

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**BIOLOŠKI FAKULTET**

**Zoran D. Jeknić**

**Promena boje cveta perunike  
(*Iris germanica* L.) genetičkom  
modifikacijom biosinteze karotenoida**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF BIOLOGY**

**Zoran D. Jeknić**

**Alteration of flower color of  
*Iris germanica* L. through genetic  
modification of carotenoid biosynthetic  
pathway**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2013**

---

Prof. dr Svetlana Radović, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentor

---

dr Ana Simonović, naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu

---

dr Angelina Subotić, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković, Univerziteta u Beogradu

---

Prof. dr Zlatko Giba, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Doktorska disertacija je urađena kao rezultat istraživanja i saradnje na projektima „Red iris“ (AFR3711, finansiranog od strane Cooley's Gardens Inc., Silverton, Oregon, SAD; rukovodilac Dr. Tony H.H. Chen) i „Razvoj i primena biotehnoloških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka“ (TR31019; finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije rukovodilac Dr. Angelina Subotić).*

*U disertaciji je upotrebljen soj Agrobacterium tumefaciens LBA4404 koji nosi pTOK233 binarni vektor čije korišćenje je odobreno od strane Japan Tobacco, Inc., Shizuoka 438, Japan.*

*Želeo bih da se zahvalim Dr. Francis J. Cunningham (Univerzitet u Merilendu, MD) za plasmid pAC-LYC, Dr. Peter H. Quail (USDA/ARS Plant Gene Expression Cente, Albany, CA) za plazmid pAHC25, kao i Dr. Ming-Bo Wang (CSIRO Plant Industry, Black Mountain, Australia) za pWBVec10a binarni vektor.*

*Veliku zahvalnost, pre svih, dugujem Dr. Tony H.H. Chen, (Department for Horticulture, Corvallis, Oregon State University, SAD), poštovanom kolegi i velikom učitelju na konstantnoj podršci, strpljenju, neprocenjivim savetima i razumevanju tokom zajedničkog višegodišnjeg rada kao i tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se Dr. Mariji Ivanchenko na velikoj pomoći prilikom pisanja doktorske disertacije.*

*Iskrenu zahvalnost upućujem svim članovima komisije koji su svojim sugestijama pomogli finalnom uobličavanju ove doktorske disertacije.*

*Dr. Slađani Jevremović dugujem veliku zahvalnost za stručnu i uvek prisutnu podršku i pomoć koju mi je davala godinama unazad u dobrim i lošim trenucima, a posebno prilikom eksperimentalnog rada i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici, majci Đurđi i braći Slobodanu i Branislavu na nesebičnoj podršci koju su mi davali i sa mnom istrajali svih ovih godina. Sinovima Stevanu i Petru, mojoj konstantnoj motivaciji za rad, zahvaljujem se na velikoj podršci, razumevanju i pomoći tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Na kraju, iskoristio bih ovu priliku da pomenem i svog pokojnog oca Dragoslava. Uspomena na njega mi je često bila podstrek da u ovom poduhvatu istrajem.*

# Promena boje cveta perunike (*Iris germanica* L.) genetičkom modifikacijom biosinteze karotenoida

## REZIME

Boja cveta perunike (*Iris germanica* L.) je određena na osnovu dva odvojena biohemijska puta sinteze biljnih pigmentata. Na osnovu biosinteze karotenoida dobijaju se cvetovi žute, narandžaste i ružičaste boje, dok biosinteza antocijanina dovodi do plave, ljubičaste i bordo boje cvetova. Crvene perunike ne postoje u prirodi, i do danas nisu dobijeni kultivari sa ovom bojom primenom konvencionalnih načina oplemenjivanja. U ovoj disertaciji ispitana je mogućnost primene metoda genetičkog inženjeringa sa ciljem dobijanja perunika sa crvenim cvetovima. Za ostvarenje ovog osnovnog cilja razvijeni su protokoli za regeneraciju perunike (*I. germanica* L. 'Skating Party') iz ćelijskih suspenzija, protokoli za efikasnu genetičku transformaciju kao i genetičku transformaciju sa ciljem modifikacije biosintetskog puta karotenoida kod perunika.

Za genetičku transformaciju perunika su korišćene dve nezavisne metode, jedna zasnovana na biolističkoj transformaciji (bombardovanje mikroprojektilima) pomoću PDS-1000/He (Particle Delivery System) i druga zasnovana na *Agrobacterium*-posredovanoj transformaciji. Ovo su prve poznate metode za genetičku transformaciju vrsta roda *Iris*, koji će omogućiti dalje oplemenjivanje ovih ukrasnih vrsta primenom savremenih molekularnih metoda. Protokol zasnovan na *Agrobacterium*-posredovanoj transformaciji se pokazao kao bolji od biolističke transformacije u smislu efikasnosti i jednostavnosti primene. Ispitana je osetljivost ćelija perunika na dejstvo nekoliko antibiotika i pokazano je da su higromicin i gentamicin (G418) najpogodniji za selekciju transformisanih ćelija. Soj *A. tumefaciens* LBA 4404 koji nosi superbinarni vektor pTOK233 je bio najefikasniji za transformaciju perunika. Više od 300 morfološki normalnih transgenih perunika je dobijeno posle 6 meseci. Oko 80% regeneranata je pokazalo pozitivnu reakciju za marker gen  $\beta$ -glukuronidazu (GUS) i gen za neomicin fosfotransferazu II (NPTII) (paromomicin-rezistencija) koji se nalaze na plazmidu za transformaciju. Integracija transgena u genom jedra transformisanih perunika je potvrđena Southern blot-analizom.

Sa ciljem razvoja metoda za modifikaciju karotenoidnog biosintetskog puta kod perunika, prvo je transformisan kultivar 'Fire Bride,' koji ima ružičaste cvetove sa bakterijskim genom za fitoen sintazu (*crtB*) iz *Pantoea agglomerans* pod kontrolom promotorskog regiona gena za kapsantin-kapsorubin sintazu iz *Lilium lancifolium* (PLlccs). Ovaj pristup imao je za cilj da poveća protok prekursora karotenoida i dovede do povećanja koncentracije likopena i na taj način izazove pojavu tamnijih nijansi ružičaste ili crvenih nijansi cvetova perunika. U kalusnim kulturama ovog kultivara došlo je do povećane ekspresije *crtB* gena i promene boje kalusa od žute u ružičasto-narandžastu i nijanse crvene usled povećane akumulacije likopena. Cvetovi transgenih biljka dobijenih iz transgenih kalusa ovog kultivara su pokazali značajniju promenu boje plodnika i cvetnih drški (od zelene ka narandžastoj) kao i antera (od bele ka ružičastoj). Nisu uočene značajnije promene u boji perigona cvetova (standardima i folovima) u odnosu na kontrolne biljke. Rezultati ukazuju da su ovi geni u zelenim delovima cvetova perunike pod drugačijom regulacijom od delova cveta koji nisu zeleni. Kao

generalni zaključak dobijamo da se ektopijska ekspresija gena *crtB* može uspešno koristiti za delimično menjanje boje delova cvetova kultivara perunike ‘Fire Bride’ ali nije najpogodaniji metod za značajnije menjanje boje u standardima i folovima.

Kao drugi pristup genetičkom inženjeringu promene boje cvetova sa ciljem modifikacije sadržaja karotenoida u cvetovima ispitana je pogodnost gena za kapsantin-kapsorubin sintazu (*Llccs*) iz perijanta tigrastog ljiljana (*Lilium lancifolium* ‘Splendens’). Narandžasta boja cvetova tigrastog ljiljana nastaje, pre svega usled akumulacije dva  $\kappa$ -ksantofila, kapsantina i kapsorubina. Kapsantin-kapsorubin sintaza (CCS) je ključni enzim koji katalizuje konverziju anteraksantina i violaksantina u kapsantin i kapsorubin. Klonirana je sekvenca *Llccs* gena pomoću brzog umnožavanja cDNK krajeva (RACE) i heterolognog ne-degenerativnog prajmera dizajniranog na osnovu sekvence gena za likopen  $\beta$ -ciklazu (*LlcyB*) koji ima veliku homologiju sa *Llccs*. Dobijena je cDNK od *Llccs* gena dužine koja je iznosila 1785 bp sa otvorenim okvirom čitanja od 1425 bp koji kodira peptid od 474 aminokiseline sa predviđenom NH<sub>2</sub>-terminalnom sekvencom tranzitnog peptida (TP). Primenom metode reverzne transkripcije (RT-PCR) pokazana je prostorno i vremenski regulisana ekspresija *Llccs* gena koja je prisutna u cvetovima, ali ne i u vegetativnim delovima *L. lancifolium*. Stabilna, pojačana ekspresija *Llccs* gena u kalusnim kulturama *I. germanica*, koji inače prirodno akumuliraju nekoliko ksantofila uključujući violaksantin, prekursor kapsorubina koji daju kalusima žutu boju, dovela je do promene boje kalusa ka narandžasto-crvenoj. Dobijena izmenjena boja kalusa je nastala usled ektopijske akumulacije  $\kappa$ -ksantofila, kapsantina i kapsorubina, što je potvrđeno analizom pomoću HPLC i UPLC-MS/MS sa odgovarajućim standardima.

Da bi testirali sposobnost novo-kloniranog *Llccs* gena da promeni boju cvetova transformisan je paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) kao model sistem. Cvetovi paradajza prirodno akumuliraju anteraksantin i violaksantin, prekursor kapsantina i kapsorubina, ali njih same ne akumuliraju. Boja cvetova transgenog paradajza je promenjena od prirodno žute u različite nijanse narandžaste. Dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da ektopijska ekspresija *Llccs* gena može efikasno da preusmeri biosintezu karotenoida ka kapsantinu i kapsantin sličnom karotenoidu u cvetovima. Ovo predstavlja prvi uspešan pokušaj promene boje cvetova kod neke biljne vrste preko metaboličkog inženjeringa biosinteze kapsantina i kapsantin-sličnog karotenoida.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:** 577.21: 582.579.2(043.3)  
581.1: 602.6(043.3)

**Ključne reči:** biolistička transformacija, *Agrobacterium*-transformacija, CRT gen, kapsantin, kapsorubin, *Llccs* gen

# Alteration of flower color of *Iris germanica* L. through genetic modification of carotenoid biosynthetic pathway

## A B S T R A C T

Flower color in irises (*Iris germanica* L.) is determined by two distinct biochemical pathways. The carotenoid biosynthetic pathway generates yellow, orange and pink flowers, while the anthocyanin biosynthetic pathway produces blue, violet and purple flowers. Red iris flowers do not exist naturally, and conventional breeding methods have thus far failed to produce them.

This study examines genetic engineering approaches as a potential avenue for the development of a red iris that has not yet been explored. In the course of the work, protocols were developed for genetic transformation of *I. germanica*, and genetic modifications to the carotenoid biosynthetic pathway in irises.

Two independent methods for the genetic transformation of irises were developed; one based on biolistic (microprojectile bombardment) using PDS-1000/He (Particle Delivery System), and the other using *Agrobacterium*-mediated transformation. These are the first known protocols for the genetic transformation of *I. germanica*, which will allow this ornamental crop to benefit from modern molecular applications. The *Agrobacterium*-mediated protocol demonstrated significant advantages in both efficiency and ease of use over the biolistic transformation protocol.

In the course of development of the *Agrobacterium*-mediated protocol, a series of selection agents were tested. Hygromycin and geneticin (G418) were identified as the most suitable antibiotics for selecting transformed iris cells. *A. tumefaciens* strain LBA4404, carrying the superbinary vector pTOK233, was identified as the most efficient strain/vector combination for transformation of iris, of those tested.

More than 300 morphologically normal transgenic iris plants were obtained in about 6 months. About 80% of the regenerants tested positive for the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) marker gene and the neomycin phosphotransferase II (NPTII) (paromomycin-resistance) gene carried by the transformation plasmid. The integration of the transgenes into the nuclear genome of the transformed iris plants was confirmed by Southern blot analysis.

With the goal of developing methods for modifying the carotenoid biosynthetic pathway in irises using genetic engineering a pink iris cultivar, 'Fire Bride,' was transformed with the bacterial phytoene synthase gene (*crtB*) from *Pantoea agglomerans* under control of the promoter region of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from *Lilium lancifolium* (PLlccs). This approach aimed to increase the flux of carotenoid precursors into the carotenoid biosynthetic pathway, and ultimately lead to elevated levels of lycopene, thus generating shades of darker pink or red in the flowers. Iris callus tissue overexpressing the *crtB* gene showed a color change from yellow to pink-orange and red, which was shown to be due to an increased accumulation of lycopene. Transgenic plants regenerated from the calli showed prominent color changes in the ovaries (green to orange), flower stalk (green to orange), and anthers (white to pink). However, the color of the standards and falls showed no significant differences when compared to the control plants. This suggests that carotenogenesis in non-green parts of iris flowers is regulated differently compared to the green tissues. Altogether,

the results demonstrated that ectopic expression of a bacterial phytoene synthase gene can be used to successfully alter the color of some flower parts in *I. germanica* 'Fire Bride' and produce new flower traits. However, it is not a suitable method to produce significant color change in the standards and falls.

A second approach for modifying iris flower color tested the feasibility of using a gene for capsanthin-capsorubin synthase (*Llccs*) from the flower tepals of tiger lily (*Lilium lancifolium* 'Splendens'). The orange color of *L. lancifolium* 'Splendens' flowers is primarily due to the accumulation of two  $\kappa$ -xanthophylls, capsanthin and capsorubin. The capsanthin-capsorubin synthase (CCS) catalyzes the conversion of antheraxanthin and violaxanthin into capsanthin and capsorubin, respectively. The *Llccs* gene sequence was cloned using rapid amplification of cDNA ends (RACE) and a heterologous non-degenerate primer based on the sequence of a gene for lycopene  $\beta$ -cyclase (*LlcyB*) that has high homology with *Llccs*. The full-length cDNA of *Llccs* was 1785 bp long and contained an open reading frame of 1425 bp that encoded a polypeptide of 474 amino acids with a predicted N-terminal plastid-targeting sequence. Analysis by reverse transcription-PCR (RT-PCR) revealed that *Llccs* expression is spatially and temporally regulated; it was observed in the flower buds and flowers of *L. lancifolium*, but not in the vegetative tissues.

Stable overexpression of the *Llccs* gene in yellow callus tissue of *I. germanica*, which normally accumulates several xanthophylls including violaxanthin, resulted in transgenic calli whose color changed to red-orange. This color change was due to the ectopic accumulation of the  $\kappa$ -xanthophylls capsanthin and capsorubin, as confirmed by HPLC and UPLC-MS/MS analyses with authentic standards.

To test the ability of the newly cloned *Llccs* gene to change flower color, the *Llccs*-transgenic plants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) were generated. Tomato flowers accumulate both, antheraxanthin and violaxanthin, the precursors of capsanthin and capsorubin, respectively, but do not naturally accumulate capsanthin or capsorubin. The *Llccs*-transgenic tomato flowers changed from their natural yellow color to different shades of orange. The results demonstrate that the ectopic expression of the *Llccs* gene can effectively reroute the biosynthesis of carotenoids towards capsanthin and capsanthin-like carotenoid in flower tissues. This represents the first successful alteration of flower color of any species through metabolic engineering of capsanthin and capsanthin-like carotenoid biosynthesis.

<b>Scientific field:</b>	Biology
<b>Specific scientific field:</b>	Plant Physiology
<b>UDC number:</b>	577.21: 582.579.2(043.3) 581.1: 602.6(043.3)
<b>Key words:</b>	Biolistic transformation, <i>Agrobacterium</i> -transformation, CRT gen, capsanthin, capsorubin, <i>Llccs</i> gene



## SADRŽAJ

	Strana
<b>SKRAĆENICE</b>	
	1
<b>1. UVOD</b>	
1.1. Rod <i>Iris</i> i mogućnosti za genetičku transformaciju	1
1.2. Mogućnost promene boje cvetova perunika prema crvenoj primenom genetičke modifikacije biosintetičkog puta antocijanina	5
1.3. Mogućnosti promene boje cvetova perunika prema crvenoj primenom genetičke modifikacije biosintetičkog puta karotenoida	6
1.3.1. Biosinteza karotenoida	6
1.3.2. Uloga karotenoida u determinisanju boje cvetova	9
1.3.3. Genetičke modifikacije karotenoidnog biosintetičkog puta kod biljaka	11
1.3.3.1. Modulacija karotenogeneze putem ektopične ekspresije gena za fitoen sintazu ( <i>psy</i> ili <i>crtB</i> )	12
1.3.3.2. Opravdanost korišćenja gena za kapsantin-kapsorubin sintazu iz <i>Lilium lancifolium</i> u cilju promene boje cvetova	13
<b>2. CILJ RADA</b>	16
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	17
3.1. Biljni materijal i uslovi rastenja <i>ex vitro</i>	17
3.2. <i>In vitro</i> kultura	18
3.2.1. Hranljive podloge za <i>in vitro</i> kulturu	18
3.2.2. Indukcija kalusnih kultura perunika	19
3.2.3. Uspostavljanje i održavanje ćelijskih suspenzija	19
3.3. Procedure za genetičku transformaciju	19
3.3.1. Procedure za genetičku transformaciju ćelijskih suspenzija <i>I. germanica</i>	19
3.3.1.1. Biolistička transformacija	20
3.3.1.2. Razvoj procedure za genetičku transformaciju posredovanu <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.3.1.2.1. Selekcija soja <i>Agrobacterium</i>	21
3.3.1.2.2. Testiranje različitih selekcionih agenasa	21
3.3.1.2.3. Transformacija ćelija perunike gajenih u tečnoj podlozi posredovana sa <i>A. tumefaciens</i>	22
3.3.1.2.4. Selekcija transformanata	23
3.3.2. Genetička transformacija paradajza	24
3.4. Potvrda transformacije	25
3.4.1. Histoemijski esej za GUS aktivnost	25
3.4.2. Detekcija NPTII aktivnosti <i>in vivo</i>	26

3.4.3.	Detekcija transgena PCR metodom	26
3.4.4.	Detekcija integracije transgena southern blot hibridizacijom	29
3.5.	Analiza ekspresije gena	30
3.6.	Procedure za kloniranje i funkcionalnu karakterizaciju gena	31
3.6.1.	Molekularno kloniranje <i>LlcyB</i> i <i>Llccs</i> gena	31
3.6.2.	Kloniranje promotorskog regiona <i>Llccs</i> gena	32
3.6.3.	Manipulacija sa DNK i bioinformatičke analize	33
3.7.	Konstrukcija binarnih vektora	34
3.7.1.	Konstrukcija binarnog plazmida koji nose bakterijski <i>crtB</i> gen za transformaciju <i>I. germanica</i> 'Fire Bride'	34
3.7.2.	Konstrukcija binarnog vektora koji nosi <i>Llccs</i> gen za transformaciju <i>I. germanica</i> 'Hot Property'	35
3.7.3.	Konstrukcija binarnog vektora koji nosi <i>Llccs</i> gen za transformaciju <i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	36
3.8.	Analiza akumulacije karotenoida u tkivima transgenih biljaka	38
3.8.1.	HPLC i UHPLC analize	38
3.8.2.	UPLC-MS/MS analize	40
4.	<b>REZULTATI</b>	41
4.1.	Razvoj procedura za genetičku transformaciju <i>Iris germanica</i> L.	41
4.1.1.	Biolističke transformacija (bombardovanje mikroprojektilima) <i>I. germanica</i> L.	41
4.1.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> posredovana genetička transformacija <i>I. germanica</i>	43
4.1.2.1.	Evaluacija selekcionih agenasa	43
4.1.2.2.	Evaluacija soja <i>Agrobacterium</i> i transformacionog plazmida	45
4.1.2.3.	Procena efikasnosti transformacije kroz ekspresiju GUS gena i NPTII gena u regenerisanim transgenim biljkama	47
4.2.	Promena boje cvetova kod <i>I. germanica</i> L. 'Fire Bride' kroz genetičku modulaciju biosintetičkog puta karotenoida putem ektopične ekspresije gena za fitoen sintazu ( <i>crtB</i> ) iz <i>Pantoea agglomerans</i>	50
4.2.1.	Regeneracija <i>crtB</i> -transgenih biljaka perunike	51
4.2.2.	Promene u boji i nivoima karotenoida u <i>crtB</i> -transgenim kalusima perunike	51
4.2.3.	Promene boje kod <i>crtB</i> -transgenih biljaka perunika	52
4.2.4.	Ekspresiona šema <i>crtB</i> -transgenih perunika	57
4.2.5.	UHPLC analiza karotenoida u standardima i folovima <i>crtB</i> -transgenih perunika	58
4.2.6.	UHPLC analiza karotenoida u plodnicima i cvetnim drškama <i>crtB</i> -transgenih perunika	59
4.3.	Kloniranje i funkcionalna karakterizacija gena za kapsantin-kasporubin sintazu ( <i>Llccs</i> ) iz tigrastog ljiljana ( <i>Lilium lancifolium</i> Thunb. "Splendens")	62
4.3.1.	Molekularno kloniranje i analiza sekvence <i>Llccs</i> gena	62
4.3.2.	Ekspresija <i>Llccs</i> i <i>LlcyB</i> gena kod <i>L. lancifolium</i>	67
4.3.3.	Ekspresija <i>Llccs</i> transgena u kalusnom tkivu <i>I. germanica</i>	68

4.3.4.	HPLC analize karotenoida u <i>Llccs</i> -transgenim kalusima <i>I. germanica</i>	70
4.3.5.	UPLC-MS/MS ispitivanje karotenoida u <i>Llccs</i> -transgenim kalusima <i>I. germanica</i>	72
4.3.6.	Kloniranje promotora <i>Llccs</i> gena	73
4.4.	Promena boje cveta paradajza ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) 'MoneyMaker' putem metaboličkog inženjeringa kapsantin-kapsorubin biosintetičkog puta upotrebom <i>Llccs</i> gena iz <i>Lilium lancifolium</i>	75
4.4.1.	Regeneracija <i>Llccs</i> -transgenih biljaka paradajza	75
4.4.2.	Fenotipske promene kod <i>Llccs</i> -transgenih biljaka paradajza	75
4.4.3.	Ispitivanje ekspresije <i>Llccs</i> transgena kod transgenih biljaka paradajza	76
4.4.4.	Uporedna analiza sadržaja karotenoida u cvetovima netransformisanih i <i>Llccs</i> -transgenih biljaka paradajza metodom UHPLC	77
5.	<b>DISKUSIJA</b>	81
5.1.	Genetička transformacija <i>Iris germanica</i> L.	81
5.2.	Promena boje cvetova <i>I. germanica</i> L. 'Fire Bride' putem ektopične ekspresije gena za fitoen sintazu ( <i>crtB</i> ) iz <i>Pantoea agglomerans</i>	84
5.3.	Kloniranje i funkcionalna karakterizacija gena za kapsantin-kapsorubin sintazu (LICCS) iz tigrastog ljiljana ( <i>Lilium lancifolium</i> Thunb. 'Splendens')	89
5.4.	Promena boje cvetova paradajza ( <i>Solanum lycopersicum</i> L. 'MoneyMaker') putem metaboličkog inženjeringa kapsantin-kapsorubin biosintetičkog puta upotrebom <i>Llccs</i> gena iz <i>Lilium lancifolium</i>	94
6.	<b>ZAKLJUČCI</b>	97
7.	<b>LITERATURA</b>	99
8.	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	113

Prilog 1 – Izjava o autorstvu

Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Prilog 3 – Izjava o korišćenju

