресцентни протеин.
- EST* - /енг. *expression sequence tag*/ - кратке секвенце - подскупови *cDNA* секвенци

*Fisher LSD posthoc* - Fisher-ов тест најмање значајних разлика, статистичка метода за поређење више група података након анализе варијансе.

*FPP* - фарнезил дифосфат.

*FS* - /енг. *full scan*/ - врста експерименталног мода на масеном спектрометру.

*GAO* - гермакрен А оксидаза, ензим који каталише конверзију гермакрена А.

*GAS* - гермакрен А синтаза, ензим који каталише синтезу (+)- гермакрена А од *FPP*.

*GAS long, CiGASlo* - дужа форма гермакрен А синтазе цикорије

*GAS short, CiGASsh* - краћа форма гермакрен А синтазе цикорије

*GFP* - /енг. *green fluorescent protein*/ - зелени флуоресцентни протеин који се користи као репортер.

*GGPP* - геранилгеранил дифосфат.

*GPP* - геранил дифосфат.

*GUS* - β-глукуронидаза, ензим који се користи у бојеној реакцији као репортер.

*HESI* - /енг. *heated electrospray ionization*/ - грејана електроспреј јонизација.

*hpRNA* - /енг. *hairpin RNA*/ - РНК молекула облика укоснице.

*HR* - /енг. *hairy-root*/ - трансформисани коренови специфичног фенотипа ("длакасти коренови") добијени трансформацијом са *A. rhizogenes*.

*IAA* - индол-3-сирћетна киселина, биљни хормон.

*IBA* - индол-3-бутерна киселина, биљни хормон.

*IHF* протеин - /енг. *integration host factor*/ - протеин *E.coli*, компонента *BP Gateway* микса

*IPP* - изопентенил дифосфат.

*KIN* - кинетин, биљни хормон.

*LB* - /енг. *left border*/ - секвенца која ограничава Т-ДНК са леве стране плаزمиде.

*LB* подлога - /енг. *liquid broth*/ - хранљива подлога за гајење бактерија.

*LED* - /енг. *light-emitting diode*/ - диода која емитује светлост.

*LP* - /енг. *long pass*/ - филтер који пропушта таласне дужине веће од одређене вредности.

*MCS* - /енг. *multiple cloning site*/ - регион на вектору са више рестрикционих места.

*MEP* - 2-С-метил-*D*-еритритол-4-фосфат.

*miRNA* - /енг. *micro RNA*/ - микро РНК.

*MRM* - /енг. *multiple reaction monitoring*/ - врста експерименталног мода на масеном спектрометру.

*mRNA* - /енг. *messenger RNA*/ - информациона РНК

*MS* - /енг. *mass spectrometry*/ - масена спектрометрија.

*MS* медијум - /енг. *Murashige and Skoog*/ - базални медијум за гајење биљака *in vitro*.

*MVA* - мевалонска киселина.

*NAA* – нафтил сирћетна киселина, биљни хормон.

*NADPH* - редуковани облик никотинамид аденин динуклеотид фосфата, коензима који учествује у редокс реакцијама.

*nos* - ген за нопалин синтазу.

*PCR* - /енг. *polymerase chain reaction*/ - полимеразна ланчана реакција.

*PEG* - полиетилен гликол.

*phasiRNA* - /енг. *phase secondary siRNA*/ - фазне секундарне *siRNA*.

*PIS* - /енг. *parent ion scan*/ - врста експерименталног мода на масеном спектрометру.

*pre-miRNA* - примарни транскрипт микро РНК гена.

*PrIS* - /енг. *product ion scan*/ - врста експерименталног мода на масеном спектрометру.

*PTGS* - /енг. *posttranscriptional gene silencing*/ - утишавање гена на посттранскрипционом нивоу.

*qPCR* - /енг. *quantitative PCR*/ - квантитативни *PCR*, метода за мерење нивоа експресије гена.

*RB* - /енг. *right border*/ - секвенца која ограничава Т-ДНК са десне стране плаزمиде.

*RDR* полимеразе - /енг. *RNA dependent RNA polymerase*/ - полимеразе која синтетише РНК молекула на основу РНК матрице

*Ri* - /енг. *root-inducing*/ - плазмидна ДНК присутна у сојевима *A. rhizogenes*, на којој се налазе гени одговорни за формирање *HR* фенотипа.

*RISC* комплекс - /енг. *RNA-induced silencing complex*/ - протеински комплекс који учествује у утишавању гена

*RNAi* - /енг. *RNA interference*/ - РНК интерференца, тип утишавања гена.

*Rol* гени - /енг. *root locus*/ - гени одговорни за формирање *HR* фенотипа.

*ROS* - /енг. *reactive oxigene species*/ - слободне радикалске врсте.

*rRNA* - рибозомална РНК

*RT* - ретенционо време, време силаска једињења са колоне приликом течне хроматографије.

*RT-PCR* - полимеразна ланчана реакција у којој се као матрица користи *cDNA* синтетисана реверзном транскрипцијом.

*siRNA* - /енг. *small interfering RNA*/ - мале интерферирајуће РНК.

*SOC* подлога - /енг. *super optimal broth*/ - високо хранљива подлога за гајење бактерија.

*tasiRNA* - /енг. *trans-acting siRNA*/ - секундарне транс-делујуће *siRNA*

*TGS* - /енг. *transcriptional gene silencing*/ - утишавање гена на транскрипцијом нивоу.

*Ti* - /енг. *tumor inducing*/ - плазмидна ДНК присутна у сојевима *A. tumefaciens*, на којој се налазе гени одговорни за формирање калусних тумора.

*Tris* - 2-амино-2-хидроксиметил-пропан-1,3-диол, пуфер са *pKa* 8,07.

*UHPLC* - /енг. *ultra high performance liquid chromatography*/ - течна хроматографија високих перформанси.

*Uida* ген - ген који кодира за  $\beta$ -глукуронидазу.

*UV* - ултраљубичасти део спектра светлости.

*vir* гени - /енг. *virulence genes*/ - бактеријски гени који кодирају факторе вируленције.

*wt* - /енг. *wild-type*/ - нетрансформисана биљка, биљка дивљег типа.

*YEB* подлога - /енг. *yeast extract broth*/ - хранљива подлога за гајење бактерија.

вф - вегетативна фаза развића.

гф - генеративна фаза развића, фаза цветања.

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина.

МБ - мајка биљка, нетрансформисана биљка од које су потекли трансформисани клонови.

РНК - рибонуклеинска киселина.

СЛ - сесквитерпенски лактони.



Студентов *t*-тест - статистичка метода за поређење две групе података.

T-ДНК - /енг. *transfer DNA*/ - трансферована ДНК, део секвенце *Ri* или *Ti* плазида бактерија који се уграђује у геном домаћина.

ТС - терпен синтаза.

## Биографија аутора

Милица Д. Богдановић рођена је 4. марта 1984. године у Београду. Основну школу и гимназију је завршила у Београду. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2003/2004. године на студијској групи Биологија. Дипломирала је 2008. године са просечном оценом 9,79 и стекла звање дипломирани биолог. Докторске студије уписала је школске 2007/2008. године на студијском програму Експериментална и примењена ботаника (модул Физиологија и молекуларна биологија биљака) Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Од марта 2008. до децембра 2010. године била је докторант стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије. Од 1. јануара 2011. године запослена је у Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић", на Одељењу за физиологију биљака као истраживач приправник, а 26. марта 2012. године стекла је звање истраживач сарадник. У периоду од марта 2008. до краја 2010. године ангажована је на научно-истраживачком пројекту "Светлосна и хормонална контрола растења и развића, *in vitro* размножавање и *ex situ* заштита ретких и угрожених биљних врста", финансираном од стране Министарства за науку Републике Србије, под бројем 143031Б. Од 2010. године ангажована је на међународном истраживачком ФП7 пројекту "*Terpmed*", под бројем 227448, а од јануара 2011. године на пројекту "Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења", финансираном од стране Министарства просвете и науке Републике Србије, под бројем 173024.

У периоду од марта до јуна 2011. године и од априла до јула 2012. године, Милица Богдановић је била на научном усавршавању у Лабораторији за физиологију биљака Универзитета у *Wageningen*-у, Холандији.

Милица Богдановић је члан Друштва за физиологију биљака Србије и међународне организације *FESPB (Federation of European Societies of Plant Biology)*.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Богдановић

број индекса EA070102

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**“Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена”**

- 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, 1. 12. 2014.

Милица Богдановић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Богдановић

Број индекса EA070102

Студијски програм Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада **“Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена”**

Ментор др Ана Симоновић и др Ангелина Суботић

Потписани/а Милица Богдановић

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, 1.12.2014.

Милица Богдановић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**“Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.) - утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и -оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена”**

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, 1.12. 2014.

Милица Богдановић

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.