## SKRAĆENICE

BA	6-benzilamino purin
BKT (ili CRTW) (ili CRTO)	$\beta$ -karoten ketolazu
CaMV	mozaični virus karfiola
CCS	kapsantin-kapsorubin sintaza
cDNK	komplementarni lanac DNK
CRTB	fitoen sintaza (bakterijska)
CRTISO	karotenoid izomeraza
CYP97C	karoten $\epsilon$ -prsten hidroksilaza
2,4-D	2,4-dihlorofenoski sirćetna kiselina
DFR	dihidroflavonol 4-reduktaza
DHK	dihidrokampferol
DMAPP	dimetilalil difosfat
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DXC	1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfat sintaza
FLS	flavonol sintaza
F3'H	flavonoid 3'-hidroksilaza
F3'5'H	flavonoid 3' 5'-hidroksilaza
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom
HYDB (ili BCH) (ili CYP97A) (ili CYP97B) (ili CRTZ)	$\beta$ -karoten hidroksilaza
GGPP	geranilgeranil difosfat
GGPPS	geranilgeranil difosfat sintaza
GUS	$\beta$ -glukuronidaza
IAA	indol sirćetna kiselina
IPP	izopentenil difosfat
IPPI	izopentenil difosfat izomeraza
Kin	kinetin, 6-furfuril aminopurin
LCYB	likopen $\beta$ -ciklaza
LYCE	likopen $\epsilon$ -ciklaza
LDI-PCR	long distance inverse-PCR
MEP	2-C-metil-D-eritriol 4-fosfat
MTBE	metil-tert-butil etar
NAA	naftil sirćetna kiselina
NCED	9- <i>cis</i> -epoksikarotenoid dioksidgenaza
Nos	nopalin sintaza
NSY	neoksantin sintaza
NXS	neoksantin sintaza
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PDS	fitoen desaturaza
PEG	polietilen glikol
PPFD	photosynthetic photon flux density
pI	izoelektrična tačka

PSY	fitoen sintaza (kod biljaka)
PTFE	politetrafluoroetilen
Q-ToF	quadropole time of flight
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT-PCR	reverse transcription-PCR
TLC	tankoslojna hromatografija
TP	tranzitni peptid
UHPLC	ultra high performance tečna hromatografija
UPLC	ultraperformance tečna hromatografija
UPLC-MS/MS	UPLC sa masenom/masenom spektrometrijom
UTR	netranslatirani region
VDE	violaksantin de-epoksidaza
ZDS	ζ-karoten desaturaza
ZEP	zeaksantin epoksidaza
Z-ISO	ζ-karoten izomeraza

## 1. UVOD

### 1.1. ROD *IRIS* I MOGUĆNOSTI ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU

Rod *Iris* obuhvata preko 300 vrsta višegodišnjih monokotiledonih biljaka koje potiču iz umerenih delova severne hemisfere i mnoge od njih su sada kultivisane širom sveta. Vrste ovog roda su vekovima poznate zbog njihovih specifičnih cvetova, čijem širokom spektru prirodnih boja duguju svoj naziv koji je izveden iz grčke reči za boginju Iridu (*iris*-duga). Slovenski naziv perunike su dobile po Perunu, bogu gromovniku, vrhovnom staroslovenskom bogu koji je poruke sa neba na zemlju slao preko duge i gde god bi duga udarila na zemlju izrastala je perunika uvek drugih boja. Među vrstama ovog roda ističe se *Iris germanica* L., nemačka perunika, koja je najpoznatija i hortikulturno najznačajnija vrsta visokih bradatih perunika. Cvetovi perunike su dugo imali mnoga mitološka, umetnička i istorijska značenja. Na primer, u starom Egiptu, dekorativni cvetovi perunike su bili simboli pobede i često su krasili vrhove skiptara faraona (Kandeler i Ullrich, 2009). Pored njihove dekorativne vrednosti, rizomi nekih kultivara *I. germanica* sadrže esencijalno ulje koje se sastoji od  $\gamma$ -irona (ketonskih jedinjenja mirisa ljubičice), i veoma je skup sastojak koji se često koristi u kozmetici i za izradu parfema (Jéhan i sar., 1994; Kohlein, 1987; Gozu i sar., 1993)

Nove boje cvetova menjaju značajno estetske osobine ukrasnih biljaka i ukus krajnjih potrošača, pa samim tim postoji konstantan pritisak na cvećarsku industriju da ponudi nove varijetete. Zbog toga, dobijanje novih boja cvetova decenijama je bilo glavna pokretačka snaga među uzgajivačima i oplemenjivačima perunika (**Slika 1**). Na žalost, najveći napor u oplemenjivanju perunika bili su ograničeni na ukrštanja u okviru vrste zbog visokog stepena nekompatibilnosti između različitih vrsta perunika. Postoji veliko interesovanje oplemenjivača za novim bojama cvetova perunike kao što je crvena zato što se ona ne javlja normalno u prirodi. Napori da se dobiju perunike sa crvenom bojom cvetova klasičnim metodama oplemenjivanja nisu bili uspešni, iako je neuhvatljiva crvena boja perunike bila predmet interesovanja oplemenjivača više od jednog veka. Tako na primer, od 1954. godine, svetski poznati rasadnik perunika iz Firenze (Italija), Giardino dell'Iris, u saradnji sa Italijanskim društvom perunika,

održava godišnje Međunarodno takmičenje odgajivača perunika, koje dodeljuje specijalnu nagradu, "Premio Firenze", za odgajivače koji su poslali na takmičenje nove kultivare perunike čija boja cvetova je najbliža crvenoj boji perunike koja se nalazi kao simbol na gradskoj zastavi i amblemu.



**Slika 1.** Nekoliko primera koji ilustruju veliku raznolikost boja cvetova kultivara *I. germanica*. Preuzeto iz kataloga Cooley's Gardens Inc.

Generalno, boja cvetova biljaka prvenstveno zavisi od akumulacije tri tipa sekundarnih metabolita: flavonida, karotenoida i betalaina i predstavlja veoma značajnu hortikulturnu karakteristiku. Razlog zbog kojeg neke boje cvetova, kao što je crvena boja perunike ili plava boja ruže, ne postoje u prirodi je što neke vrste ne poseduju prirodnu sposobnost da proizvedu i akumuliraju određene vrste pigmenata u svojim

cvetovima. Na osnovu velikih zahteva tržišta podstaknutih velikom potražnjom potrošača za novim bojama cvetova biljaka dovelo je do usmeravanja istraživanja u pravcu pronalazjenja alternativnih načina njihovog dobijanja kao što je genetički inženjering.

Na osnovu literaturnih podataka poznato je da boju cvetova kultivara *I. germanica* određuju dva različita biohemijska puta, put biosinteze antocijanina i put biosinteze karotenoida (Warburton, 1978; Meckenstock, 2005). Kod cijaničnih cvetova perunike glavni pigmenti koji određuju boju spoljašnjem perigonu (folovi, *eng. falls*) i unutrašnjem perigonu (standardi *eng. standards*) cvetova su antocijanini tipa delfinidina koji daju plavu, ljubičastu i bordo boju cvetovima, dok su kod acijaničnih cvetova glavni pigmenti karotenoidi koji daju narandžaste, žute i roze nijanse cvetovima (**Slika 1, 13**). U prirodi ne postoje crvene perunike zbog toga što se kod cijaničnih perunika ne sintetišu antocijanini tipa pelargonidina i cijanidina koji obično daju crvene i narandžaste boje usled nedostatka odgovarajućih enzima za njihovu sintezu. Sa druge strane, crvene acijanične perunike ne postoje zbog nedovoljne akumulacije crvenih karotenoida kao što je likopen što za posledicu ima postojanje roze, ali ne i crvenih cvetova kod nekih kultivara perunika.

Genetički inženjering je jedna od potencijalnih metoda koja bi omogućila dobijanje perunika sa crvenim cvetovima ali još nedovoljno istražena. Generalno gledano, genetički inženjering se može iskoristiti za dobijanje novih boja cvetova biljaka na različite načine: (i) ubacivanjem novih gena koji kodiraju enzime koji inače ne postoje da bi se dobili novi biosintetički putevi, (ii) preusmeravanje biosintetičkih puteva putem pozitivne regulacije već postojećih gena ili (iii) supresijom biosintetičkih puteva putem negativne regulacije gena (Chandler i Brugliera, 2011).

Napori uloženi tokom prošlog veka da se putem klasičnog oplemenjivanja dobiju crvene perunike nisu doveli do uspeha pa bi zbog toga genetičke transformacije sa odgovarajućim genima bile alternativni pristup za uvođenje ove željene osobine. Preduslov za genetičku transformaciju je regeneracija biljaka iz somatskih tkiva koja su gajena u aseptičnim uslovima (*in vitro* kultura). Na žalost regeneraciju *I. germanica* i drugih vrsta karakteriše niska efikasnost što usporava razvoj pogodnog metoda za genetičke transformacije perunika (Jevremović i sar., 2011). Međutim, Wang i sar., (1999a; 1999b) su uspešno razvili vrlo efikasan sistem za regeneraciju perunika iz



ćelijskih suspenzija (kultivar 'Skating Party') što je bio dobar preduslov i polazna tačka u daljem razvoju metoda za primenu genetičkog inženjeringa kod perunika.

Postoji nekoliko metoda za genetičke transformacije biljaka od kojih se najčešće koriste transformacija pomoću *Agrobacterium tumefaciens* ili *A. rhizogenes* kao i biolistička transformacija (bombardovanje mikroprojektilima). Pored toga, alternativne metode genetičkih transformacija biljaka podrazumevaju i direktan transfer gena elektroporacijom u protoplaste, tretmanom polietilen-glikolom (PEG), ili transformaciju ćelija pomoću vlakana silicijum karbida. Bombardovanje mikroprojektilima i direktan transfer gena u protoplaste su metode koje su se uobičajeno koristile za genetičke transformacije raznih monokotiledonih biljaka za koje se dugo vremena smatralo da su nepodležne genetičkoj transformaciji posredovanoj *Agrobacterium spp.* (Vain i sar., 1995). Tako da su, u vreme kada je rad na razvijanju metoda za genetičke transformacije perunika inicijalno planiran i započet, objavljeni bili samo radovi na genetičkim transformacijama primenom metode bombardovanja mikroprojektilima kod dve hortikulturno značajne monokotiledone biljke: orhideje (*Dendrobium Swartz*; Kuehnle i Sugii, 1992) i gladiole (*Gladiolus L.*, Kamo i sar., 1995).

*Agrobacterium*-posredovana transformacija ima značajne prednosti nad drugim metodama za genetičku transformaciju biljaka kao što su integracija jedne ili malog broja kopija T-DNK sa definisanim graničnim sekvencama i minimalnim rearanžiranjem u genomu biljke, vrlo često integrisanje novih gena (transgena) u delovima hromozoma koji su aktivni u transkripciji, visok kvalitet i fertilitet nastalih transgenih biljaka i laka manipulacija (Komari i sar., 1998; Tingay i sar., 1997). Metode za transformisanje dikotiledonih vrsta upotrebom *Agrobacterium* su dobro razrađene. Nasuprot tome, sve do nedavno se smatralo da se monokotiledone biljke ne mogu transformisati putem *Agrobacterium*-posredovane transformacije. Tokom 1970-ih i 1980-ih godina izvedeni su različiti pokušaji da se monokotiledone biljke inficiraju sa *Agrobacterium*, ali nije zabeležen nijedan ubedljiv dokaz integrativne transformacije (Conner i Dommissie, 1992; Smith i Hood, 1995). Međutim, danas su uspešno postignute genetičke transformacije pomoću *A. tumefaciens* nekoliko poljoprivredno značajnih monokotiledonih biljaka uključujući kukuruz (*Zea mays L.*), pšenicu (*Triticum aestivum L.*), pirinač (*Oryza sativa L.*), ječam (*Hordeum vulgare L.*) i šećernu trsku (*Saccharum spp. L.*, Arencibia i sar., 1998; Cheng i sar., 1997; Hiei i sar., 1994;

Ishida i sar., 1996; Tingay i sar., 1997). U vreme početaka našeg rada na genetičkoj transformaciji perunika, pre više od 15 godina, značajnija primena *A. tumefaciens* za stabilnu transformaciju monokotiledonih ukrasnih biljaka bila je pokazana jedino kod *Anthurium scherzerianum*, varijeteta Schott “Rudolph” i “UH1060” (Chen i Kuehnle, 1996). Do danas su objavljeni protokoli za genetičke transformacije više od 50 vrsta ukrasnih biljaka (Brand, 2006; Shibata, 2008) sa istim izazovima vezanim za samu genetičku transformaciju kao i kod ostalih biljnih vrsta. Pre svega, to se odnosi na rezistenciju monokotila na *Agrobacterium* infekciju, postojanje velike varijabilnosti u sposobnosti za regeneraciju i samu transformaciju biljaka, velika zavisnosti od genotipa, kao i pojava somaklonalnog variranja (Chandler and Sanchez, 2012).

## **1.2. MOGUĆNOST PROMENE BOJE CVETOVA PERUNIKA PREMA CRVENOJ PRIMENOM GENETIČKE MODIFIKACIJE BIOSINTETIČKOG PUTA ANTOCIJANINA**

Genetičke modifikacije biosintetskih puteva flavonoida uspešno su korišćene kod nekoliko biljnih vrsta da bi se dobila crvena boja cvetova (Chandler i Tanaka, 2007; Nishihara i Nakatsuka, 2011). Na primer, prethodno istraživanje je pokazalo da se biljke koje akumuliraju dihidrokampferol (DHK) mogu genetički modifikovati upotrebom heterolognog gena za dihidroflavonol-4-reduktazu (DFR) sa različitom specifičnošću prema supstratu u cilju dobijanja crvene boje cvetova biljaka (Meyer i sar., 1987). Ipak, ova strategija u istraživanju se ne može direktno primeniti na *I. germanica* jer zahteva domaćine koji prirodno akumuliraju DHK.

Crvena boja cvetova je takođe dobijena kod nekoliko biljnih vrsta manipulacijom multiplim genima. Na primer, crvena boja cvetova duvana, *Nicotiana tabacum*, postignuta je preusmeravanjem biosintetičkog puta antocijanina u pravcu sinteze pelargonidina putem supresije enzima flavonol sintaze (FLS) i flavonoid-3-hidroksilaze (F3'H) i naknadnim uvođenjem DFR gena gerbera (Nakatsuka i sar., 2007). Sličan pristup je korišćen kod *Torenia hybrida* gde je supresija F3'H i flavonoid 3',5'-hidroksilaze (F3'5'H) uz pojačanu ekspresiju heterolognog DFR gena dovela do toga da se inače kod prirodno plavih cvetova dobiju cvetovi sa ružičastim tonovima (Nakamura i sar., 2010). Ove strategije bi se potencijalno mogle primeniti na *I. germanica*, međutim

usled toga što nema puno podataka o ovim genima kod perunika, samo istraživanje bi zahtevalo kloniranje i transformacije sa multiplim genima.

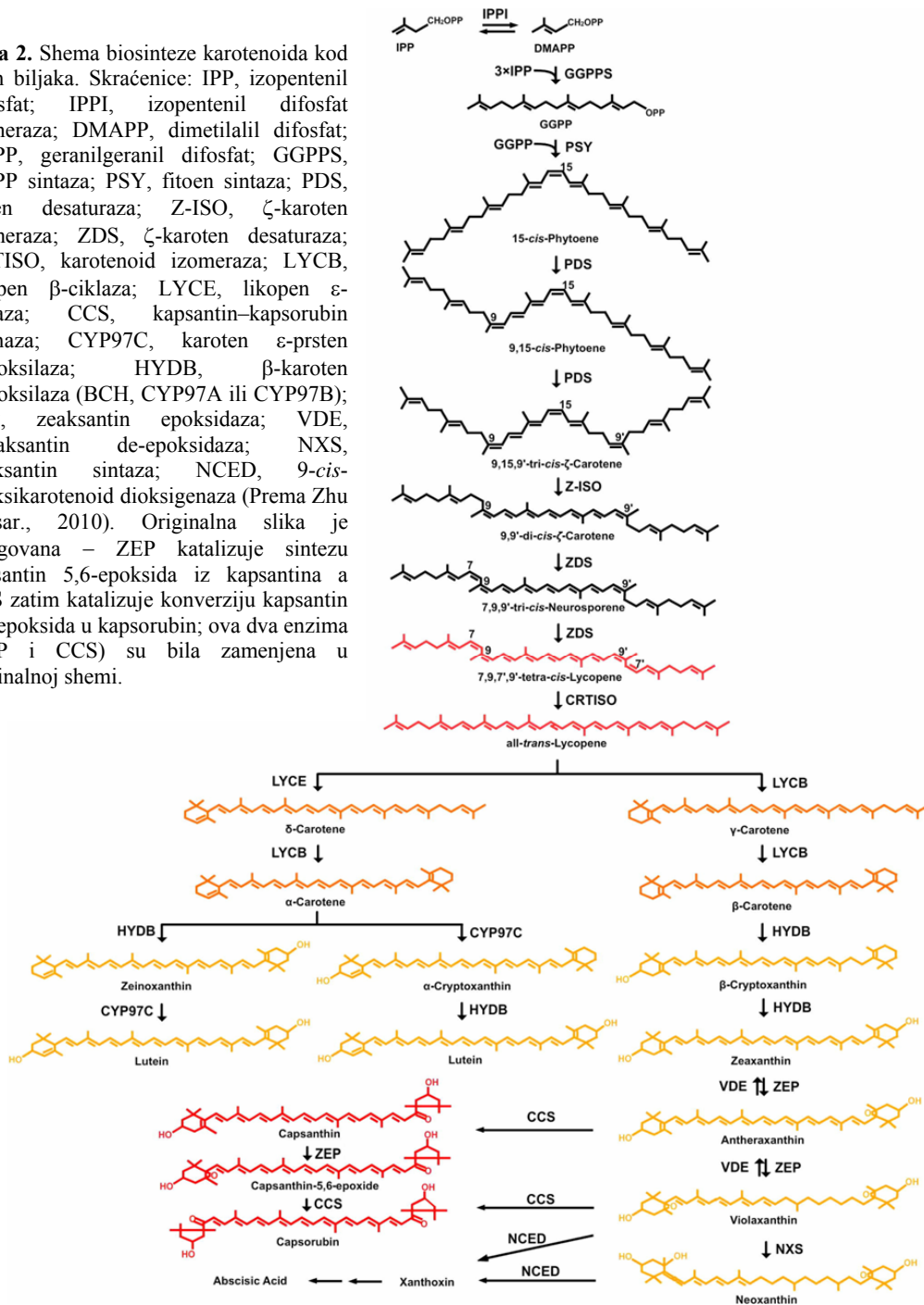
Saznanja vezana za genetičke transformacije ovim genima verovatno ne bi doprinela dobijanju crvenih cvetova kod *I. germanica* jer postoje druge prepreke za korišćenje manipulacije flavonoidima. Osnovni problem je što antocijanini pre nego što se uskladište u vakuolama često prolaze kroz procese glikozilacija, acilacija i metilacija koje potencijalno mogu uticati na promenu boje (Tanaka i sar., 2010). Ove reakcije je veoma teško kontrolisati, što otežava usmeravanje sinteze u pravcu stvaranja određenog antocijanina. Pored toga, antocijanini menjaju boju pod uticajem različitih faktora poput pH vakuole (Quattrocchio i sar., 2006; Yoshida i sar., 2009), kopigmentacije (Takeda i sar., 2010; Yabuya i sar., 1997), kompleksacije metalnim jonima (Shiono i sar., 2008; Momono i sar., 2009) veličine i oblika ćelije (Kay i sar., 2003; Dyer i sar., 2007). Ukoliko bi se i akumulirala odgovarajuća vrsta antocijanina ne postoji garancija da bi to rezultiralo očekivanom bojom u cvetovima. Iz ovih razloga fokus istraživanja je bio na metaboličkim modifikacijama druge glavne grupe pigmenta, koja određuje boju cvetova perunika, karotenoidima.

### **1.3. MOGUĆNOSTI PROMENE BOJE CVETOVA PERUNIKA PREMA CRVENOJ PRIMENOM GENETIČKE MODIFIKACIJE BIOSINTETIČKOG PUTA KAROTENOIDA**

#### **1.3.1. BIOSINTEZA KAROTENOIDA**

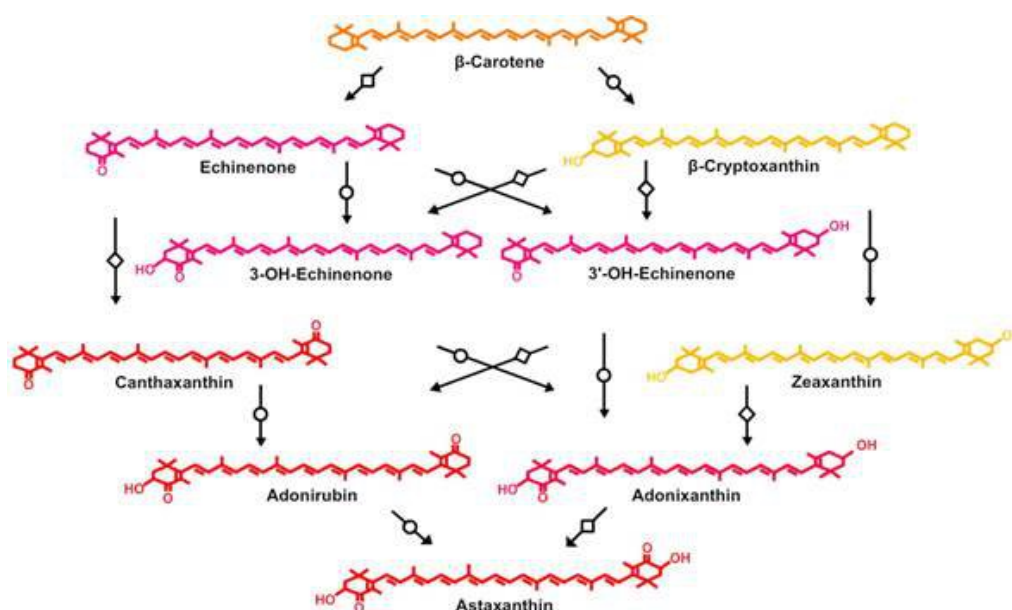
Do danas je otkriveno više od 700 prirodnih karotenoida (Britton i sar., 1995, Britton i sar., 2004). U biljkama karotenoidi su sastavni delovi fotosintetičkog aparata i učestvuju u reakcijama fotosinteze igrajući ključnu ulogu u zaštiti fotosintetičkog aparata od fotooksidacije (Niyogi, 2000; Howitt i Pogson, 2006). Karotenoidi su i prekursori nekih biljnih hormona kao što su abscisinska kiselina i strigolaktini (Dun i sar., 2009; Nambara i Marion-Poll, 2005). Neki karotenoidi su neophodni sastojci u ishrani ljudi i životinja gde služe kao prekursori vitamina A (Olson, 1989). Karotenoidi se koriste i kao antioksidansi tako što uklanjaju aktivirani kiseonik ( $O^{\cdot}$ ) i slobodne

**Slika 2.** Shema biosinteze karotenoida kod viših biljaka. Skraćenice: IPP, izopentenil difosfat; IPPI, izopentenil difosfat izomeraza; DMAPP, dimetilalil difosfat; GGPP, geranilgeranil difosfat; GGPPS, GGPP sintaza; PSY, fitoen sintaza; PDS, fitoen desaturaza; Z-ISO, ζ-karoten izomeraza; ZDS, ζ-karoten desaturaza; CRTISO, karotenoid izomeraza; LYCB, likopen β-ciklaza; LYCE, likopen ε-ciklaza; CCS, kapsantin-kapsorubin sintaza; CYP97C, karoten ε-prsten hidroksilaza; HYDB, β-karoten hidroksilaza (BCH, CYP97A ili CYP97B); ZEP, zeaksantin epoksidaza; VDE, violaksantin de-epoksidaza; NXS, neoksantin sintaza; NCED, 9-*cis*-epoksikarotenoid dioksigenaza (Prema Zhu i sar., 2010). Originalna slika je korigovana – ZEP katalizuje sintezu kapsantin 5,6-epoksida iz kapsantina a CCS zatim katalizuje konverziju kapsantin 5,6-epoksida u kapsorubin; ova dva enzima (ZEP i CCS) su bila zamenjena u originalnoj shemi.



radikale, pa zbog toga imaju mnoge povoljne efekte na ljudsko zdravlje (Matsufuji i sar., 1998; Maoka i sar., 2001a). Na primer, karotenoidi ograničavaju senilnu makularnu degeneraciju, obezbeđuju zaštitu od različitih hroničnih bolesti, smanjuju rizik od brojnih vrsta kancera, koronarnih bolesti srca, koriste se kao imunostimulansi i fotoprotektivne supstance (Krinsky i Johnson, 2005; Fraser i Bramley, 2004).

Karotenoidi su lipofilni C<sub>40</sub> izoprenoidi, sa polienskim lancima koje sintetišu biljke, fotosintetičke i neke nefotosintetičke bakterije i neke gljivice (Hirschberg i sar., 1997; Cunningham, 2002; Rodríguez-Concepción, 2010). Kod viših biljaka karotenoidi se obično sintetišu u plastidima u 2-C-metil-D-eritriol 4-fosfat (MEP) putu pomoću enzima koje kodiraju geni jedra (Cunningham, 2002; Rodríguez-Concepción, 2010; Cazzonelli, 2011). Šematski prikaz procesa biosinteze karotenoida kod biljaka je prikazan na **Slikama 2 i 3** (preuzeto iz Zhu i sar., 2006). Prvi korak u tom procesu uključuje glava-glava kondenzaciju dva molekula geranilgeranil difosfat (GGPP) što daje fitoen (C<sub>40</sub>). Zatim kroz četiri reakcije desaturacije i enzimsku ili fotoizomerizaciju pod uticajem svetlosti od 15-*cis*-fitoena nastaje all-*trans*-likopen. Ciklizacija linearnog all-*trans*-likopena nastaje u tački grananja biosintetičkog puta. Cikloheksanski prstenovi se formiraju na oba kraja molekula likopena čime nastaju  $\alpha$ -karoten sa jednom  $\epsilon$ - i jednom  $\beta$ -jononskom terminalnom grupom i  $\beta$ -karoten sa dve  $\beta$ -jononske terminalne grupe. Karotenoidi sa dve  $\epsilon$ -jononske grupe su retki.



**Slika 3.** Šema biosinteze astaksantina iz  $\beta$ -karotena. Strelica sa dodatim kvadratom predstavlja  $\beta$ -karoten ketolazu – BKT, CRTW ili CRTO. Strelica sa dodatim krugom predstavlja  $\beta$ -karoten hidrosilazu (HYDB) – BCH, CYP97A, CYP97B ili CRTZ (Prema Zhu i sar., 2010).

Do ove tačke u biosintetičkom putu svi gore pomenuti karotenoidi su po prirodi isključivo ugljovodonici. Sledeći koraci uključuju enzimski posredovano dodavanje

aktiviranih kiseoničnih grupa karotenima pa tako nastaju hidroksi, epoksi i oksidni derivati kao što su lutein na  $\beta,\epsilon$  grani, zeaksantin, anteraksantin, violaksantin i neoksantin na  $\beta,\beta$  grani, i laktukaksantin na  $\epsilon,\epsilon$  grani biosintetskog puta. Karotenoidi koji sadrže kiseonik su zajedno poznati kao ksantofili (Bartley i Scolnik, 1995, Ladygin, 2000). Do danas su svi geni glavnog karotenskog biosintetičkog puta koji kodiraju sintezu karotenoida klonirani i funkcionalno okarakterisani.

### 1.3.2. ULOGA KAROTENOIDA U DETERMINISANJU BOJE CVETOVA

Karotenoidi daju žutu, narandžastu, roze i crvenu pigmentaciju cvetovima mnogih biljnih vrsta i stoga igraju značajne uloge u reprodukciji biljaka tako što privlače oprašivače i potpomažu širenje semena (Cunningham i Gantt, 1999; Tanaka i sar., 2008; Ohmiya, 2011). I  $\beta,\epsilon$  i  $\beta,\beta$  ksantofili se u vrlo velikim količinama akumuliraju u laticama cvetova mnogih biljnih vrsta i odgovorni su za bleđu žutu do tamno žutu i narandžastu boju, u zavisnosti od relativnog sadržaja ovih supstanci (Zhu i sar., 2010; Ohmiya 2011).

Žuta boja cvetova kod mnogih vrsta biljaka posledica je akumulacije velikih količina žutih  $\beta,\epsilon$ - i  $\beta,\beta$ -ksantofila (**Slika 4**). Tako na primer, boja žutih cvetova ljljana potiče od, prema količini, najzastupljenijeg anteraksantina, (9Z)-violaksantina, cis-luteina, violaksantina i luteina, kao i male količine  $\beta$ -karotena, (Yamagishi i sar., 2010; **Slika 4a**). Sa druge strane, žute i narandžaste nijanse latica kadife (*Tagetes erecta* L.) potiču od akumulacije velikih količina luteina (**Slike 4b, c**). Cvetovi kadife se koriste kao komercijalni izvor luteina, proizvoda koji se široko koristi kao dodatak hrani za živinu za pojačavanje žute boje žumanceta. Zlatno narandžasta boja cvetova biljke zvane Božićno zvonce (*Sandersonia aurantiaca* Hook) posledica je akumulacije velikih količina  $\beta$ -kriptoksantina, zeaksantina i  $\beta$ -karotena (Nishihara i Nakatsuka, 2011; **Slika 4d**). Roze boja latica nekoliko kultivara *I. germanica* posledica je akumulacije likopena (Werckmeister, 1960; Gardner, 1960, **Slika 4e**). Neke vrste iz rodova *Lilium*, *Cajophora* i *Adonis* imaju narandžaste, narandžasto-crvene i crvene cvetove sa veoma neobičnim karotenoidnim profilima. Narandžaste i crveno-narandžaste nijanse latica *Cajophora*



**Slika 4.** Primeri raznih biljnih vrsta kod kojih karotenoidi daju žutu, narandžastu, roze i crvenu pigmentaciju cvetovima. **(a)** *Lilium lancifolium* ‘Yellow Star’; **(b)** Žuta *Tagetes erecta* L.; **(c)** Narandžasta *Tagetes erecta* L.; **(d)** *Sandersonia aurantiaca* Hook.; **(e)** *Iris germanica* L. ‘Belle de Juin’; **(f)** *Cajophora lateritia* **(g)** *Lilium lancifolium* **(h)** *Lilium pumilum* **(i)** *Adonis aestivalis*.

Izvori slika:

- (a) <http://ladyofshadow.deviantart.com/art/Tiger-Lily-Yellow-Star-128383949>;  
 (b) [http://farm6.staticflickr.com/5006/5362808961\\_7ac526bf3c\\_b.jpg](http://farm6.staticflickr.com/5006/5362808961_7ac526bf3c_b.jpg)  
 (c) <http://naturaoxalis.blogspot.com/2012/10/tagetes-erecta.html>  
 (d) [http://i640.photobucket.com/albums/uu127/euganeo\\_album/P1000571.jpg?t=1235763810](http://i640.photobucket.com/albums/uu127/euganeo_album/P1000571.jpg?t=1235763810)  
 (e) <http://www.hogendoornholland.com/fotogallerij/soorten/fotos/iris-germanica/album.html>  
 (f) <http://www.botanischer-garten-potsdam.de/pflanzeninfo/sehenswert/2009-04.htm>  
 (g) [http://www.geofflawrence.com/photopost/data/502/Tiger\\_Lily\\_1.jpg](http://www.geofflawrence.com/photopost/data/502/Tiger_Lily_1.jpg)  
 (h) <http://www.visoflora.com/photos-nature/photo-grand-lys-corail-lilium-pumilum.html>  
 (i) <http://www.overthegardengate.net/garden/archives/template.asp?LinkID=214>

*lateritia* kao i perijanta (ne razlikuju se krunice i čašice) i prašnika nekoliko vrsta roda *Lilium* prvenstveno potiču od akumulacije dva crvena  $\kappa$ -ksantofila, kapsantina i kapsorubina (Valadon i Mummery, 1976; Deli i sar., 2000; **Slike 4f, g, h**). Sa druge strane crvena boja cvetova *Adonis aestivalis* i *Adonis annua* posledica je akumulacije velikih količina astaksantina, adonirubina i adoniksantina (Cunningham i Gantt, 2005; **Slike 3, 4i**).

### 1.3.3. GENETIČKE MODIFIKACIJE KAROTENOIDNOG BIOSINTETIČKOG PUTA KOD BILJAKA

Prema dostupnim literaturnim podacima može se zaključiti da je bilo svega nekoliko uspešnih pokušaja promene biosinteze karotenoida u cvetovima biljaka (Mann i sar., 2000; Hirschberg, 2001). Sve objavljene studije su se zasnivale na metaboličkoj modifikaciji biosintetičkog puta karotenoida kako bi se uvela sinteza astaksantina (3,3'-dihidroksi- $\beta$ , $\beta$ -karoten-4,4'-diona). Tako su Mann i sar., (2000) objavili rezultate o genetičkoj transformaciji duvana (*N. tabacum*) pomoću  $\beta$ -karoten ketolaza gena (*crtO*) koji je kloniran iz zelene alge *Haematococcus pluvialis* i dobili biljke koje su akumulirale nove  $\kappa$ -karotenoide, naročito astaksantin i to pre svega u nektarijama cvetova. Kao konačni rezultat došlo je do toga da inače blede žute nektarije postanu svetlo-crvene. Slične rezultate su dobili Ralley i sar., (2004) koji su genetičkim inženjeringom uveli sintezu astaksantina kod *N. tabacum* koristeći dva gena, 3,3'- $\beta$ -hidroksilazu (*crtZ*) i 4,4'- $\beta$ -oksigenazu (*crtW*), iz morskih bakterija roda *Paracoccus*. Iako su autori ovih studija postigli promenu boje u određenim biljnim tkivima putem modifikacije biosinteze karotenoida, njihov cilj je bio da demonstriraju potencijal nove metode u proizvodnji ekonomski značajne supstance, astaksantina, koji se široko upotrebljava kao dodatak hrani u akvakulturama (Mann i sar., 2000).

Koliko je prema dostupnoj literaturi poznato, do sada, samo su dve studije bile usmerene na dobijanje novih boja cvetova putem modifikacije biosinteze karotenoida. Umemoto i sar., (2006) i Umemoto i Toguri (2012) upotrebili su (*crtZ*) gen iz *Agrobacterium auranticum* i koristili ga za genetičku transformaciju petunije. Gen su spojili sa različitim tranzitnim peptidima (TP) da bi ga doveli do hromoplasta cvetova kultivara petunije sa blede-žutim cvetovima. Osnovni cilj ovih istraživanja je bio procena efekta različitih TP na ekspresiju gena i postizanja promene boje cvetova. Nastale transgene biljke razvile su cvetove čija se boja kretala od tamno žute do narandžaste u zavisnosti od količine akumuliranog astaksantina, što je zavisilo od toga koji je TP vezivan za *crtW* gen. Slično tome, Suzuki i sar., (2007) upotrebili su *crtW* da uvedu biosintezu astaksantina u *Lotus japonicus*. Transformisane biljke akumulirale su



nekoliko novih karotenoida u cvetovima, uključujući astaksantin, što je promenilo njihovu prirodnu žutu boju u različite nijanse narandžaste.

### 1.3.3.1. MODULACIJA KAROTENOGENEZE PUTEM EKTOPIČNE EKSPRESIJE GENA ZA FITOEN SINTAZU (*PSY* ILI *CRTB*)

Pored genetičkog inženjeringa sinteze astaksantina, još jedna strategija je interesantna za manipulaciju biosinteze karotenoida u različitim delovima biljke, ali ne i u cvetovima. To je ektopična ekspresija gena za fitoen sintazu (poznatog kao *PSY* kod biljaka i kao *CRTB* kod bakterija), u cilju povećanja ukupnog sadržaja karotenoida (**Slika 2**). Kao što je navedeno ranije, fitoen sintaza katalizuje formiranje fitoena od dva molekula GGPP što je prvi korak u biosintezi karotenoida (Camara, 1993). Studije su pokazale da je sinteza fitoena kod mnogih vrsta limitirajući faktor koji ograničava *de novo* biosintezu karotenoida kao i da su nivoi ekspresije *PSY* u direktnoj korelaciji sa akumulacijom karotenoida (Giuliano i sar., 1993; Welsch i sar., 2000). Iako se genetički inženjering koji uključuje *PSY* još nije koristio za modifikovanje sadržaja karotenoida u cvetovima, uspešno je upotrebljen u cilju povećanja sadržaja karotenoida kod plodova paradajza, krtola krompira, lišća duvana i semena nekoliko biljnih vrsta (Rosatija i sar., 2009). Tako je u radu Shewmaker i sar., (1999) pokazano da ektopična ekspresija bakterijskog *crtB* gena u semenima uljane repice (*Brassica napus*), koja su inače zelene boje, upotrebom promotora specifičnog za seme, dovodi do formiranja narandžastih semena kod kojih je sadržaj karotenoida pedeset puta veći nego kod netransformisanih semena. Slični rezultati su postignuti i sa semenima lana (*Linum usitatissimum*), takođe upotrebom *crtB* gena. Ukupna koncentracija karotenoida u ovim semenima povećala se od 8 do 19 puta, što je dovelo do promene njihove boje od svetlo žute u narandžastu (Fujisawa i sar., 2008). Interesantno je pomenuti da je *psy* gen zajedno sa bakterijskim genom za karoten desaturazu (*CTRI*) uspešno iskorišćen za genetičko inženjerstvo biosinteze karotenoida u endospermu pirinča (*Oryza sativa*). Naime, endosperm pirinča je prirodno bele boje i ne sadrži karotenoide. Nasuprot tome, u semenima *psy-crtI*-transgenog pirinča došlo je do promene boje u zlatno-žutu (“zlatni pirinač” *eng.* “golden rice”) kao posledica sinteze i akumulacije  $\alpha$ -karotena,  $\beta$ -karotena (provitamin A) i nekih ksantofila kao što su lutein i zeaksantin (Ye i sar., 2000; Schaub i sar., 2005). Prema

dosadašnjim saznanjima, nijedna studija pre ove, prezentovane u ovoj doktorskoj disertaciji, nije koristila ni *psy* ni *crtB* gen sa ciljem same promene boje u tkivima cvetova biljaka. Međutim, gore pomenute studije ukazuju na to da pojačana ekspresija gena za PSY ili CRTB u cvetovima potencijalno može rezultirati povećanom pigmentacijom i dovesti do dobijanja novih nijansi cvetova.

### 1.3.3.2. OPRAVDANOST KORIŠĆENJA GENA ZA KAPSANTIN-KAPSORUBIN SINTAZU IZ *LILIUM LANCIFOLIUM* U CILJU PROMENE BOJE CVETOVA

Još jedan potencijalno koristan gen, koji bi se mogao upotrebiti u cilju dobijanja crvenih cvetova kod perunike, jeste gen za kapsantin-kasporubin sintazu (*ccs*, **Slika 2**). Pre ovih istraživanja jedino je *ccs* gen iz paprike (*Capsicum annuum*), koja je dikotiledona vrsta, bio kloniran i funkcionalno okarakterisan (Bouvier i sar., 1994; Kumagai i sar., 1998; Mialoundama i sar., 2010). Međutim, zbog dobro poznatih razlika u korišćenju kodona koje postoje između monokotiledonih i dikotiledonih biljaka (Campbell i Gowri, 1990, Kawabe i Miyashita, 2003), a koje mogu kasnije uticati na ekspresiju i stabilnost transgena u heterolognim sistemima, bolje je klonirati i funkcionalno okarakterisati *ccs* gen iz neke monokotiledone biljke, kao što je, na primer ljljan (*Lilium lancifolium*) u cilju uspešne genetičke transformacije perunika. Drugi razlog za neophodnost kloniranja gena iz neke monokotile je taj što je *ccs* gen paprike kloniran pre mnogo godina, ali u međuvremenu nije bilo podataka o uspešnom korišćenju tog gena za stabilnu transformaciju bilo koje biljne vrste. Dodatna prednost kloniranja *ccs* gena iz *L. lancifolium* jeste ta što je on specifičan za cvet, pa bi se njegov promotorski region mogao koristiti za postizanje specifične ekspresije gena u cvetovima kod perunike. Veliki značaj kloniranja ovog promotora se ogleda i u tome što do danas nema podataka u literaturi o bilo kojim promotorima za perunike koji bi diktirali ekspresiju u cvetovima.

Karotenoidi predstavljaju glavne pigmente koji dovode do pojave narandžaste i crveno-narandžaste boje cvetova kod nekoliko vrsta roda *Lilium*. Ove vrste imaju neuobičajene karotenoidne profile zahvaljujući prirodnim modifikacijama koje postoje u samom biosintetičkom putu karotenoida. Narandžaste i crveno-narandžaste boje perijanta i prašnika ovih vrsta, uključujući *L. lancifolium* (bivši *L. tigrinum*, opštepoznat

i kao tigrasti ili đavolji ljiljan) posledica su akumulacije dva crvena pigmenta, kapsantina (3,3'-dihidroksi- $\beta$ , $\kappa$ -karoten-6'-on) i kapsorubina (3,3'-dihidroksi- $\kappa$ , $\kappa$ -karoten-6,6'-dion; Valadon i Mummery, 1976; Märki-Fischer i Eugster, 1985; Yamagishi i sar., 2010). Kapsantin i kapsorubin su  $\kappa$ -ksantofili koji sadrže jedan odnosno dva za karotenoide neuobičajena ciklopentanska  $\kappa$ -prstena. Oni su takođe glavni pigmenti ploda crvene paprike (*Capsicum annuum*). Kapsantin i kapsorubin se sintetišu iz dva ubikvitarna 5,6-epoksi-ksantofila, anteranksantina i violaksantina (**Slika 2**). Sintezu kapsantina i kapsorubina katalizuje isti enzim, kapsantin-kasporubin sintaza (CCS; Bouvier i sar., 1994). Kapsantin i/ili kapsorubin su identifikovani kod više vrsta roda *Lilium* uključujući *L. tigrinum* (Karrer i Oswald, 1935), *L. amabile* (Seybold 1953), *L. Davidii* i *L. leichtinii* i njihovog hibrida *L. Maxwill* (Valadon i Mummery, 1976), *L. pumilum* (Partali i sar., 1987), kao i azijskog hibridnog ljiljana 'Saija' (Yamagishi i sar., 2010). Kod crveno-narandžastog perijanta *L. tigrinum* 'Red Night', glavni pigmenti su kapsantin i njegovi Z-izomeri [(9'Z)-, (9Z)-, (13'Z)- i (13Z)-kapsantin], koji zajedno čine više od 53% ukupnih karotenoida (Märki-Fischer i Eugster, 1985). Glavni pigment crveno-narandžastog perijanta kod *L. pumilum* je kapsorubin, koji čini više od 80% ukupnih karotenoida (Partali i sar., 1987).

Kapsantin i kasporubin su identifikovani u svega nekoliko biljnih vrsta pored *C. annuum* i *Lilium spp.* Kapsantin je izolovan iz prašnika nekoliko vrsta *Aesculus*, iz plodova sedam vrsta roda *Berberis*, kao i iz plodova *Asparagus officinalis*, dok je kapsorubin izolovan iz plodova *Asparagus officinalis*, iz integumenta *Encephalartos altensteinii*, plodova *Encephalartos villosus*, iz kruničnih listića *Cajophora lateritia* kao i iz prašnika određenog broja vrsta *Aesculus* (Rüttimann, 1982; Deli i sar., 2000).

Pretraga NCBI GenBank otkriva nekoliko sekvenci iz pet biljnih vrsta koje se mogu indentifikovati kao geni za CCS. To uključuje *Citrus sinensis* (GenBank pristupni broj AF169241.1), *Capsicum annuum* (više GenBank pristupnih brojeva, npr. X76165.1), *Ricinus communis* (GenBank pristupni broj XP\_002523837.1), *Daucus carota* (GenBank pristupni brojevi ABB52072.1 i AF208530.1) i *Medicago truncatula* (GenBank pristupni broj AES67093.1). Može se pretpostaviti da su sve ove sekvence, sa izuzetkom *ccs* gena iz crvene paprike, identifikovane privremeno kao *ccs* samo na bazi homologije. Pored toga, ni kod jedne od navedenih biljnih vrsta, sa izuzetkom *C. annuum*, nikad nije dokazano da sintetišu i/ili akumuliraju kapsantin i kapsorubin. Stoga

je, do rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, samo *css* gen iz crvene paprike (*C. annuum*) sa sigurnošću bio kloniran i okarakterisan kao kapsantin-kapsorubin sintaza (Bouvier et al. 1994; Kumagai i sar., 1998; Mialoundama i sar., 2010).

U ovoj doktorskoj disertaciji planirano je kloniranje gena za CCS iz *L. lancifolium* koji se potencijalno može iskristiti za modifikovanje boje cvetova uopšte a pre svega cvetova perunike iz žute u nijanse crvene boje. Pretpostavka je da bi upotreba *Llccs* za genetičku transformaciju kultivara *I. germanica* sa žutim cvetovima, koji u svojim cvetovima akumuliraju anteraksantin i violaksantin, vodio ka konverziji ova dva žuta ksantofila u crvene  $\kappa$ -ksantofile, kapsantin i kapsorubin, a samim tim ka promeni boje cvetova iz žute u nijanse crveno-narandžaste i crvene boje.

Pored toga, interesantno je ispitati ektopičnu ekspresiju *Llccs* gena u drugim model sistemima za proučavanje modifikacije biosinteze karotenoida posebno kod dikotiledonih biljaka koje prirodno akumuliraju prekursore kapsantina i kapsorubina. Jedan od takvih model sistema je paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) u čijim cvetovima koji su prirodno žute boje dolazi do akumulacije velikih količina žutih ksantofila uključujući anteraksantin i violaksantin, koji su prekursori kapsantina i kapsorubina, dok prirodno ne dolazi do same njihove biosinteze. Ova značajna činjenica dovodi do uspostavljanja jednog novog model sistema za istraživanja mogućnosti za genetičku modifikaciju boje u cvetovima kroz ektopičnu ekspresiju gena *Llccs* (Zhu i sar., 2009). Biosinteza kapsantina i/ili kapsorubina u cvetnim delovima paradajza pokazala bi sve pogodnosti paradajza kao model sistema za genetički inženjering sa ciljem promene boje cvetova. Druge prednosti paradajza kao novog model sistema se ogleda i u njegovoj dobroj podložnosti genetičkim transformacijama preko *Agrobacterium*-posredovane transformacije. Treća, ne tako mala prednost je što paradajz ima kratak životni ciklus, naime biljci je potrebno kratko vreme do cvetanja pa se samim tim i brže vide rezultati same ekspresije gena. Ove prednosti čine paradajz idealnim sistemom za testiranje hipoteze da bi genetička transformacija biljnih vrsta sa žutim cvetovima koristeći *Llccs* gen trebala da vodi ka konverziji žutih ksantofila, anteraksantina i violaksantina, u crvene  $\kappa$ -ksantofile, kapsantin i kapsorubin, što bi dovelo do promene boje cvetova iz žute u nijanse crveno-narandžaste, a potencijalno i crvene boje (Zhu i sar., 2009).

## 2. CILJ

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je razvoj tehnologije zasnovane na genetičkom inženjeringu koja bi dovela do izmena biosintetičkog puta karotenoida što bi rezultiralo dobijanju novih boja cvetova, pre svega nijansi crvene boje kod *I. germanica* koje u prirodi ne postoje.

Za realizaciju zadanog cilja planirano je ostvarivanje nekoliko osnovnih zadataka:

1. Razvoj efikasnih protokola za genetičku transformaciju *I. germanica* upotrebom biolističke (bombardovanje mikroprojektilima) i metode transformacije pomoću *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Promena boje cvetova *I. germanica* L. genetičkom modulacijom karotenoidnog biosintetičkog puta putem ektopične ekspresije gena za fitoen sintazu (*crtB*) iz *Pantoea agglomerans*.
3. Kloniranje i funkcionalna karakterizacija gena za kapsantin-kasporubin sintazu (*Llccs*) iz tigrastog ljiljana (*Lilium lancifolium* Thunb. "Splendens").
4. Testiranje funkcije *Llccs* gena u kalusnim kulturama *I. germanica* L. i karakterizacija konsekventnih fenotipskih i biohemijskih promena.
5. Genetička modifikacija karotenoidnog biosintetičkog puta u biljkama paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) ektopičnom ekspresijom *Llccs* gena sa ciljem promene boje cvetova.

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

#### **3.1. BILJNI MATERIJAL I USLOVI RASTENJA *EX VITRO***

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćena su tri kultivara perunike (*I. germanica* L., ‘Skating Party’, ‘Fire Bride’ i ‘Hot Property’) dobijena kao poklon od Cooley’s Gardens Inc. (Silverton, OR, USA). Za razvoj biolističke (bombardovanje mikroprojektilima) i *Agrobacterium*-posredovane genetičke transformacije korišćen je kultivar ‘Skating Party’. Za genetičku transformaciju bakterijskim *crtB* genom i *Llccs* genom korišćeni su ‘Fire Bride’ odnosno kultivar ‘Hot Property’.

Za molekularno kloniranje gena za kapsantin-kapsorubin sintazu iz ljiljana, *Lilium lancifolium* ‘Splendens’ (bivši *L. tigrinum*), lukovice su nabavljene od Brent and Becky’s Bulbs (Gloucester, VA, USA) i gajene u stakleniku pod istim uslovima u kojima su gajenje perunike. Za proučavanje ekspresije gena nabavljene su lukovice *L. lancifolium* ‘Splendens’ od BulbsDirect.com i gajene u stakleniku na isti način kao ljiljani i perunike.

Za eksperimente genetičke transformacije paradajza, *Solanum lycopersicum* L. ‘Moneymaker’, korišćena su semena koja su nabavljena od Gourmet Seed Int.

Sve biljke su gajene u stakleniku sa fotoperiodom 16 sati dan / 8 sati noć, pri temperaturi od  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  za uslove dana i  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  za mrak. Biljke su odgajene u posudama od 4 L sa podlogom za rastenje sastavljenom od tri dela treseta, dva dela peska i jednog dela ilovače (v/v). U stakleniku, pored prirodnog osvetljenja obezbeđeno je dodatno osvetljenje sa natrijumovim sijalicama pod visokim pritiskom (Energy Technics, York, Pa.) što je obezbedilo gustinu fotonskog fluksa (PPFD) od 400 do 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Periodično, glavni izdanci perunika potpuno su skraćivani da bi se umanjila apikalna dominacija i pospešilo izbijanje mladih izdanaka. Tokom gajenja u uslovima staklenika, biljke su prihranjivane mineralnim đubrivom u kuglicama sa kontrolisanim oslobađanjem Nutricot-Type 100 sa N/P/K odnosom 16/4.4/8.3 (Chisso-Asahi Fertilizer Co., Ltd., Tokyo, Japan).

### 3.2. IN VITRO KULTURA

#### 3.2.1. HRANLJIVE PODLOGE ZA IN VITRO KULTURU

Sastav podloga korišćenih za uspostavljanje *in vitro* kultura perunike (*I. germanica*) i paradajza (*S. lycopersicum*) predstavljene su u **Tabeli 1.** (Wang i sar., 1999a; 1999b; Jeknić i sar., 1999; 2012).

**Tabela 1.** Hranljive podloge za gajenje u uslovima *in vitro* perunike (*Iris germanica* L.) i paradajza (*Solanum lycopersicum* L.).

Šifra	Proces	Komponente
<i>Iris germanica</i>		
MS-C	Indukcija i gajenje kalusa	Osnovna MS podloga (Murashige and Skoog, 1962) sa 5% saharoze, 0.3% fitagela, 290 mg L <sup>-1</sup> prolina, 1.1 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D, 0.2 mg L <sup>-1</sup> Kin, pH 5.9
MS-L	Gajenje ćelijskih suspenzija	MS-C podloga bez fitagela
MS-I	Indukcija izdanaka	Osnovna MS podloga sa 5% saharoze, 0.2% fitagela, 250 mg L <sup>-1</sup> prolina, 250 mg L <sup>-1</sup> kazein hidrolizata, 10 mg L <sup>-1</sup> pantotenske kiseline, 4.5 mg L <sup>-1</sup> niacina, 1.9 mg L <sup>-1</sup> tiamina, 3 mg L <sup>-1</sup> Kin i 0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA, pH 5.7
MS-D	Izduživanje i rastenje izdanaka	MS-I podloga bez Kin i NAA sa 0.3 mg L <sup>-1</sup> BA
MS-R	Ožiljavanje izdanaka	MS-C podloga bez regulatora rasteња
MS-Inf	Infekcija sa <i>A. tumefaciens</i>	Osnovna MS podloga sa 5% saharoze, 1% glukoze, 100 μM acetosiringona, pH 5.2
MS-C-AS	Kokultivacija sa <i>A. tumefaciens</i>	MS-C podloga sa 1% glukoze, 100 μM acetosiringona, pH 5.2
<i>Solanum lycopersicum</i>		
MS-G	Klijanje semena	Osnovna MS podloga (1/2) sa 1% saharoze, pH 5.7
MS-T	Prekultivacija i regeneracija	Osnovna MS podloga sa 3% saharoze, 0.1 mg L <sup>-1</sup> IAA i 1 mg L <sup>-1</sup> zeatina, pH 5.7

### **3.2.2. INDUKCIJA KALUSNIH KULTURA PERUNIKA**

Mladi izdanci perunike (5-10 cm) odsečeni su od matičnih biljaka i upotrebljeni kao inicijalni eksplantati za indukciju kalusnih kultura. Površinska sterilizacija biljnog materijala je izvršena na sledeći način: najpre su izdanci oprani pod tekućom vodom sve dok nisu uklonjeni svi tragovi prljavštine, a zatim ponovo oprani antibakterijskim tečnim sapunom. Izdanci su potom potopljeni u 70% etanol na 3 minuta i nakon toga u 1% rastvor natrijum hipohlorita sa Tween 20 (dve do tri kapi na 100 mL) i mučkani na šejkeru (100 obrt/min) 30 minuta. Tako tretirani uzorci su ispirani pet puta sterilnom vodom. Spoljašnji listovi su uklonjeni sa svakog izdanka a donji delovi (oko 15-20 mm) su odsečeni. Svaki sloj lista pažljivo je odvojen, isečen na delove širine od oko 3-5 mm i postavljen na MS-C hranljivu podlogu da bi se indukovalo formiranje kalusa. Eksplantati su gajeni u mraku na 25°C i prenošeni svake 3-4 nedelje na svežu MS-C hranljivu podlogu. Formirani kalusi su odvojeni od ostatka eksplantata i dalje gajeni takođe u mraku na 25°C. Ovi kalusi su prenošeni svake 3-4 nedelje na svežu MS-C hranljivu podlogu.

### **3.2.3. USTAVLJANJE I ODRŽAVANJE ĆELIJSKIH SUSPENZIJA**

Za uspostavljanje kultura ćelijskih suspenzija perunika, oko 1-2 grama rastresitog kalusa gajeno je u 250-mL Erlenmajeru sa 50 mL MS-L tečne hranljive podloge. Kulture su gajene u mraku na oko 20°C uz konstantno mešanje na šejkeru (100 obrt/min). Stabilne ćelijske suspenzije održavane su prenošenjem na svake 3-4 nedelje tako što je potpuno uklanjana stara tečna podloga pipetiranjem a zatim ćelijski pelet je deljen na dva dela i dodavanjem sveže hranljive podloge uspostavljene dve nove ćelijske kulture.

## **3.3. PROCEDURE ZA GENETIČKE TRANSFORMACIJE**

### **3.3.1. PROCEDURE ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU ĆELIJSKIH SUSPENZIJA I. GERMANICA**



### **3.3.1.1. BIOLISTIČKA TRANSFORMACIJA**

U svim eksperimentima za genetičke transformacije perunika korišćena je ćelijska suspenzija stara 3-4 nedelje predhodno filtrirana kroz filtre. Hranljiva podloga MS-L je potpuno uklonjena pipetiranjem a pelet ćelija je nanet u neprekidnom sloju na diskove filter papira (Whatman No. 1, 42.5 mm diameter) postavljenim u Petrijeve posude (60 x 15 mm) sa 10 ml MS-C čvrste hranljive podloge. Ćelije su bombardovane pAHC25 plazmidom (Christensen i Quail, 1996) upotrebom Biolistic PDS-1000/He (Particle Delivery System; Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Korišćen je plazmid pAHC25 koji sadrži reporter gen za  $\beta$ -glukuronidazu (*uidA*) i selekциони gen za fosfonitricin acetiltransferazu (*bar*) koji daje rezistentnost na herbicid Basta. Oba gena, *uidA* i *bar* su bili pod kontrolom promotora kukuruznog ubikvitina (*Ubi-1*) (Christensen i sar., 1992; Christensen i Quail, 1996). Selekcija stabilnih, integrativnih transformanata izvedena je na MS-C hranljivoj podlozi koja je bila obogaćena sa 10 mg L<sup>-1</sup> Basta.

Različiti parametri transformacije, uključujući pritisak helijuma, udaljenost mete, i vakuum komore, testirani su i optimizovani praćenjem detaljnih upitstva za rad koje je obezbedio proizvođač, Bio-Rad US/EG Bulletin (Lemaux i sar., 1996).

U cilju daljeg usavršavanja procedure biolističke transformacije testiran je efekat različitih koncentracija osmotikuma (ekvimolarne koncentracije sorbitola i manitola) na učestalost transformacije. Za tu svrhu ćelijske suspenzije su gajene na MS-L podlozi koja je bila obogaćena sa 0.1 M do 0.8 M osmotikuma i na šejkeru (100 obrt/min) 2 sata. Posle tretmana osmotocima tečna podloga je uklonjena, a ćelije su nanete u neprekidnom sloju na diskove filter papira postavljenim u Petrijeve posude (60 x 15 mm) sa 10 ml MS-C čvrste hranljive podloge koja je sadržavala odgovarajuće koncentracije osmotikuma. Sam postupak transformacije je bio kao što je predhodno opisan. Indukcija morfogeneze i ožiljavanje transgenih biljaka izvedeno je prema proceduri objavljenoj od strane Wang i sar., (1999a; 1999b). Učestalost dobijanja tranzientnih transformanata je određena histohemijskim bojenjem na GUS aktivnost a stabilni transformanti su potvrđeni PCR amplifikacijom GUS transgena.

### **3.3.1.2. RAZVOJ PROCEDURE ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU POSREDOVANU *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

### **3.3.1.2.1. SELEKCIJA SOJA *AGROBACTERIUM***

U preliminarnim studijama testirane su tri kombinacije *A. tumefaciens* soj/binarni vektor da bi se identifikovala ona kojom se postižu najviše stope transformacije. Testirane su sledeće kombinacije: LBA4404 (nosi pTOK233), LBA4404 (nosi pCAMBIA1201), i EHA105 (nosi pCAMBIA1201). Soj *A. tumefaciens* LBA4404 koji nosi super-binarni vektor pTOK233 dobijen je od Tobacco Inc., Shizuoka, Japan (Hiei i sar., 1994). pCAMBIA1201 binarni vektor (CAMBIA, Canberra City, Australia) je transformisan u *A. tumefaciens* LBA4404 (Hoekema i sar. 1983) i EHA105 (Hood i sar., 1993) upotrebom hemijske procedure koju su opisali Walkerpeach i Velten, (1994). Oba vektora nose gene tj. ekspresione kasete za rezistenciju na higromicin (CaMV 35S::*hpt*::T35S) i intronom prekinut GUS gen (CaMV 35S::*uidA*::TNOS). Pored toga, pTOK233 takođe sadrži gen za rezistenciju na geneticin (PNOS::*nptII*::TNOS).

### **3.3.1.2.2. TESTIRANJE RAZLIČITIH SELEKCIJONIH AGENASA**

U dosadašnjim istraživanjima nema podataka o pogodnim agensima za selekciju stabilnih transformanata koji bi mogli biti korišćeni za genetičke transformacije perunike. U cilju određivanja efikasnosti nekoliko agenasa često korišćenih za selekcionisanje transformisanih ćelija kod drugih biljnih vrsta testirali smo pet antibiotika: metotreksat, higromicin, geneticin (G418), gentamicin i fleomicin, tri herbicida: glifosat [N-(fosfonometil) glicin] (Monsanto, St. Louis, MO, USA), hlorsulfuron (2-chloro-N-[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonyl] benzenesulfonamide; E.I. Du Pont de Nemours & Co., Inc., Agricultural Products Dept., Wilmington, DE, USA) i glufosinat-amonijum (Basta; Hoechst Canada, Inc., Regina, Saskatchewan, Canada) i jedan analog amino kiseline (4-metil-triptofan; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Ovi agensi odabrani su zbog toga što su klonirani geni koji daju rezistentnost na ove supstance (Schrott, 1995).

Efikasnost svakog selekcionog agensa procenjivana je na osnovu njegove sposobnosti da spreči deobu i rastenje netransformisanih ćelija perunike na podlogama koje sadrže povišene koncentracije selekcionog agensa. Sama procedura selekcije je bila sledeća: tečna MS-L podloga je uklonjena iz ćelijske suspenzije stare 3 nedelje, a

ćelijski agregati su zatim naneti na diskove filter papira u Petrijeve posude (60 x 15 mm) koje su sadržale MS-C hranljivu podlogu obogaćenu sa različitim koncentracijama selekcionog agensa. Kulture su gajene u mraku pri temperaturi od 25°C, a formirani kalus je izmeren posle 3 nedelje gajenja a zatim izračunat prirast sveže mase kalusa. Povećanje mase kalusa je izraženo kao relativno povećanje mase u odnosu na kontrolne uzorke kojima nije dodat selekциони agens. Prosečna vrednost za ispitivanje svakog selekcionog agensa je dobijena na osnovu pet kultura.

### **3.3.1.2.3. TRANSFORMACIJA ĆELIJA PERUNIKE GAJENIH U TEČNOJ PODLOZI POSREDOVANA SA *A. TUMEFACIENS***

Za razvoj *A. tumefaciens* posredovane metode genetičke transformacije perunika *I. germanica* 'Skating Party' upotrebljen je soj *A. tumefaciens* LBA4404 koji nosi superbinarni vektor pTOK233. *A. tumefaciens* je kultivisan 3 dana na čvrstoj AB podlozi (Chilton i sar., 1974) koja sadrži 50 mg L<sup>-1</sup> higromicina i 50 mg L<sup>-1</sup> kanamicina, na 28°C. Bakterije su skupljene špatulom a zatim ponovo rastvorene u AAM podlozi (Hiei i sar., 1994) da bi se dobila apsorbancija od oko 1.8 na 600 nm. Za eksperimente transformacije korišćene su tri nedelje stare kulture perunika kultivisane na MS-L podlozi. MS-L podloga je uklonjena iz ćelijskih kultura pipetiranjem a suspenzija *A. tumefaciens* (25 mL) je pripremljena kao što je gore navedeno i dodata peletu formiranom od ćelijskih suspenzija. Erlenmajer sa ćelijskom suspenzijom perunike i bakterijama je zatim lagano promućkan. Posle pet minuta, tečna faza je uklonjena a ćelije zasejane na MS-C-AS podlogu i gajene u mraku 3 dana pri temperaturi od 25°C.

Genetička transformacija *I. germanica* 'Fire Bride' sa *crtB* genom i *I. germanica* 'Hot Property' sa *Llccs* genom izvedena je kao što je gore navedeno, ali sa manjim modifikacijama. Ukratko, soj *A. tumefaciens* LBA4404 transformisan je svakim plazmidom u hemijskoj reakciji kao što je opisano kod Walkerpeach i Velten, (1994). Bakterije *A. tumefaciens* su gajene preko noći na YEP podlozi koja sadrži 100 mg L<sup>-1</sup> spektinomicina i 300 mg L<sup>-1</sup> streptomicina na 28°C u šejkeru na 250 obrt/min. Bakterije su peletirane centrifugiranjem i resuspendovane u MS-Inf podlozi dva puta većoj od originalne. *A. tumefaciens* je gajen u ovoj podlozi 1 do 2 sata na 100 obrt/min pre transformacije, radi indukovanja *vir* gena. Postupak transformacije ćelija iz ćelijske

suspenzije urađen je kao što je predhodno opisano. Selekcija transgenih ćelijskih agregata *I. germanica* 'Fire Bride' i *I. germanica* 'Hot Property' urađena je na hranljivoj podlozi koja je sadržala 10 mg L<sup>-1</sup> higromicina. Binarni vektor pWBVec10a nosi GUS marker gensku expresionu kasetu (CaMV 35S::uidA::TNos) i gensku kasetu za rezistenciju na higromicin (PUBi1::hpt::TNos) sa T-DNA graničnicima. Oba gena sadrže intron koji sprečava njihovu ekspresiju u *A. tumefaciens* u kome se intronski spojevi ne javljaju (Wang i sar., 1998).

#### **3.3.1.2.4. SELEKCIJA TRANSFORMANATA**

Selekcija stabilnih transformanata *I. germanica* 'Skating Party' tokom razvoja protokola za *A. tumefaciens* posredovanu transformaciju urađena je na sledeći način: 3 dana nakon kultivacije, ćelije su prikupljene špatulom i dobro isprane sterilnom vodom koja sadrži 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima (Claforan; Hoechet-Roussel Pharmaceuticals, Inc., Somerville, NJ, USA). Jedna polovina ispranih ćelija naneta je na MS-C podlogu koja je sadržala 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i 50 mg L<sup>-1</sup> higromicina, a druga polovina na MS-C podlogu koja sadrži 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i 50 mg L<sup>-1</sup> geneticina, nakon čega su ćelije gajene 3 nedelje u mraku na 25°C. Agregati ćelija koji su formirani na ovim selektivnim podlogama dalje su gajeni na drugoj selektivnoj podlozi (MS-C obogaćenoj sa 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i ili 100 mg L<sup>-1</sup> higromicina ili 100 mg L<sup>-1</sup> geneticina), a zatim gajene još 3 nedelje pod istim uslovima. Ekspresija GUS reporter gena ispitana je kod agregata ćelija koji su nastavili sa rastom na drugoj selektivnoj podlozi. Indukcija regeneracije biljaka je rađena samo iz onih agregata koji su bili pozitivni u testiranju na GUS aktivnost. GUS pozitivni agregati su preneti pojedinačno u male Petrijeve posude (60 x 15 mm) sa 10 mL MS-I podloge koja je sadržala 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i ili 50 mg L<sup>-1</sup> higromicina ili 50 mg L<sup>-1</sup> geneticina i gajeni sledeće 3 nedelje u mraku na 25°C. Agregati ćelija koji su ispoljili vidljive morfogenetske promene koje vode formiranju primordija izdanaka selektovani su i dalje gajeni na MS-D hranljivoj podlozi koja je bila obogaćena sa 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i 50 mg L<sup>-1</sup> higromicina ili 50 mg L<sup>-1</sup> geneticina. Kulture izdanaka su gajene u Magenta GA-7 posudama (Sigma) sledeće 2 do 3 nedelje na 23°C sa fotoperiodom od 16 sati dan, 8 sati noć sa PPFD 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, što je obezbeđeno fluorescentnim lampama sa hladnim svetlom. Osvetljenje je mereno na

vrhu Magenta GA-7 posuda kvantnim radiometrom/fotometrom (LI-189; LICOR, Inc., Lincoln, NE, USA). Izdanci i biljčice perunika su dalje gajene na MS-D podlozi bez selekcionih agenasa, da bi se obezbedilo dalje rasteenje tokom još 2 do 3 nedelje. Izdanci i biljčice su potom gajeni na MS-R hranljivoj podlozi, bez regulatora rasteenja, u Magenta GA-7 posudama, radi indikcije i razvića korenova. Kulture su prenošene svake druge nedelje na svežu hranljivu podlogu. Potpuno formirane biljčice transgenih perunika (dužine 4-6 cm) preneti su dalje na gajeenje u uslove staklenika. Biljke su posađene u supstrat za gajeenje koji je sadržao 3 dela treseta, 2 dela peska i 1 deo ilovače (v/v) u posudama od 250-mL. Biljke su aklimatizovane u kontrolisanim uslovima (na policama navodnjavanim izmaglicom, „mist bench“) sa relativnom vlažnošću vazduha 95-98%. Četiri do pet nedelja kasnije biljke su premeštene na obične police i prihranjivane sa mineralnim đubrivom u sistemu sa kontrolisanim otpuštanjem korišćenim i za netransformisane biljke.

Selekcija stabilnih *crtB* transformanata *I. germanica* ‘Fire Bride’ i *Llccs*-transformanata *I. germanica* ‘Hot Property’ obavljena je na MS-C hranljivoj podlozi koja je bila obogaćena sa 250 mg L<sup>-1</sup> Timentin i 10 mg L<sup>-1</sup> higromcina. Aklimatizacija biljaka neposredno posle sađenja obezbeđena je pokrivanjem cele biljke Magenta GA-7 posudama tokom 2-3 dana, da bi se obezbedila visoka vlažnost vazduha, a potom postepenim otkrivanjem tokom još 3-5 dana u cilju postepenog smanjenja vlažnosti vazduha. Nivo vode u posudama u kojima su gajene biljke održavan je na 3-4 cm dubine tokom perioda aklimatizacije.

### **3.3.2. GENETIČKA TRANSFORMACIJA PARADAJZA**

Protokol za genetičku transformaciju je generalo ponovljen prema proceduri opisanoj od strane Park i sar., (2004). Oko 200 semena paradajza (*Solanum lycopersicum* L. ‘Moneymaker’) prvo je sterilisano ispiranjem 70% etanolom (5 min) a potom u 20% rastvorom za izbeljivanje u koji je dodat Tween 20 (1 kap/100 mL, 15 min). Semena su zatim dobro isprana sterilnom ddH<sub>2</sub>O, preneti u Magenta GA-7 kutije sa MS-G hranljivom podlogom i gajena na 4°C sedam dana da bi se obezbedilo ujednačeno klijanje. Nakon tog perioda, Magenta GA-7 kutije prenete su u komoru za rasteenje na 20°C sa fotoperiodom od 16 sati dan/8 sati mrak (PPFD 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) sa

fluorescentnim lampama punog spektra sve dok klijanci nisu dostigli dužinu od ~7 cm. Hipokotili klijanaca su isečeni u delove dužine oko 0.5 cm i dva dana predkultivisani na MS-T podlozi. *A. tumefaciens* LBA4404 je transformisan pWBVec10a/E35S-PchsA::Llccs::TNos plazmidom u predhodno opisanoj hemijskoj reakciji prema Walkerpeach i Velten, (1994). Nakon infekcije sa *A. tumefaciens*, kokultivisanjem tokom 2 dana u mraku, delovi hipokotila klijanaca paradajza su selektovani na MS-T hranljivoj podlozi koja je sadržala 2 mg L<sup>-1</sup> higromicina. Stabilni transformanti su potvrđeni histohemijskim bojenjem na GUS aktivnost kao što je dole opisano.

### **3.4. POTVRDA TRANSFORMACIJE**

#### **3.4.1. HISTOHEMIJSKI ESEJ NA GUS AKTIVNOST**

Histohemijski GUS eseji su urađeni prema proceduri opisanoj u Jefferson, (1987). GUS rastvor za bojenje je pripreman svež pre svake upotrebe [0.1 M natrijum fosfatni pufer pH 7.2, 5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 10 mM EDTA, 20% metanol (v/v), 0.01% Triton X-100 (v/v) i 1 mg mL<sup>-1</sup> x-Gluc (5-bromo-4-hloro-3-indolil-beta-D-glukuronska kiselina cikloheksilamonijum so)]. Da bi se odredila učestalost dobijanja transformanata za biolističku transformaciju, diskovi filter papira sa ćelijama perunike postavljani su u male Petrijeve posude, dodavan je 1 mL GUS rastvora za bojenje. Posude sa uzorcima su zatvarane Parafilmom i inkubirane tokom noći na 37°C, pre nego što je zabeležena GUS aktivnost.

Da bi se odredila učestalost dobijanja transformanata posle *A. tumefaciens* posredovane transformacije, ćelije perunike su prikupljene špatulom 3 dana nakon kokultivacije sa *A. tumefaciens* i dobro isprane sa 0.1 M natrijum fosfatnim puferom (pH 7.2) da bi se uklonile bakterije sa površine. Ćelije su nanete na filter papir u male Petrijeve posude, gde je dodat 1 mL GUS rastvora za bojenje i posude su zatim inkubirane na isti način kako je već opisano. Da bi se utvrdili GUS pozitivni agregati ćelija posle gajenja na drugoj selektivnoj podlozi korišćen je mali deo svakog agregata (3 do 4 mm u prečniku) postavljen na filter papir u male Petrijeve posude i GUS bojenje je urađeno kao što je opisano. Morfogenetske strukture (globularne strukture nalik na somatske embrione i/ili primordije izdanaka) takođe su testirane i bojene sa ciljem

utvrđivanja GUS aktivnosti. Uzorci tkiva su preneti u epruvete za mikrocentrifugu u 100  $\mu\text{L}$  rastvoru za bojenje, infiltrirani pod vakuumom 10 minuta i bojeni tokom noći pri temperaturi od 37°C. Hlorofil iz zelenih listova je odstranjen višestrukim ispiranjem 95% etanolom pre nego što su konačni rezultati dobijeni.

### **3.4.2. DETEKCIJA NPTII AKTIVNOSTI *IN VIVO***

Funkcionalni esej za NPTII („test izbeljivanja listova“ eng. „leaf-bleach assay“) obavljen je isključivo da bi se testirale potencijalno transgene biljke tokom razvijanja *A. tumefaciens* posredovane metode transformacije perunika. Da bi se testirala funkcionalna ekspresija NPTII u transformisanim perunikama, test izbeljivanja listova je rađen prema proceduri opisanoj u radu Cheng i sar., (1997) sa manjim modifikacijama. Esej je urađen sa delovima drugog najmlađeg lista transformisanih i netransformisanih biljaka koje su mesec dana bile gajene u uslovima staklenika. Isečeno je ukupno četiri dela (oko 7 mm) lista od svake biljke. Jedan isečak lista je stavljen u 1 mL rastvora koji sadrži 25 mg  $\text{L}^{-1}$  fungicid benomil [methyl 1-(butilkarbamoil)-2 benzimidazolekarbamat] (Hi-Yield Chem. Co., Bonham, Texas) i 0.01% Triton X-100 (Sigma) u mikrotitar pločama sa 24 udubljenja kao kontrola. Svaki od preostala tri isečka lista stavljen je u 1 mL istog rastvora sa dodatkom 50, 100 odnosno 200 mg  $\text{L}^{-1}$  paromomicina (Sigma). Uzorci lista iz netransformisane perunike sličnog razvojnog stadijuma korišćeni su kao negativna kontrola. Uzorci su infiltrirani pod vakuumom 10 minuta i posude su zatim zatvorene sa Parafilmom i inkubirane 5 dana na 23°C pri fotoperiodu od 16 sati dan/8 sati mrak sa PPFD 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  što je obezbeđeno fluorescentnim lampama sa hladnim svetlom.

### **3.4.3. DETEKCIJA TRANSGENA PCR METODOM**

Pored GUS eseja i sposobnosti transformanata da rastu na selektivnoj podlozi, stabilna integracija transgena u potencijalno transgenim biljkama potvrđena je i PCR amplifikacijom odgovarajućeg transgena. U eksperimentima biolističke transformacije, da bi se potvrdila stabilna integracija ovih transgena, urađena je PCR amplifikacija fragmenta *uidA* (GUS) gena dužine 250bp upotrebom seta prajmera prema Gould i sar.,

(1991). Ciklusi amplifikacije su izvedeni na GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) pod sledećim uslovima: početna denaturacija, 94°C / 45s; denaturacija, 94°C / 45s; vezivanje prajmera, 60°C / 45s; ekstenzija, 72°C / 2 min. Posle 35 ciklusa amplifikacije, finalna ekstenzija je izvedena na temperaturi od 72°C tokom 10 minuta. Plazmid pAHC25 koji nosi *uidA* gen korišćen je kao pozitivna kontrola a genomski DNK iz netransformisanih perunika kao negativna kontrola. Amplifikovana DNK je razdvojena elektroforezom u 1.5% agarozu gelu. Veličina amplifikovanog fragmenta je određena korišćenjem 1 Kb i 100 bp ladera (Gibco BRL).

**Tabela 2.** Prajmeri upotrebljeni za kloniranje gena za fitoen sintazu (CRTB) iz *Pantoea agglomerans* i promotorskog regiona (PLlccs) gena za kapsantin-kasporubin sintazu (LICCS) iz *Lilium lancifolium*. Pored toga, prikazani su i prajmeri upotrebljeni za ispitivanje ekspresije *crtB* gena RT-PCR metodom u transgenim biljkama *Iris germanica* ‘Fire Bride’.

<b>Prajmer</b>	<b>Sekvenca (5' → 3')</b>
crtB-F	CCAATGCATATGAGCCAACCGCCGCTGCTTGACC
crtB-R	ACTGAGCTCCTAAACGGGACGCTGCCAAAGACC
PLlccs-F	AAGCTTGAATTCGCAGCAAACCATGAACCTTTG
PLlccs-P	CTCTACCACTCCAGTCCAACCTCTAGA
E-crtB-F	TCTGATGATGGCCAGGGTGA
E-crtB-R	TAAACGGGACGCTGCCAAAG
E-18S-F	TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
E-18S-R	CAACTTGCGTTCAAAGACTCGATG

Stabilna integracija *crtB* transgena u genomu *I. germanica* ‘Fire Bride’ je potvrđena PCR analizom upotrebom E-crtB-F i E-crtB-R prajmera (**Tabela 2**). Stabilna integracija *crtB* gena takođe je funkcionalno potvrđena izvođenjem studija ekspresije gena metodom RT-PCR kao što je opisano u poglavlju 3.5. Integracija *Llccs* transgena u genom *I. germanica* ‘Hot Property’ potvrđena je PCR metodom upotrebom Llccs-F i Llccs-R prajmera (**Tabela 3**). Uslovi za PCR amplifikaciju *crtB* i *Llccs* gena bili su sledeći: početna denaturacija na 95°C / 3 min, praćena sa 33 ciklusa trostepene PCR (95°C / 30 s, 60°C / 30 s, 72°C / 1 min) i finalna ekstenzija na 72°C tokom 7 min, sa GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polymerase (0.625 units) u Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (Promega,



Madison, WI). PCR amplifikacija je izvedena u Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

**Tabela 3.** Prajmeri upotrebljeni za kloniranje i ispitivanje ekspresije likopen  $\beta$ -ciklaze (*LlcyB*) i kapsantin-kapsorubin sintaze (*Llccs*) iz *Lilium lancifolium* 'Splendens'.

Prajmer	Sekvenca (5' → 3')
Cs-F	TGGAGTTTGGGTTGATGAGT
Cs-R	TGGGAATCTCTCCAATCCAT
ccs-3Rc	TCTGGATAAGATGCTCTTCATGGATTGGAG
ccs-In	ATGCCAATACCTCGGTTCCAGA
ccs-Out	CTCTTCCAAGACGCATGAGCAA
Llccs-F	GGATCCACCGTCCAGCCGCCTCCTTG
Llccs-R	GGATCCATGTGAATTGCATTATATAA
leyB-3Rc	AGAAGAGACTTCTTTGGTTGCTC
leyB-In	TCTCCAATCCATGAAGAGCATCTTATCCAG
leyB-Out	GCCGAGCAACCAAAGAAG
P-ccs-R1	CAGCGGACCTCCCATTGGAAACAAACACTT
P-ccs-R2	TTGGAATAGCAGCGTTGTGAGCACGGTGTT
P-ccs-F1	ATTGGCATGGGTTTATGTCGTCGAGGCTGT
P-ccs-F2	GATGTTGTGACCAAGTGCCCTTTGCCTTTG
L-Llccs-F	GGATCCGAATTCGCAGCAAACCATGAACCTTTG
L-Llccs-R	CTGCAGATTAAGATATGTTTCGTGAT
E-Llccs-F	CTCCTCCGCCACCGCTAC
E-Llccs-R	CGGAGCAGGAGACGGAGGAG
E-LlcyB-F	GGGATTCTCGCTGAGGTGGAA
E-LlcyB-R	CCCAAAGGCCATGGTCAGA
E-LhAct-F	ATGTATGTTGCAATCCAGGCTGTGC
E-LhAct-R	ATACCAGTAGCTTCCATTCCAACCA

#### 3.4.4. DETEKCIJA INTEGRACIJE TRANSGENA SOUTHERN BLOT HIBRIDIZACIJOM

Southern blot analize vršene su radi testiranja potencijalno transgenih biljka na stabilnost integracije transgena (*uidA* i *hpt*) tokom razvoja *A. tumefaciens* posredovane metode transformacije perunika. DNK je ekstrahovana iz 4 g mladih listova transformisanih perunika po protokolu objavljenom u radu Rawson i sar., (1982) modifikovanom po Davis i sar., (1998). Tkivo listova je homogenizovano u 40 mL ekstrakcionog pufera (100 mM Tris, 25 mM EDTA, 0.35 M saharoze, 50 mM KCl, 5% polivinilpirolidona, 10 mM diethildithiokarbaminske kiseline i 0.2% merkaptoetanolu) u Waring 250-mL blenderu od nerđajućeg čelika u trajanju od 15 sekundi. Homogenat je filtriran kroz gazu i centrifugiran na 12000 g 20 min (4°C). Pelet je resuspendovan u 6 mL pufera za lizu (100 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl; pH 8.0; 2.5% Triton X-100, 2% sarkosyl, 50 µg mL<sup>-1</sup> Proteinase K) i inkubiran 2 sata na 37°C u komori na mešalici. Lizat je zatim centrifugiran na 15000 g 10 min (4°C), a nukleinske kiseline u supernatantu su istaložene sa 2/3 volumena izopropanolana –20°C 30 min. Precipitat je peletiran centrifugiranjem na 20000 g u trajanju od 15 min pri temperaturi od 4°C. Pelet je zatim resuspendovan u TE puferu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) a DNK je dodatno prečišćena u CsCl gradijentu kao što je opisano u radu Rawson i sar., (1982). DNK uzorak je precipitiran, ispran u 70% etanolu i resuspendovan u TE puferu u koncentraciji od 1 µg µL<sup>-1</sup>.

Southern blot analiza je izvedena prema proceduri opisanoj od strane Sambrook i sar., (1989). Ukratko, metod uključuje digestiju genomske DNK sa *HindIII*, razdvajanje fragmenata DNK u 0.8% agaroznom gelu 20 µg po bunarčiću, a zatim prenošenje na najlonske membrane (Zetaprobe, Bio-Rad). Na isti način pripremljeni blotovi su označeni radioaktivno obeleženim fragmentom *uidA* (GUS) ili *hpt* DNK. Fragment od 250-bp u regionu koji kodira GUS i 608-bp fragment u regionu koji kodira *hpt* su amplifikovani PCR metodom prema proceduri opisanoj u radovima Gould i sar., (1991) odnosno Abedinia i sar., (1997). Fragmenti amplifikovani PCR metodom su obeleženi sa [<sup>32</sup>P]dCTP slučajnim prajmiranjem i korišćeni kao probe (Feinberg i Vogelstein, 1983). Blotovi su najpre isprani u uslovima slabije rigidnosti (2X SSC, 0.1% SDS) dva puta na 65°C (30 min svaki) a zatim isprani dva puta (30 min svaki) pri

srednjoj rigidnosti (0.5X SSC, 0.1% SDS) na 65°C. Blotovi su autoradiografisani uz korišćenje pojačavajućeg ekrana na -85°C u trajanju od 5 dana.

### **3.5. ANALIZA EKSPRESIJE GENA**

Ekspresija *Llccs* i *LlleyB* gena kod *L. lancifolium* i *crtB* gena kod transgenih *I. germanica* 'Fire Bride' biljaka analizirana je metodom RT-PCR. Za ekspresiju *crtB* ukupna RNK je izolovana iz različitih delova cvetova: standarda, folova, tučkova, plodnika, prašnika, cvetnih drški, listova i rizoma kontrolnih biljaka i *crtB* transgenih biljaka upotrebom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) prema uputstvima proizvođača. Koncentracija i čistoća RNK određene su merenjem apsorbance na 260 ( $A_{260}$ ) i 280 nm ( $A_{280}$ ) sa Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). RNK uzorci su zatim tretirani sa DNase I (Promega) prema uputstvima proizvođača i purifikovani sa RNeasy Plant Mini Kit prateći protokol za purifikaciju RNK. Krajnja koncentracija RNK određena je kao što je predhodno opisano. Za RT-PCR analizu, 1 µg ukupne RNK upotrebljen je kao matrica za sintezu prvog lanca cDNK pomoću Omniscript® Reverse Transcription kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Prajmeri korišćeni za RT-PCR analizu *crtB* (E-*crtB*-F i E-*crtB*-R) i gen za 18S rRNK (E-18S-F i E-18S-R) dati su u **Tabeli 2**. PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima: početna denaturacija na 95°C / 3 min, nakon toga 33 ciklusa trostepene PCR (95°C / 30 s, 60°C / 30 s, 72°C / 1 min) i finalna ekstenzija na 72°C / 7 min upotrebom GoTaq® Hot Start Polymerase (0.625 units) sa Green GoTaq® Flexi Buffer. PCR amplifikacija je izvedena u Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700.

Analiza ekspresije *Llccs* i *LlleyB* gena urađena je u cvetnim pupoljcima, potpuno otvorenim cvetovima i listovima *L. lancifolium*. Analizirani su pupoljci koji su radi lakše analize podeljeni u četiri razvojna stadijuma na osnovu dužine pupoljaka: stadijum P1 (3-4 cm), stadijum P2 (5-6 cm), stadijum P3 (7-8 cm) i stadijum P4 (duži od 9 cm, **Slika 20a**). Spisak prajmera koji su korišćeni za RT-PCR analizu *Llccs* (E-*Llccs*-F i E-*Llccs*-R), *LlleyB* (E-*LlleyB*-F i E-*LlleyB*-R), i gen za aktin (E-*LhAct*-F i E-*LhAct*-R) prikazani su u **Tabeli 3**. Uslovi za PCR bili su kao što je predhodno navedeno za *crtB* gen.

Analiza ekspresije *Llccs* transgena u cvetovima paradajza (kruničnim listićima i prašnicima) i listovima netransformisanih i *Llccs*-transgenih biljaka izvršena je kao što je predhodno opisano za *crtB* gen kod perunika. Prajmeri korišćeni za analizu *Llccs* gena (E-*Llccs*-F i E-*Llccs*-R) i gena za ubikvitin (E-*Ubi3*-F i E-*Ubi3*-R) prikazani su u **Tabeli 4.**

**Tabela 4.** Prajmeri korišćeni za kloniranje i pakovanje različitih elemenata E35S-PchsA:*Llccs*:TNos ekspresione kasete u pWBVec10a binarni vektor. Pored toga, u tabeli su prikazani prajmeri korišćeni za analizu ekspresije pomoću RT-PCR metode gena za kapsantin-kapsorubin sintazu (*Llccs*) iz ljiljana (*L. lancifolium*) u biljkama transgenog paradajza.

Prajmer	Sekvenca (5' → 3')
E35S-F	AAGCTTGAATTCATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGG
E35S-R	CTGCAGATCGATATCACATCAATCCACTTGCTTTGAA
P-chsA-Fbz	ATCGATATGCAAGAACGTCAAGGCCATTCAT
P-chsA-Rbz	CATCTAGACTTGAAAAAGTTTGGTATTT
E- <i>Llccs</i> -F	CTCCTCCGCCACCGCTAC
E- <i>Llccs</i> -R	CGGAGCAGGAGACGGAGGAG
E- <i>Ubi-3</i> -F	GAAAACCCTAACGGGGAAGA
E- <i>Ubi3</i> -R	GCCTCCAGCCTTGTTGTA

### 3.6. PROCEDURE ZA KLONIRANJE I FUNKCIONALNU KARAKTERIZACIJU GENA

#### 3.6.1. MOLEKULARNO KLONIRANJE *LlcyB* I *Llccs* GENA

Ukupna RNK izolovana je iz perijanta narandžastih cvetnih pupoljaka *L. lancifolium* TRIzol<sup>®</sup> reagensom (Invitrogen, Carlsbad, CA) ili RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) prema uputstvima proizvođača. Prvi lanac cDNK sintetisan je pomoću MMLV reverzne transkriptaze (Promega) takođe prema preporukama proizvođača.

Strategija korišćena za kloniranje *LlcyB* i *Llccs* gena sastojala se na prvom mestu u pokušaju amplifikacije dela *LlcyB* gena smeštenog između dva susedna

homologna regiona u *lcyB* iz različitih vrsta i *ccs* gena paprike PCR metodom upotrebom različitih nedegenerisanih prajmera. Fragment DNK (oko 400 bp) gena *LlcyB* uspešno je amplifikovan upotrebom forward (Cs-F) i reverznog (Cs-R) prajmera (**Tabela 3**). Određeni broj prajmera je napravljen na osnovu ove sekvence i upotrebljen za kloniranje 5' i 3' krajeva kako *LlcyB* gena tako i visoko homolognog *Llccs* gena upotrebom RACE pristupa. RACE procedure su izvedene upotrebom FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE Kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA) prema preporukama proizvođača. Lista prajmera korišćenih za kloniranje *Llccs* i *LlcyB* gena i njihovih sekvenci prikazana je u **Tabeli 3**.

Kloniranje *LlcyB* gena postignuto je tako što je najpre kloniran 3' kraj pomoću forward prajmera *lcyB-3Rc* gena u kombinaciji sa 3'-spoljašnjim prajmerom iz RACE kita. Nakon kloniranja i sekvenciranja gena dizajniran je par ugnježdenih prajmera (*lcyB-Out* i *lcyB-In*) na bazi novonastale sekvence i upotrebljen je za 5' RACE da bi se klonirao 5' deo gena.

Kloniranje *Llccs* postignuto je pomoću forward prajmera *ccs-3Rc* gena u kombinaciji sa 3'-spoljašnjim prajmerom iz RACE kita. Nakon kloniranja i sekvenciranja dizajniran je par ugnježdenih prajmera (*ccs-Out* i *ccs-In*) na bazi novoklonirane sekvence i upotrebljen je za 5' RACE i identifikaciju 5' kraja gena.

### **3.6.2. KLONIRANJE PROMOTORSKOG REGIONA *LLCCS* GENA**

Uzvodni promotorski region *Llccs* gena (GenBank broj GU443955) kloniran je pomoću Long Distance Inverse-PCR (LDI-PCR) kao što su opisali Willis i sar., (1997) u svom radu uz određene modifikacije. Ukupna genomska DNK ekstrahovana je iz mladih novoisklijalih listova ljljana pomoću DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Određeni alikvoti genomske DNK (1 µg) su posebno digerirani različitim restrikcionskim enzimima, uključujući *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*, *SpeI*, *AvrII*, *XmaI*, *PstI*, *Sall* i *SphI*. Digeracija je nastavljena preko noći u vodenom kupatilu na 37°C. Da bi se uklonila rezidualna enzimska aktivnost svi uzorci su procesuirani sa QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kako je opisano u protokolu QIAquick PCR Purification Kit. Uzorci su eluirani sa 250 µl TE pufera da bi se obezbedio maksimalan prinos fragmenata DNK. Fragmenti DNK su zatim tokom noći povezani (cirkularizovani) u

ukupnom volumenu od 500  $\mu$ l sa 12 jedinica T4 DNK ligaze (Invitrogen) pri temperaturi od 15 °C. Ligitana DNK je purifikovana sa QIAprep Spin Miniprep Kit i eluirani sa 50  $\mu$ l EB pufera. Prva PCR amplifikacija urađena je pod sledećim uslovima: početna denaturacija pri 94°C / 1 min, zatim 30 ciklusa dvostepene PCR pri 98 °C / 10 sec i 68°C / 6 min i finalna ekstenzija pri 68°C / 7 min sa Hot Start *ExTaq-HS* Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd., Japan). Reakciona smeša (25  $\mu$ l) je sadržavala 1  $\mu$ l ligitane DNK (otprilike 20 ng). Produkt prve PCR (1  $\mu$ l) je reamplifikovan u 30 ciklusa sa ugnježenim prajmerima pod istim uslovima. Da bi se verifikovali rezultati LDI-PCR 5-10  $\mu$ l svakog produkta PCR je frakcionisan elektroforezom u agarozu gelu (0.8% agaroze).

Fragmenti DNK od značaja ekstrahovani su i klonirani u pGEM T-Easy vector (Promega) a zatim sekvencirani. Setovi forward (P-ccs-F1 i P-ccs-F2) i reverznih (P-ccs-R1 i P-ccs-R2) ugnježenih prajmera upotrebljenih u LDI-PCR prikazani su u **Tabeli 3**. Nakon sekvenciranja dizajniran je par prajmera (L-Llccs-F i L-Llccs-R) da bi se amplifikovao kompletan genomski *Llccs* klon tj. *Llccs* lokus. Prajmeri su bili dizajnirani tako da omoguće uvođenje *BamHI* i *EcoRI* restrikcionih mesta na 5' kraju i *PstI* restrikcionog mesta na 3' kraju *Llccs* lokusa. *Llccs* lokus je kloniran u pGEM T-Easy vektor i potvrđen sekvenciranjem.

### **3.6.3. MANIPULACIJA SA DNK I BIOINFORMATIČKE ANALIZE**

DNK fragmenti su ekstrahovani iz gela standardnim ili MinElute QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN). Amplifikovani PCR produkti su subklonirani u pGEM T-Easy vektor, a DNK sekvenciranje je urađeno u Central Service Laboratory u Center for Genome Research and Biocomputing, Oregon State University, Corvallis, OR. The ORF Finder (Open Reading Frame Finder) alat at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) je korišćen za predviđanje ORF u okviru novokloniranih sekvenci.

Molekulske mase i teoretske izoelektrične tačke pretpostavljenih proteina izračunate su u ExpASY Bioinformatics Resource Portal koristeći Compute pI/Mw alat ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/>

services/TargetP/) je upotrebljen da bi se pronašla NH<sub>2</sub> terminalna sekvenca tranzitnog peptida (TP).

Analize homologije nukleotida i izvedenih aminokiselinskih sekvenci urađene su pomoću Probabilistic Consistency-based Multiple Alignment of Amino Acid Sequences (ProbCons) na <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/probcons> i Basic Local Alignment Tool (BLAST) na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Analiza slika gela nakon RT-PCR urađena je pomoću ImageJ 1.45s na <http://imagej.nih.gov/ij/>.

Filogenetska analiza je urađena upoređivanjem sekvenci aminokiselina različitih LCYB, NSY i CSS gena i jednog LCYE gena sa ClustalW2 version 2.1. Poređene DNK sekvence upotrebljene su za konstruisanje filogenetskog stabla koristeći „Neighbor-Joining“ metodologiju u MEGA 4. Vrednosti prikazane na čvorovima su procenti slaganja izračunati korišćenjem testa za poređenje 1000 replikacija.

### **3.7. KONSTRUKCIJA BINARNIH VEKTORA**

#### **3.7.1. KONSTRUKCIJA BINARNOG PLAZMIDA KOJI NOSI BAKTERIJSKI *crtB* GEN ZA TRANSFORMACIJU *I. GERMANICA* ‘FIRE BRIDE’**

Binarni vektor kojim se obavlja transformacija, označen kao pWBVec10a/PLlccs::TP-*crtB*::TNos (**Slika 9**), konstruisan je kao nosač gena za fitoen sintazu (*crtB*) *Pantoea agglomerans* vezanu za tranzitni peptid (TP) male subjedinice ribuloza karboksilaza-oksigenaze (RuBisCO) iz duvana (*Nicotiana sylvestris*; Pinck i sar., 1984) pod kontrolom promotora *Llccs* gena (vidi pod 3.6.2), i Nos terminator (TNos) sekvence. Izvor *crtB* gena je bio plazmid pAC-LYC (Cunningham i sar., 1994).

Najpre je dizajniran par prajmera (*crtB*-Fo i *crtB*-Re, **Tabela 2**) na takav način koji omogućuje uvođenje odgovarajućih restrikcionih mesta da bi se dobila odgovarajuća fuzija *crtB* gena sa cDNK TP male subjedinice RuBisCO i Nos terminatora. Forward prajmer *crtB*-Fo uvodi mesto prepoznavanja *NdeI* restrikcionog enzima na 5' kraju *crtB* gena. Reverzni prajmer, *crtB*-Re, uvodi mesto prepoznavanja *SacI* restrikcionog enzima na 3' kraju *crtB* gena. Koristeći ove prajmere *crtB* gen je amplifikovan u PCR reakciji i subkloniran u pGEM-T Easy plazmid (Promega).

Nakon sekvenciranja u cilju potvrde njegovog identiteta *crtB* gen je isečen

pomoću *NdeI* i *SacI* enzima i ligiran u pUC/*codA* vektor (Hayashi i sar., 1997) umesto sekvence gena za holin oksidazu (*codA*). Tako dobijeni konstrukt označen je kao pUC/CaMV 35S::TP-*crtB*::TNos. Nakon toga kreirana je translaciona fuzija između TP-*crtB* sekvence i promotorskog regiona gena za kapsantin-kasporubin sintazu *L. lancifolium* (*Llccs*) (videti sekciju 3.6.2). Ovaj promotorski region (PLlccs) sadrži uzvodni segment (-1877 bp) i 5' netranslirajući segment (čini ga 89 bp od 94 ukupno, pošto je poslednjih pet modifikovano tokom kloniranja mesta prepoznavanja za *XbaI* restrikcioni enzim). Sekvenca promotora PLlccs je amplifikovana u PCR reakciji koristeći prajmere PLlccs-F i PLlccs-R (**Tabela 2**).

PLlccs-F prajmer je dizajniran sa namerom da omogući inkorporaciju *HindIII* i *EcoRI* restrikcioni mesta u 5' netranslirajući region PLlccs sekvence. PLlccs-R prajmer je dizajniran sa mestom prepoznavanja *XbaI* enzima na 3' netranslirajućem kraju. Nakon PCR amplifikacije, produkt reakcije je subkloniran u PGEM-T Easy plazmid i sekvenciran. Na kraju, željeni fragment je izolovan restrikcijom uz pomoć *HindIII* / *XbaI* i kloniran u pUC/CaMV 35S::TP-*crtB*::TNos plazmid zamenjujući postojeći CaMV 35S promotor. Na taj način je dobijen plazmid pUC/PLlccs::TP-*crtB*::Tnos.

Da bi se modifikovala PLlccs::TP-*crtB*::Tnos ekspresiona kasetna u cilju kloniranja u pWBVec10a binarni vektor, kasetna je oivičena *NotI* restrikcionim mestima tako što je isečena iz pUC/PLlccs::TP-*crtB*::Tnos vektora pomoću *EcoRI* restrikcionog enzima i subklonirana u *EcoRI* restrikciono mesto između dva *NotI* restrikciona mesta pGEM-T Easy vektora prethodno digestiranog pomoću *EcoRI* restrikcionog enzima i defosforilisanog upotrebom alkalne fosfataze (UBS, Cleveland, OH, USA) radi sprečavanja autoligacije.

Na kraju, PLlccs::TP-*crtB*::Tnos ekspresiona kasetna je isečena iz pGEM-T Easy vektora pomoću *NotI* restrikcionog enzima i klonirana u pWBVec10a binarni vektor prethodno digestiran pomoću *NotI* restrikcionog enzima i defosforilisan, kao što je već navedeno, da bi se sprečila autoligacije. Orijehtacija ekspresione kasetne u binarnom vektoru je određena sekvenciranjem i rezultujući konstrukt je označen kao pWBVec10a/PLlccs::TP-*crtB*::TNos (**Slika 9**).



### 3.7.2. KONSTRUKCIJA BINARNOG VEKTORA KOJI NOSI *LLCCS* GEN ZA TRANSFORMACIJU *I. GERMANICA* 'HOT PROPERTY'

Par prajmera (*Llccs-F* i *Llccs-R*) je dizajniran da uvede *BamHI* restrikciona mesta na svaki kraj *Llccs* gena (**Tabela 3**). *Llccs* gen je amplifikovan u PCR reakciji, subkloniran u pGEM-T Easy vektor i sekvenciran. Klonirani fragment DNK sadrži kompletnu 5' UTR (5' region mRNK koja se ne prevodi, kao što je utvrđeno RACE-om, videti sekciju 4.3.1.), *Llccs* ORF (sekvenca koja kodira protein) i deo 3' UTR (3' region mRNK koja se ne prevodi) koji se produžava 131 bp iza terminacionog kodona. Da bi se oivičio sa CaMV 35S promotorom i Nos terminatorom *Llccs* gen je subkloniran u pUC/*codA* plazmid (Hayashi i sar., 1997) umesto *codA* gena na sledeći način: *codA* sekvenca je isečena iz pUC/*codA* plazmida restrikcionom digestijom pomoću enzima *XbaI* i *SacI* i zamenjena poli-linker sekvencom (XBSmPS) koja sadrži *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI* i *SacI* restrikciona mesta. Ovaj intermedijarni vektor je zatim digestiran *HindIII* enzimom, krajevi su poravnati Klenow fragmentom i dodat je linker koji sadrži *EcoRI* restrikciono mesto. Nastali plazmid je označen kao pUC/E-XBSmPS-E. Sekvenca za *Llccs* gen je isečena iz pGEM-T Easy vektora enzimskom digestijom pomoću *BamHI* enzima i ligirana u plazmid pUC/E-XBSmPS-E koji je prethodno digestovan *BamHI* enzimom i defosforilisan alkalnom fosfatazom da bi se sprečila autoligacije. Nastali plazmid je označen kao pUC/CaMV 35S::*Llccs*::TNos.

Da bi se uvela *NotI* restrikciona mesta koja oivičavaju CaMV 35S::*Llccs*::TNos, ova kasetta je isečena iz pUC/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektora i prebačena u *EcoRI* sekvencu pGEM-T Easy plazmida koji je oivičen sa dva *NotI* mesta. Na kraju, CaMV 35S::*Llccs*::TNos ekspresiona kasetta je isečena pomoću *NotI* enzima i prebačena u pWBVec10a binarni vektor (Wang i sar., 1998) koji je prethodno digestovan *NotI* enzimom i defosforilisan kao što je već opisano. Orijentacija ekspresione kasete u binarnom vektoru je determinisana sekvenciranjem i nastali vektor je označen kao pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos (**Slika 21b**).

### 3.7.3. KONSTRUKCIJA BINARNOG VEKTORA KOJI NOSI *LLCCS* GEN ZA TRANSFORMACIJU *S. LYCOPERSICUM* 'MONEYMAKER'

Promotor gena za halkon sintazu petunije (*PchsA*) fuzionisan za enhenser sekvencu (E35S) CaMV 35S promotora konstruisan je prema proceduri kao što su opisali van der Meer i sar., (1992), uz male modifikacije. Ovaj promotor je zatim upotrebljen za konstrukciju binarnog plazmida koji nosi E35S-*PchsA::Llccs::TNos* ekspresionu kasetu za transformaciju *S. lycopersicum*. Lista svih prajmera korišćenih za sintezu ovog binarnog vektora je prikazana je u **Tabeli 4**.

Par prajmera je dizajnirano i upotrebljeno za amplifikaciju enhensera (E35S) sekvence CaMV 35S promotora (~750 do ~ 90 bp) PCR metodom. Prajmeri su dizajnirani da omoguće uvođenje *HindIII* i *EcoRI* restrikcionih mesta na 5' kraju i *ClaI* i *PstI* restrikcionih mesta na 3' kraju E35S fragmenta. Nakon PCR amplifikacije E35S fragment je subkloniran u pGEM-T Easy vektor, sekvenciran da bi se potvrdio njegov identitet a zatim isečen pomoću *HindIII* i *PstI* restrikcionih enzima i subkloniran u pUC19 vektor koji je prethodno digestiran *HindIII* i *PstI* restrikcionim enzimima. Na taj način je generisan pUC19/E35S vektor.

Da bi se amplifikovao 220 bp promotorski region plus 79 bp 5'UTR gena za halkon sintazu (*chsA*) iz *Petunia* V30 genomske DNK dizajniran je par prajmera (P-*chsA*-Fbz i P-*chsA*-Rbz) koji su omogućili uvođenje *ClaI* restrikcionog mesta na 5' kraju i *XbaI* restrikcionog mesta na 3' kraju umnoženog DNK fragmenta (*PchsA*). *PchsA* sekvenca je zatim subklonirana u pGEM-T Easy vektor, sekvencirana, zatim isečena pomoću *ClaI* i *XbaI* restrikcionih enzima i subklonirana u pUC19/E35S vektor nizvodno od E35S. E35S-*PchsA* DNK fragment je isečen pomoću *HindIII* i *XbaI* restrikcionih enzima i subkloniran zamenjujući CaMV 35S promotor u pUC/*codA* (Hayashi i sar., 1997). Gen *codA* je zatim uklonjen i zamenjen linkerom koji sadrži *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI* i *SacI* restrikciona mesta da bi se kreirao pUC/XBSmPS vektor.

*Llccs* gen je amplifikovan pomoću para prajmera (*Llccs*-F i *Llccs*-R) dizajniranih da omoguće uvođenje *BamHI* restrikcionih mesta kako na 5' tako in a 3' kraju gena. Posle subkloniranja u pGEM T-Easy vektor i sekvenciranja da bi se potvrdio njegov identitet, *Llccs* je isečen pomoću *BamHI* restrikcionog enzima i subkloniran u

pUC/XBSmPS vektor koji je digestiran istim enzimom i defosforilisan pomoću alkaline fosfataze da bi se sprečila autoligacija. Korektna orijentacija *Llccs* gena unutar E35S-PchsA::*Llccs*::TNos ekspresione kasete određena je sekvenciranjem.

Da bi se modifikovala E35S-PchsA::*Llccs*::TNos ekspresiona kasete u cilju kloniranja u pWBVec10a binarni vektor, kasete je oivičena *NotI* restrikcionim mestima tako što je isečena iz pUC/E35S-PchsA::*Llccs*::TNos vektora pomoću *EcoRI* restrikcionog enzima i subklonirana u *EcoRI* restrikciono mesto između dva *NotI* restrikciona mesta pGEM-T Easy vektora (prethodno digestiranog pomoću *EcoRI* restrikcionog enzima i defosforilisanog kao što je prethodno pomenuto, da bi se sprečila autoligacija).

Na kraju, E35S-PchsA::*Llccs*::TNos ekspresiona kasete je isečena iz pGEM-T Easy vektora pomoću *NotI* restrikcionog enzima i klonirana u pWBVec10a binarni vektor prethodno digestiran pomoću *NotI* restrikcionog enzima i defosforilisan, kao što je već navedeno, da bi se sprečila autoligacija. Nastali vektor je označen kao pWBVec10a/E35S-PchsA::*Llccs*::TNos (**Slika 25a**).

### **3.8. ANALIZA AKUMULACIJE KAROTENOIDA U TKIVIMA TRANSGENIH BILJAKA**

#### **3.8.1. HPLC I UHPLC ANALIZE**

Za analizu karotenidnih pigmenata u kalusnim tkivima *I. germanica* 'Fire Bride' karotenoidi su ekstrahovani iz liofilizovanih kontrolnih (100 mg) i *crtB* transgenih kalusa (50 mg) po metodi koju su opisali u svom radu Fraser i sar., (2000). Za HPLC analizu količina od 200 µl svakog uzorka evaporisana je pod mlazom kompresovanog azota a ostatak je resuspendovan u 200 µl 90% acetona sa dodatkom vitamina E kao internog standarda. HPLC analiza je izvedena prema proceduri koju su opisali Van Heukelem i Thomas, (2005). Uzorci su izmešani na vortex mešalici i stavljeni u rashladnu policu HPLC sistema. Količina od 357 µl pufera i 143 µl ekstrakta injektirana je u HPLC sistem sa LC solution softverom (Shimadzu, Kyoto, Japan) koristeći program za predtretiranje i mešanje u petlji pre injektiranja.

Za analizu karotenidnih pigmenata cvetova *I. germanica* 'Fire Bride' prikupljeni su standardi i folovi sa *crtB* transgenih biljaka kao i sa kontrolnih biljaka, zamrznuti u

tečnom azotu, sprášeni i liofilizovani. Deo suvog praha svakog uzorka rastvoren je u 3 ml 90% acetona sa internim standardom (vitamin E) i izmešano na vortex mešalici. Urađena je zatim sonikacija na ledu, ekstrakcija na 4°C u trajanju od 20 časova i ponovo je sve izmešano. Rastvoreni uzorci su posle toga filtrirani kroz 0.2 µm politetrafluoroetilenski (PTFE) filter u HPLC bočice i stavljeni u rashladnu policu UHPLC sistema. Uzorci su injektovani u UHPLC (Shimadzu LC-30A UHPLC sistem sa Lab Solution softverom) koristeći program za predtretman i mešanje u petlji pre injektovanja kao što je opisano u radu Van Heukelem i Thomas, (2005). Sve UHPLC analize su izvedene tri puta.

Za analizu karotenoidnih pigmenata u cvetovima paradajza, karotenoidi su ekstrahovani iz svežih cvetova (0.86 g) netransformisanih biljaka i svežih cvetova *Llccs*-transgene linije L1 (0.88 g). Cvetovi su pretvoreni u prah sa tečnim azotom u avanu sa tučkom i preneti u 50 ml epruvetu u kojoj je bilo 20 ml rastvarača za ekstrakciju. Ekstracioni rastvor se sastojao od smeše heksana, acetona i etanola (50:25:25, v/v). Suspenzija je mešana i mučkana 15 minuta na sobnoj temperaturi a zatim je dodato 10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) sa 1 M NaCl i suspenzija je mešana okretanjem dodatnih 5 minuta. Gornja faza (heksan) je dobijena centrifugiranjem na 3500 obrt/min 5 minuta u kliničkoj centrifugi (NH-SII; IEC, Needham, MA, USA). Faza heksana sa karotenoidima je prikupljena Pasterovom pipetom i evaporisana pod mlazom azota. Talog je resuspendovan u 2 ml metil-*tert*-butil etera (MTBE). Saponifikacija je izvedena preko noći kao što su opisali u svom radu Lee i sar., (2001). Nakon tri ispiranja vodom, MTBE sloj je filtriran kroz Isolute<sup>®</sup> natrijum sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kasetu za isušivanje (Biotage, LLC, Charlotte, NC) i evaporisan pod mlazom azota. Talog je resuspendovan u 2 ml 100% etanola. Uzorak je zatim filtriran kroz 0.45 µm PTFE filter i podvrgnut UHPLC analizi. Standardi kapsantina i kapsorubina su nabavljeni od CaroteNature (Lupsingen, Switzerland) i korišćeni su za pravljenje referentnih rastvora za UHPLC analizu. Referentni rastvori su pripremljeni tako što su po 1 mg kapsantina i 1 mg kapsorubina zasebno rastvoreni u 50 ml 100% etanola i svaki rastvor filtriran kroz 0.45 µm PTFE filter. Kvantitativne i kvalitativne UHPLC analize karotenoida su obavljene kao što je predhodno opisano za cvetove *I. germanica* 'Fire Bride'.

Za analize karotenoidnih pigmenata u kalusima *I. germanica* 'Hot Property' karotenoidi su ekstrahovani iz dve nezavisno generisane transgene *Llccs* linije kalusa (*Llccs*-1 i *Llccs*-2) koje su akumulirale velike količine crveno-narandžastog pigmenata kao i iz netransformisanih kontrolnih kalusa, prema proceduri koji su opisali Fraser i sar., (2000). U oba slučaja upotrebljeno je 100 mg liofilizovanog tkiva kalusa. HPLC analize su obavljene kao što je već opisano za tkivo kalusa *I. germanica* 'Fire Bride'.

Analize karotenoida pomoću HPLC i UHPLC su urađene kao servis od strane DHI LAB (Hørsholm, Danska).

### **3.8.2. UPLC-MS/MS ANALIZE**

Priprema tkiva, ekstrakcija i saponifikacija karotenoida iz kalusnog tkiva *Llccs* transgenih perunika urađena je kao što je gore navedeno za cvetove paradajza (sekcija 3.8.1.). Karotenoidi su ekstrahovani iz 2 g svežeg kalusnog tkiva *Llccs* transgenih perunika (linija *Llccs*-2).

ABSciex 5600 TripleToF brzosenirajući Q-ToF sistem visoke rezolucije (ABSciex, Foster City, CA, USA) spregnut sa Prominence UPLC sistemom (Shimadzu, Columbia, MD, USA) upotrebljen je za precizno izračunavanje mase. Za UPLC separaciju korišćena je C18 kolona dimenzija 2.1 mm x 50 mm, veličine partikula 1.9- $\mu$ m (Perkin Elmer, San Jose, CA, USA) sa LC-MS čistoćom rastvarača. Rastvarač A je bio voda (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA), rastvarač B je bio acetonitril (EMD Chemicals) a 0.1% formalinska kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) je dodata u oba rastvarača. Brzina protoka je bila 0.7 ml/min. Uslovi za dobijanje odgovarajućeg gradijenta su bili sledeći: početo je sa 20% rastvarača B, što je povećavano do 90% rastvarača B tokom 3 min; 90% rastvarača B je zadržano tokom 2 min, i na kraju je odnos rastvarača tokom 1 min vraćen u počenu ravnotežu sa 20% rastvarača B. Maseni spektrometar je radio u pozitivnom ToF-MS/MS modu sa sledećim podešavanjima: vreme praćenja, 0.25 s; potencijal grupisanja, 80; gasna zavesa 25; gas1, 50; gas2 40; temperatura izvora, 550 °C; voltaža spreja, 5500 volti; i primenjenom energijom sudara od 35 radi indukcije fragmentacije. Opseg m/z merenja je bio 100 to 1000 amu. Instrument je kalibrisan ABSciex kalibracionim rastvorom pre svakog ispitivanja.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. RAZVOJ PROCEDURA ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU *IRIS GERMANICA* L.**

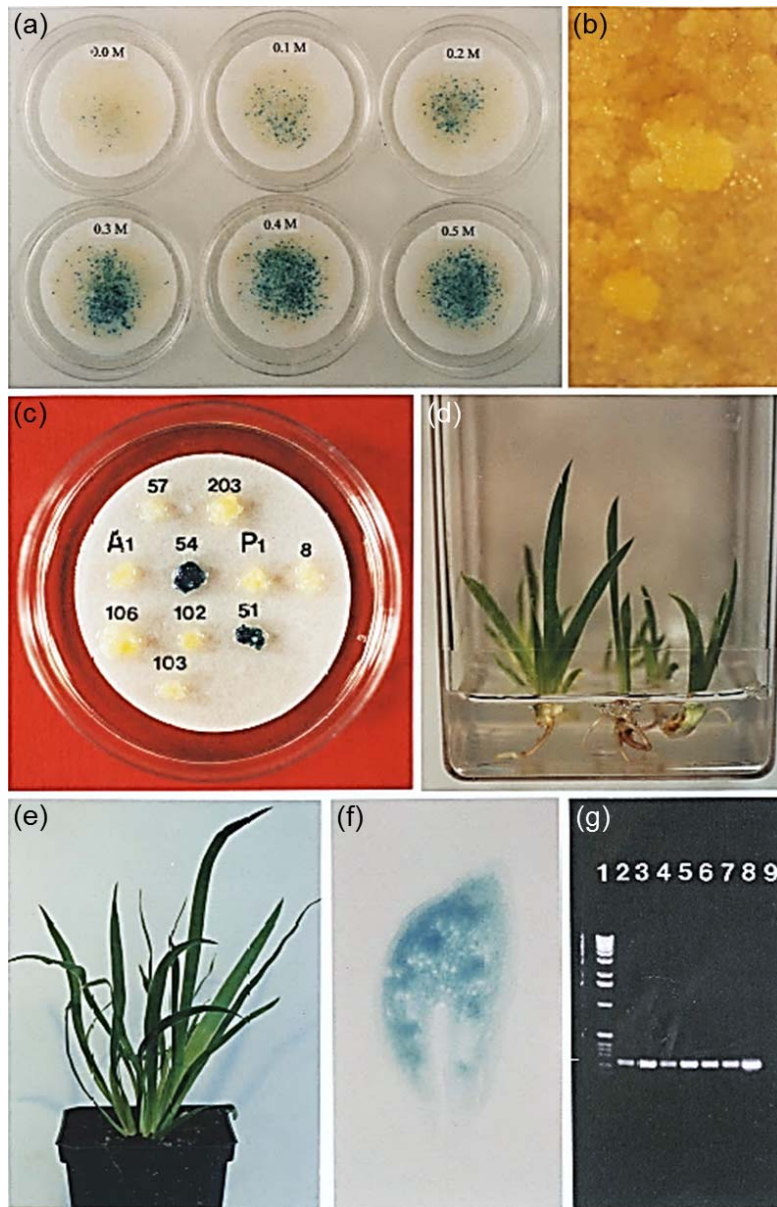
#### **4.1.1. BIOLISTIČKA TRANSFORMACIJA (BOMBARDOVANJE MIKROPROJEKTIILIMA) *I. GERMANICA* L.**

Podobnost različitih frakcija ćelijskih suspenzija perunika za biolističku transformaciju je utvrđena na osnovu frekvencije same transformacije kao i na osnovu morfogenetskog potencijala u sledećim koracima pri regeneraciji cele biljke. Za utvrđivanje odgovarajuće frakcije ćelija, ćelijske suspenzije su filtrirane kroz nekoliko sita od nerđajućeg čelika različitiih veličina otvora. Najpodesnija ćelijska frakcija za biolističku transformaciju pokazala se ona koja je prolazila kroz sito sa veličinom otvora 30 (eng. mesh) tj. ćelijski agregati  $\leq 595 \mu\text{m}$ .

Dalja optimizacija protokola za transformaciju je postignuta testiranjem različitih podešavanja PDS-1000/He sistema za biolističku transformaciju uključujući pritisak helijuma, udaljenost mete i vakuum same komore. Optimalna transformacija ćelijskih suspenzija postignuta je kada se ćelije, pošto su nanete na filter papir postavljen preko 10 ml MS-C hranljive podloge u maloj Petri posudi (60 X 15 mm), bombardovane upotrebom rasprskavajućeg diska od 1100 psi (7584 kPa) na udaljenosti mete od 6 cm od zaustavljajuće mrežice i sa vakuumom u komori od oko 20-25 mm Hg.

U potrazi za dodatnim načinima povećanja efikasnosti genetičke transformacije perunike, tretman ćelijske suspenzije osmotocima (ekvimolarne koncentracije manitola i sorbitola) pre bombardovanja mikroprojektilima se pokazao vrlo uspešnim. Različiti koraci u biolističkoj transformaciji i regeneraciji transgenih biljaka *I. germanica* metodom biolističke transformacije prikazani su na **Slici 5**. Tretiranje suspenzije ćelija osmotocima pre bombardovanja mikroprojektilima dovelo je do progresivnog povećanja broja trazientnih transformanata tj. GUS-pozitivnih plavih tačaka što je posebno zapaženo u slučaju kada su ćelijske frakcije tretirane osmotocima u rasponu 0.1 M – 0.5

M (Slika 5a). Pad broja GUS-pozitivnih plavih tačaka primećen je kada je koncentracija osmotikuma bila viša od 0.8 M. Tretman sa 0.4 M osmotikuma je



**Slika 5.** Biolistička transformacija i regeneracija transgenih biljaka *I. germanica*. **(a)** Efekat povećanja koncentracije osmotikuma na ekspresiju GUS gena 48 sati nakon transformacije. **(b)** Agregati ćelija koji se umnožavaju na selektivnoj podlozi sa  $10 \text{ mg L}^{-1}$  Basta 2 nedelje posle transformacije. **(c)** Stabilna transformacija kalusnih linija #54 i #51 potvrđena GUS bojenjem. **(d)** Transformisane biljke iz linije #54. **(e)** Transgena perunika posle 4 nedelje gajenja u uslovima staklenika. **(f)** Bojenje isečaka listova za ekspresiju GUS gena. **(g)** PCR analiza *uidA* (GUS) gena (250 bp) nekoliko nezavisnih transgenih biljaka (**1.** 100bp lader; **2-7.** transgene linije; **8.** Pozitivna kontrola (plazmid pAHC25); **9.** Negativna kontrola (netransformisana biljka).

kasnije korišćen u procesu dobijanja stabilnih transformanata perunike. Korišćenjem ovakvog modifikovanog metoda biolističke transformacije dobijeno je ukupno osam nezavisnih GUS-pozitivnih transgenih linija perunika u kojima je stabilna transformacija *uidA* gena dodatno potvrđena PCR metodom (**Slika 5g**). Transgene perunike su uspešno regenerisane ovim optimizovanim metodom biolističke transformacije, ali sa niskom frekvencijom.

#### **4.1.2. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS POSREDOVANA GENETIČKA TRANSFORMACIJA *I. GERMANICA***

Razvoj efikasnog protokola za transformaciju *I. germanica* posredovanu *A. tumefaciens* zahtevao je testiranje i optimizaciju nekoliko različitih parametara kao što su: evaluacija različitih selekcionih agenasa, evaluacija različitih kombinacija *Agrobacterium* soj/binarni vektor i nedvosmislena potvrda stabilne integracije transgena u genom biljaka.

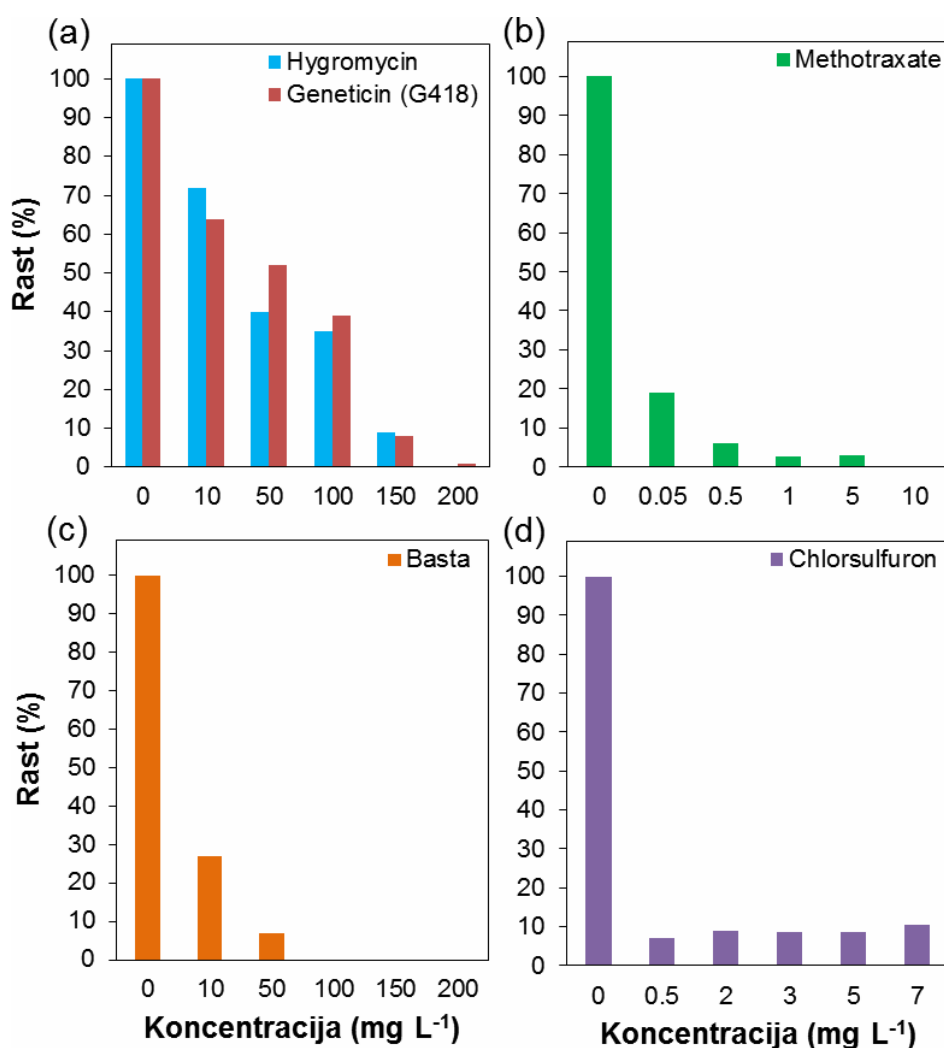
Koristeći dobijeni optimizovan protokol za *A. tumefaciens* posredovanu transformaciju razvijena je mnogo uspešnija i efikasnija metoda za genetičke transformacije perunika za razliku od biolističke metode.

##### **4.1.2.1. EVALUACIJA SELEKCIONIH AGENASA**

U cilju utvrđivanja najefikasnijih selekcionih agenasa za dobijanje stabilnih transformanata perunike, testirani su različiti agensi koji se često koriste za selekciju transformisanih ćelija različitih biljaka. Ukupno je testirano pet antibiotika (metotreksat, higromicin, geneticin, gentamicin i fleomicin), tri herbicida (glifosat, hlorosulfuron i Basta) i jedan analog amino kiseline (4-metil-triptofan). U preliminarnim eksperimentima testirano je pet koncentracija svakog selekcionog agenasa, a inhibicija rastjenja kalusa određena je vizuelno. Među devet testiranih sastojaka 4-metil-triptofan, gentamicin, fleomicin i glifosat nisu jasno inhibirali rasteenje kalusa perunike i oni su isključeni iz daljeg testiranja. Preostalih pet najefikasnijih selekcionih agenasa ponovo su testirani da bi se odredila koncentracija svakog od agenasa koja je dovoljna za 50% inhibicije rasteenje netransformisanih ćelija perunika.



Povećanje koncentracije higromicina i geneticina dovelo je do postepenog smanjenja procenta rasteња ćelijskih suspenzija perunike (**Slika 6a**). Nasuprot tome, rasteње netransformisanih ćelija perunika značajno je inhibirano sa 0.05 mg L<sup>-1</sup> metotreksata (~80%), 10 mg L<sup>-1</sup> Basta (~70%) i 0.5 mg L<sup>-1</sup> hlorsulfurona (~90%, **Slike 6 b,c,d**) u poređenju sa kontrolnim kulturama.



**Slika 6.** Efekat selekcionih agenasa na rasteње netransformisanih ćelijskih suspenzija perunike. Antibiotici: **(a)** higromicin i geneticin (G418) i **(b)** metotreksat; herbicidi: **(c)** Basta i **(d)** hlorsulfuron. Srednja vrednost od 5 ponavljanja.

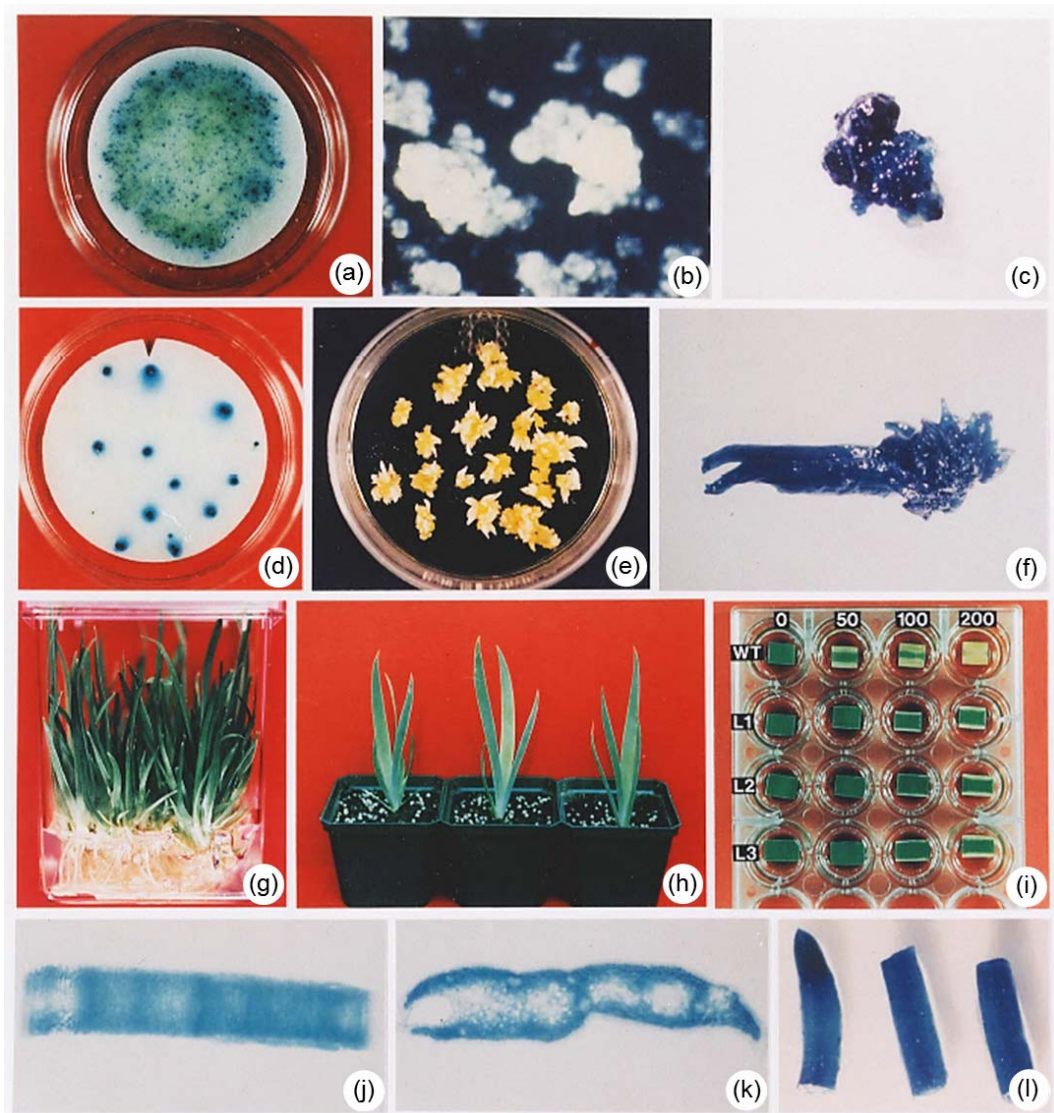
Veliko smanjenje rastenja ćelijskih suspenzija perunike koje je primećeno čak i pri najnižim testiranim koncentracijama ova tri selekciona agensa nije poželjno jer može ometati i sam kasniji oporavak i morfogenezu transformisanih ćelija. Na osnovu ovih testova, ali i zbog toga što je superbinarni vektor pTOK233 koji je korišćen u preliminarnim eksperimentima u vezi sa frekvencijama transformacije sadržao selekzione gene *hpt* (gen rezistencije na higromicin) i *nptII* (gen rezistencije na geneticin), higromicin i geneticin su odabrani za dalje testiranje. Higromicin i geneticin pri koncentracijama od 50 i 100 mg L<sup>-1</sup> doveli su do oko 40% odnosno 50% inhibicije rastenja ćeliskih suspenzija (**Slika 6a**).

Nakon ovih eksperimenata testiran je dvostepeni selekциони protokol, najpre sa 50 mg L<sup>-1</sup>, a potom 100 mg L<sup>-1</sup> za svaki selekциони agens posebno. Dvostepena selekcija (3 + 3 nedelje) je omogućila oporavak neophodne količine svake kalusne linije za kasniju efikasnu indukciju regeneracije biljaka. Više koncentracije antibiotika nisu korišćene jer se pretpostavljalo da bi mogle ometati regeneraciju biljaka iz kalusnog transgenog tkiva.

#### **4.1.2.2. EVALUACIJA SOJA *AGROBACTERIUM* I TRANSFORMACIONOG PLAZMIDA**

Soj *Agrobacterium* LBA4404 koji nosi plazmid pTOK233 je pokazao značajno više nivoe transientne transformacije u poređenju sa LBA4404 sojem koji nosi pCAMBIA1201 i EHA105 sojem koji nosi pCAMBIA1201, pa je zbog toga i odabran za dalje eksperimente transformacije. Tri dana nakon kokultivacije na MS-C-AS hranljivoj podlozi sa *A. tumefaciens*, inficirane ćelije su prenete na prve dve selekzione podloge (MS-C koja sadrži 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i ili 50 mg L<sup>-1</sup> higromicina ili 50 mg L<sup>-1</sup> geneticina). U isto vreme uzorak ćelija je testiran na ekspresiju GUS marker gena. Mnoge ćelije i mali agregati ćelija su se obojili tamno-plavo (**Slika 7a**) što potvrđuje da je došlo do T-DNK transfera. Nakon 10 dana, na prvoj selektivnoj podlozi nekoliko agregata ćelija koji su se dalje umnožavali, su testirani na GUS aktivnost (**Slika 7b**). Većina agregata se obojila ujednačeno tamno-plavo, ali su neki agregati takođe imali i nebojene delove (**Slika 7c**).

Nakon 3 nedelje rastenja na prve dve selekzione podloge oko 300 zasebnih agregata ćelija kalusa je selektovano sa svake podloge i preneto na druge selektivne



**Slika 7.** *A. tumefaciens*-posredovana transformacija i regeneracija transgenih perunika. **(a)** Tranzijentna ekspresija GUS gena u ćelijskoj suspenziji ćelija 3 dana posle kokultivacije. **(b)** Agregati ćelija na prvoj selektivnoj podlozi 10 dana nakon kokultivacije **(c)** Testiranje ćelijskih agregata na ekspresiju GUS gena. **(d)** Testiranje nezavisnih kalusnih linija dobijenih kroz dvostepenu selekciju na ekspresiju GUS gena pre transfera na podlogu za indukciju izdanaka (MS-I). **(e)** Indukcija morfogeneze iz GUS pozitivnih kalusnih linija posle 3 nedelje gajenja na MS-I podlozi **(f)** Detalj primordije izdanaka obojen na ekspresiju GUS gena. **(g)** Dobro razvijene i ožiljene transgene biljčice posle 4 nedelje gajenja na MS-R podlozi **(h)** Transgene biljke u uslovima staklenika nedelju dana nakon aklimatizacije **(i)** Ispitivanje na funkcionalnu ekspresiju NPTII gena (leaf-bleach assay). 0, 50, 100, i 200 = 0, 50, 100 odnosno 200 mg L<sup>-1</sup> paromomicina; WT = netransformisana (wild type) biljka; L1, L2 i L3 = uzorci listova sa tri nezavisna transformanta **(j)** i **(k)** GUS ekspresija u listovima transgenih biljaka gajenih *ex vitro* **(l)** GUS ekspresija u korenovima mlade biljke odgajene *in vitro*.

podloge od kojih je svaka sadržala po 100 mg L<sup>-1</sup> higromicina ili geneticina. Većina kalusa koji su dalje gajeni na podlozi sa geneticinom nastavila je rasteње mnogo sporije od onih koji su gajeni na hranljivoj podlozi koja je sadržala higromicin. Ova dvostepena selekcija dovela je do formiranja 175 kalusnih linija rezistentnih na higromicin i 50 kalusnih linija rezistentnih na geneticin, koje su zatim ispitivane na ekspresiju GUS gena. Oko 61% kalusnih linija rezistentnih na higromicin i oko 46% kalusnih linija rezistentnih na geneticin bilo je GUS pozitivno (**Slika 5**). Većina GUS pozitivnih agregata ćelija obojila se tamno-plavo ukazujući na jaku ekspresiju GUS marker gena (**Slika 7d**). Sve GUS negativne kalusne linije su odbačene, a GUS pozitivne kalusne linije su prenete na MS-I podlogu koja je sadržala 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaksima i 50 mg L<sup>-1</sup> higromicina i/ili 50 mg L<sup>-1</sup> geneticina kako bi se indukovala regeneracija biljaka. Ukupno je dalje gajeno 98 GUS pozitivnih kalusnih linija rezistentnih na higromicin i 22 GUS pozitivne kalusne linije rezistentne na geneticin.

Globularne strukture nalik na somatske embrione formirale su se posle nedelju dana gajenja na ovim podlogama. Nakon 3 nedelje kod 60 zasebnih transgenih GUS pozitivnih kalusnih linija (od čega 50 rezistentnih na higromicin i 10 rezistentnih na geneticin) diferencirao se veliki broj primordija izdanaka (**Slika 7e**). Histoheмиjska GUS analiza pokazala je da je 80% primordija imalo pozitivne reakcije i da su se obojile tamno-plavo (**Slika 7f**). Transgene kalusne linije sa dobro razvijenim primordijama izdanaka prenete su na MS-D podlogu. Zeleni izdanci i biljčice (10 do 20 od svake transgene linije) koje su se razvile na MS-D podlozi preneti su i dalje gajeni na MS-R podlozi da bi se indukovalo i/ili poboljšalo ožiljavanje biljaka. Više od 90% izdanaka formiralo je korenove i na kraju su sve biljke zasađene u uslove staklenika (**Slika 7g**). Aklimatizacija transgenih biljaka perunike na uslove staklenika je bila vrlo uspešna (80-90%). Došlo je do potpunog razvića morfološki normalnih biljaka (**Slika 7h**).

#### **4.1.2.3. PROCENA EFIKASNOSTI TRANSFORMACIJE KROZ EKSPRESIJU GUS GENA I NPTII GENA U REGENERISANIM TRANSGENIM BILJKAMA**

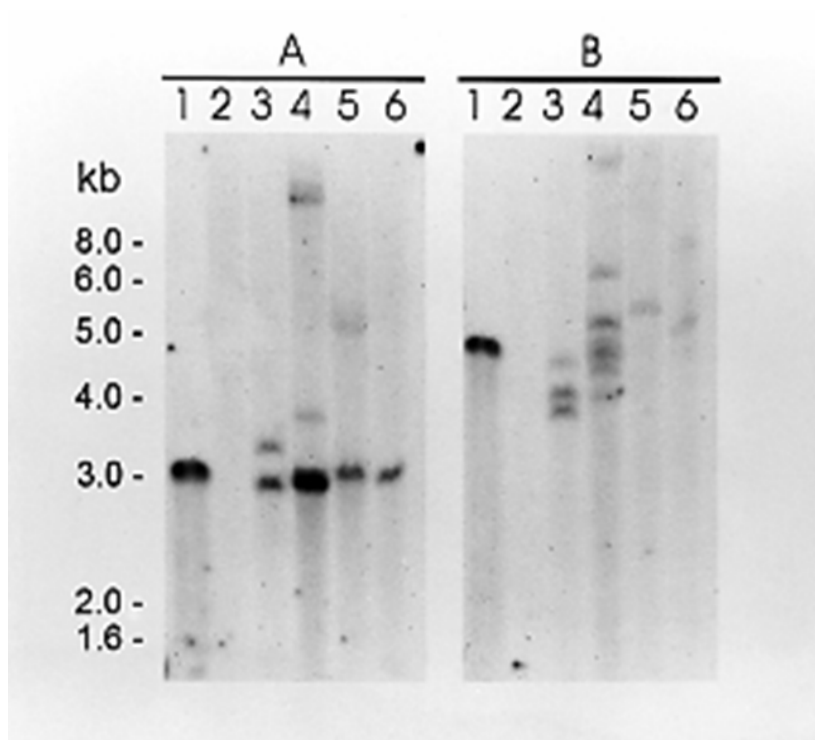
Većina potencionalno transgenih biljaka analizirana je na prisustvo ekspresije GUS i NPTII gena. Ukupno 92 biljke iz 36 nezavisnih linija analizirano je na GUS

**Tabela 5.** Ekspresija GUS i NPTII gena kod higromicin (Hyg) i geneticin (G418) rezistentnih biljaka *Iris germanica* 'Skating Party' određena histohemijskim bojenjem za GUS odnosno testom izbeljivanja listova („leaf-bleach assay“) za NPTII.

Antibiotik	GUS			NPTII			Koekspresija GUS i NPTII				
	Broj biljaka (linija)	GUS <sup>+</sup>	GUS <sup>-</sup>	Broj biljaka (linija)	NPTII <sup>+</sup>	NPTII <sup>-</sup>	Broj biljaka (linija)	GUS <sup>+</sup> NPTII <sup>+</sup>	GUS <sup>+</sup> NPTII <sup>-</sup>	GUS <sup>-</sup> NPTII <sup>+</sup>	GUS <sup>-</sup> NPTII <sup>-</sup>
<b>Hyg</b>	72 (30)	61	11	51 (27)	45	6	50 (23)	40	1	4	5
<b>G418</b>	20 (6)	13	7	9 (6)	6	3	8 (3)	5	0	0	3
<b>Ukupno</b>	92 (36)	74	18	60 (33)	51	9	58 (26)	45	1	4	8
<b>%</b>		80	20		85	15		78	2	7	14

aktivnost. Oko 80% ovih biljaka bilo je GUS pozitivno (**Tabela 5**). Ekspresija GUS gena bila je vrlo jaka u listovima i korenovima, što je procenjeno na osnovu intenziteta obojenja ovih tkiva (**Slike 7j, k, l**).

Ekspresija NPTII gena je procenjena na osnovu testa izbeljivanja listova kod 60 transgenih biljaka iz 33 nezavisne linije. Oko 85% ovih biljaka bilo je rezistentno na paromomicin (NPTII+, **Tabela 5**). Uzorci listova rezistentnih transgenih biljaka su ostali zeleni osim na posećenim delovima listova pri višim koncentracijama paromomicina (**Slika 7i**). Uzorci listova kontrolnih (netransformisanih) biljaka bili su, međutim, skoro potpuno izbeljeni pri koncentraciji paromomicina od 200 mg L<sup>-1</sup>.



**Slika 8.** Southern blot analiza *HindIII*-digerirane genomske DNK iz divljeg tipa (netransformisane) i transformisanih perunika. DNK blot proba sa (A) <sup>32</sup>P-obeležanim GUS ili (B) <sup>32</sup>P-obeležanim *hpt* DNK fragmentom. Traka 1, pozitivna kontrola (*HindIII*-digerirani plazmid pTOK233); 2, netransformisana biljka; 3-6, transgene biljke: H177-1, H206-2, H231-05 i H244-1.

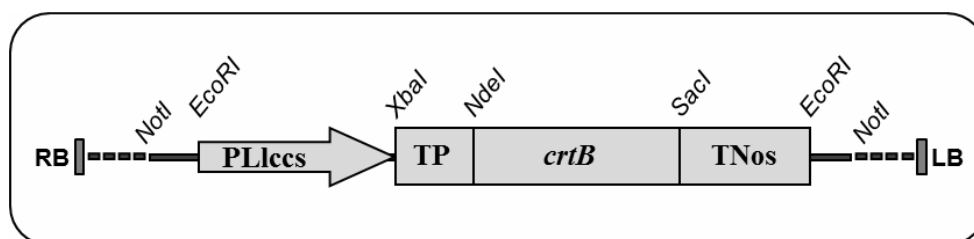
Ukupno je 58 biljaka iz 26 nezavisnih linija analizirano na koekspresiju GUS i NPTII gena. Ekspresija oba gena je uočena kod 78% transgenih biljaka (**Tabela 5**).

Da bi se dokazala stabilna integracija *hpt* i *uidA* (GUS) gena u genom perunike četiri zasebne transgene biljke podvrgnute su Southern blot analizi. U pTOK233

plazmidu *HindIII* iseca čitav region koji kodira GUS iz T-DNK kao 3.1 kbp fragment. DNK blot analiza *HindIII*-digerirane genomske DNK iz GUS-pozitivnih/higromicin rezistentnih biljaka koristeći GUS probu indentifikuje jedan (Slika 8, panel A, linija 6) ili nekoliko pozitivnih fragmenata (Slika 8, panel A, linije 3, 4 i 5) koji hibridizuju sa GUS probom. Neki od uzoraka (Slika 8, panel A, linije 3 i 4) ukazuju na prisustvo skraćene GUS insercije (tj. insertovana GUS kasete je malo manja nego što je očekivano). Dodatne trake većih veličina su takođe uočene što je možda posledica nekompletne digercije genomske DNK ili moguće delecije bočnih *HindIII* mesta. Uprkos razlikama u veličini GUS gena, aktivnost  $\beta$ -glukuronidaze se jasno videla kao plava boja. Kao što se i očekivalo, GUS proba sa nije hibridizovala sa DNK iz netransformisanih biljaka.

#### 4.2. PROMENA BOJE CVETOVA KOD *I. GERMANICA* L. ‘FIRE BRIDE’ KROZ GENETIČKU MODULACIJU BIOSINTETIČKOG PUTA KAROTENOIDA PUTEM EKTOPIČNE EKSPRESIJE GENA ZA FITOEN SINTAZU (*CRTB*) IZ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Ćelijske suspenzije *I. germanica* kultivara ‘Fire Bride’ upotrebljene su za *Agrobacterium*-posredovanu transformaciju sa pWBVec10a/PLlccs::TP-*crtB*::TNos binarnim vektorom koji je nosio kodirajući region *crtB* gena pod kontrolom PLlccs promotora (Slika 9). Transformacija praznim plazmidom, pWBVec10a, korišćena je kao kontrola. Detaljne informacije o PLlccs promotoru date su u sekciju 4.3.



**Slika 9.** Konstrukcija binarnog vektora pWBVec10a/PLlccs::TP-*crtB*::TNos koji sadrži gen za fitoen sintazu (*crtB*) iz *Pantoea agglomerans* upotrebljen za transformaciju *I. germanica* ‘Fire Bride’. PLlccs = promotor gena za kapsantin-kapsorubin sintazu iz *L. lancifolium* ‘Splendens’; TP = tranzitni peptid male subjedinice RuBisCO-a iz duvana (*Nicotiana glauca*); TNos = nopalinski sintaza terminator.

#### 4.2.1. REGENERACIJA *CRTB*-TRANSGENIH BILJAKA PERUNIKE

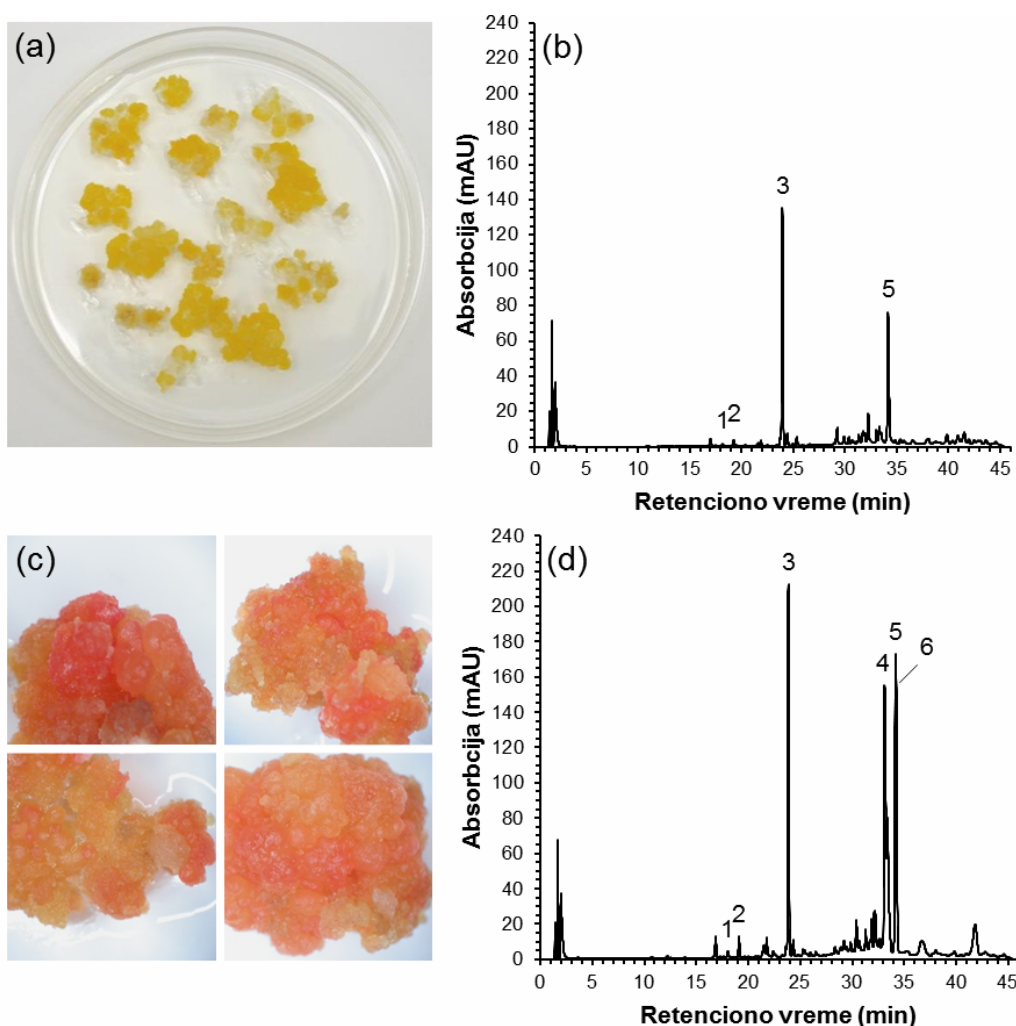
Deset transgenih linija je regenerisano iz svakog nezavisnog *crtB*-transgenog kalusa. PCR analize transgena i GUS bojenje potvrdilo je da su dobijeni stabilni transformanti. Transgene biljke su dalje gajene do fiziološke zrelosti u uslovima staklenika pod fotoperiodom 16 sati dan/8 sati noć. Posle godinu dana gajenja u uslovima staklenika većina transgenih biljaka je dostigla fiziološku zrelost i cvetala.

#### 4.2.2. PROMENE U BOJI I NIVOIMA KAROTENOIDA U *CRTB*-TRANSGENIM KALUSIMA PERUNIKE

Ektopična ekspresija *crtB* gena pod kontrolom PLlccs promenila je prirodnu žutu boju kalusa u različite nijanse roze-narandžaste i crvene (**Slika 10a, c**). Urađena je HPLC analiza karotenoida kontrolnih i crvenih *crtB*-transgenih kalusa da bi se odredile kvalitativne i kvantitativne promene profila karotenoida. Hromatogrami ovih analiza su prikazani na **Slici 10b, d**.

Kod kontrolnih kalusa dva glavna karotenoida koji se akumuliraju su lutein i  $\alpha$ -karoten sa koncentracijama od  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  DW odnosno  $8 \mu\text{g g}^{-1}$  DW. Količina oba ova karotenoida povećala se otprilike trostruko kod *crtB*-transgenskih kalusa dostižući maksimum od  $38 \mu\text{g g}^{-1}$  DW luteina i  $26 \mu\text{g g}^{-1}$  DW  $\alpha$ -karotena. Kontrolni kalusi su takođe akumulirali manje količine neoksantina ( $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$  DW) i violaksantina ( $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$  DW). Kod *crtB*-transgenih kalusa, međutim, koncentracija ova dva karotenoida je bila znatno povećana i bila je skoro sedam puta veća veća dostižući do  $1.3 \mu\text{g g}^{-1}$  DW za neoksantin odnosno oko  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  DW za violaksantin. Pored toga, zanimljivo je da je kod *crtB*-transgenih kalusa uočeno akumuliranje likopena kojeg nije bilo ili je bio prisutan samo u zanemarljivim količinama u kontrolnim kalusima. Koncentracija likopena od  $52 \mu\text{g g}^{-1}$  DW čini ga najzastupljenijim karotenoidom u *crtB*-transgenim kalusima. Uočeno je prisustvo još jednog karotenoida, čije prisustvo nije zabeleženo ili je bio prisutan u zanemarljivoj količini u kontrolnim kalusima ali se u *crtB*-transgenim kalusima akumulirao u znatnoj količini od  $24 \mu\text{g g}^{-1}$  DW. Ovaj karotenoid je sličan  $\beta$ -karotenu ali se nije mogao nedvosmisleno identifikovati jer je eluiran blizu vrha za  $\alpha$ -karoten.





**Slika 10.** Promene boje kalusa i HPLC profili karotenoidnih pigmenata kontrolnih (transformisanih „praznim vektorom“) i *crtB*-transgenih kalusa *I. germanica* ‘Fire Bride’. **(a)** Kontrolni kalusi; **(b)** HPLC hromatogram ekstrakta karotenoida iz kontrolnog kalusa; **(c)** Reprerativni primerci *crtB*-transgenih kalusa; **(d)** HPLC hromatogram ekstrakta karotenoida iz *crtB*-transgenih kalusa. Karotenoidni vrhovi: (1) neoksantin; (2) violaksanthin; (3) lutein; (4) likopen; (5)  $\alpha$ -karoten; i (6)  $\beta$ -karotenu-sličan karotenoid. (Izvršena je HPLC analiza ekstrakata karotenoida dobijenih iz 100 mg liofilizovanih kontrolnih kalusa i 50 mg liofilizovanih *crtB*-transgenih kalusa).

#### 4.2.3. PROMENE BOJE KOD *CRTB*-TRANSGENIH BILJAKA PERUNIKA

Ektopična ekspresija *crtB* transgenih perunika dovela je do vidljivog povećanja akumulacije karotenoidnih pigmenata u određenim tkivima *crtB*-transgenih biljaka (Slike 11-14).



**Slika 11.** Meseć dana stare kontrolne (transformisane „praznim vektorom“) i *crtB*-transgene biljčice *I. germanica* ‘Fire Bride’. **(a)** Kontrolna (levo) i *crtB*-transgena biljčica (desno); **(b)** Poprečni presek kroz bazalni meristemski region kontrolne biljčice; **(c)** Poprečni presek kroz bazalni meristemski region *crtB*-transgene biljčice. Barovi: 10 mm **(a)** i 1 mm **(b, c)**.

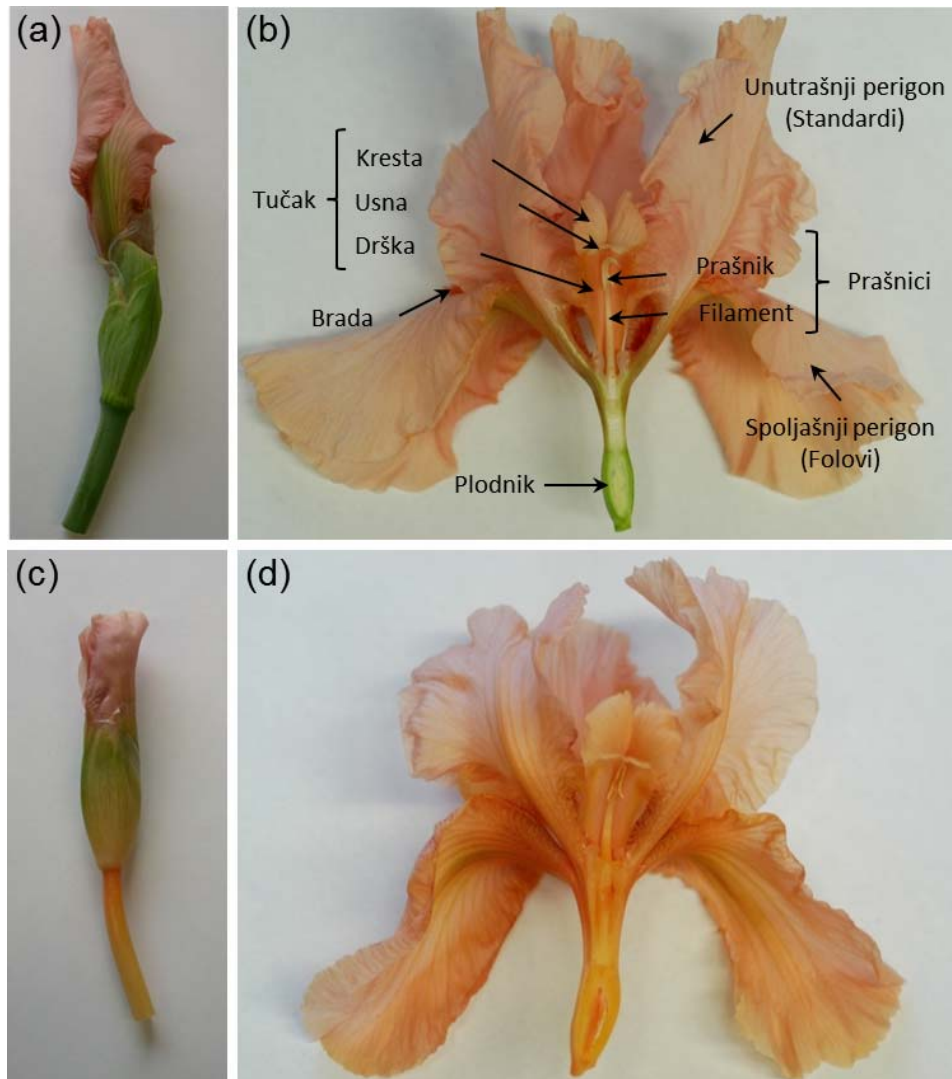
Nasuprot tome kontrolne biljke transformisane praznim plazmidom bile su identične netransformisanim biljakama.



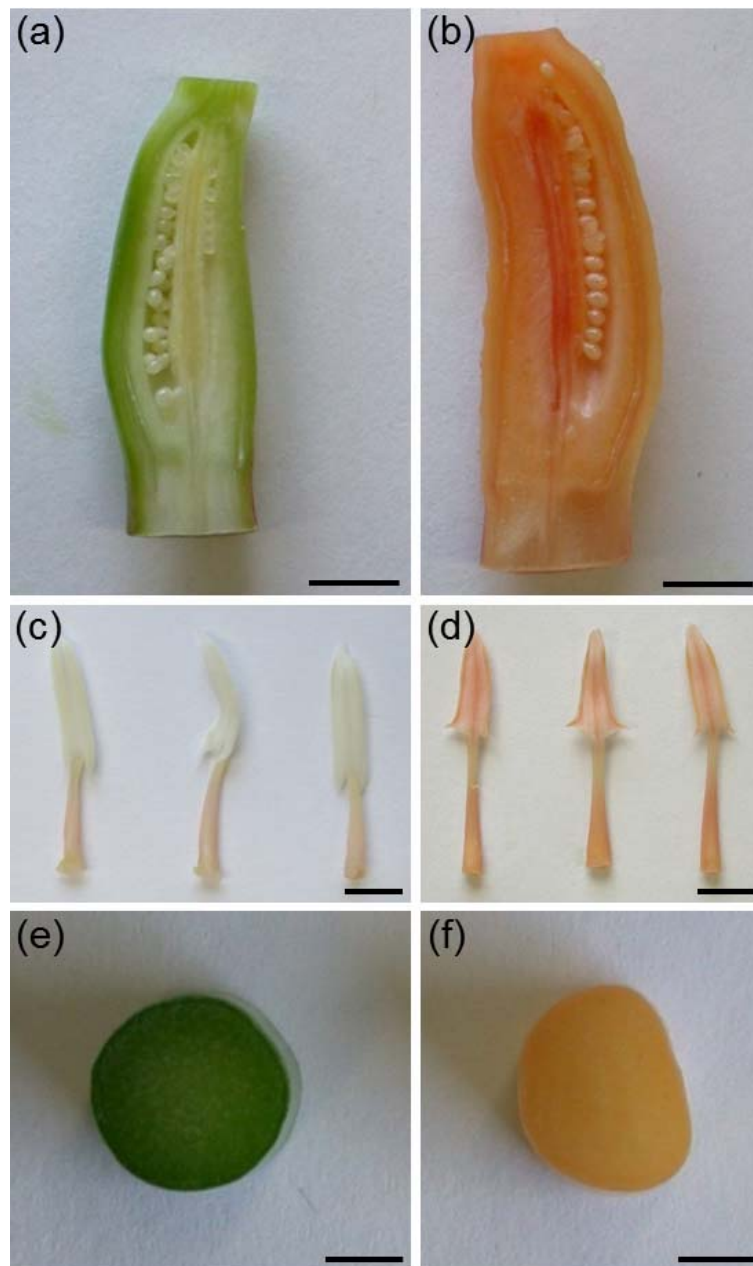
**Slika 12.** Godinu dana stare kontrolne (transformisane „praznim vektorom“) i *crtB*-transgene biljčice *I. germanica* ‘Fire Bride’ odgajene u uslovima staklenika. **(a)** Kontrolna biljka u punom cvetu **(b)** *crtB*-transgena biljka u punom cvetu.

Kod mladih *crtB*-transgenih perunika došlo je do promene boje u pojedinim delovima biljke. Tako je najveća promena boje iz bele u nijansu roze bila uočena u meristemskom delu biljke, okolnim tkivima kao i u celom bazalnom segmentu listova (**Slika 11**). Kako su biljke rasle i sazrevale ove roze nijanse menjale su se u više narandžastu boju koja je verovatno posledica smanjene sinteze hlorofila i povećane sinteze i akumulacije karotenoida. Boja rizoma se takođe promenila od žuto-bele kod kontrolnih biljaka u roze-crvenu kod mladih transgenih biljaka i narandžastu kod odraslih transgenih biljaka. I *crtB*-transgene i kontrolne biljke su odgajene i analizirane u stadijumu cvetanja (**Slike 12a, b**). Kod ne-transformisanih biljaka donji delovi

standarda i folova, posebno abaksijalni (niži), normalno sadrže nešto hlorofila i imaju svetlo zelenu boju (Slika 13a, b). Obratno, *crtB*-transgene biljke akumuliraju velike količine karotenoida u ovim tkivima što im daje narandžastu boju (Slike 13c, d).



**Slika 13.** Promene boje cveta *crtB*-transgenih biljaka *I. germanica* 'Fire Bride' gajenih u uslovima staklenika. (a) Cvetni pupoljak kontrolne biljke (transformisane „praznim vektorom“); (b) Otvoreni cvet kontrolne biljke sa uklonjenim braktičnim listićima i jednim folom i longitudinalno presečenim plodnikom da bi se otkrili drugi delovi i strukture cveta; (c) Cvetni pupoljak *crtB*-transgene biljke; (d) Otvoreni cvet *crtB*-transgene biljke sa uklonjenim braktičnim listićima i jednim folom i longitudinalno presečenim plodnikom da bi se otkrili drugi delovi i strukture cveta.



**Slika 14.** Promene boje u različitim delovima cveta *crtB*-transgenih *I. germanica* 'Fire Bride' biljaka. Longitudinalno presečen plodnik (a), prašnik (c) i poprečni presek cvetne drške (e) kontrolne biljke (transformisane „praznim vektorom“); Longitudinalno presečen ovarijum (b), prašnik (d) i poprečni presek cvetne drške (f) *crtB*-transgene biljke. Barovi: 5 mm.

Međutim, nisu se mogle uočiti vizuelno značajnije promene boje ostatka standarda i folova. Moglo se čak zapaziti da su ostali delovi standarda i folova bili nešto svetlije roze od kontrolnih sa svetlo narandžastom bojom u bazi standarda i folova. Anatomske delove cvetova perunika su označeni na **Slici 13b**.

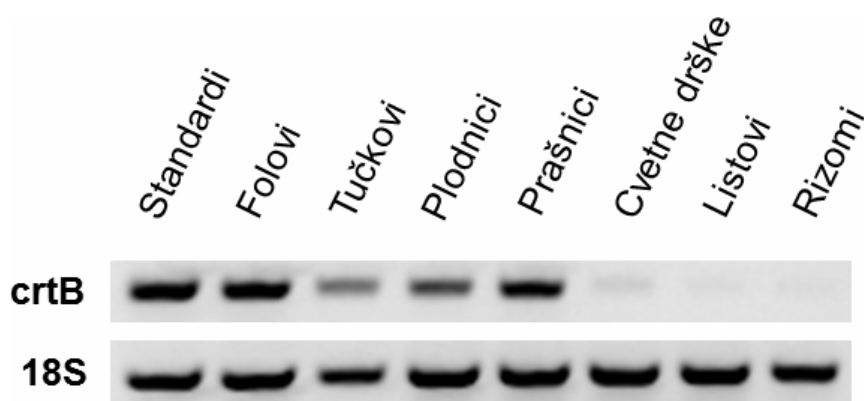
Plodnici kontrolnih biljaka su zeleni sa spoljne strane a longitudinalni preseki kroz plodnike pokazuju da je unutrašnja strana tkiva zelena ili svetlo zelena dok su ovule uvek bele (**Slika 14a**). Suprotno tome plodnici transgenih biljaka akumuliraju velike količine karotenoida a plodnici i ovule su dobili tamno narandžastu boju (**Slika 14b**).

Prašnici netransformisanih biljaka imaju bele antere na vrhu filamenata svetlo roze boje (**Slika 14c**). Kod transgenih cvetova filamenti su promenili boju, postali tamniji i više narandžasti a antere su imale roze boju (**Slika 14d**).

Cvetne drške transgenih biljaka, koje su normalno zelene, takođe su promenile boju, varirajući od zeleno-narandžaste do potpuno narandžaste kod različitih transgenih linija (**Slike 12a, b; 13a, c; 14e, f**). Poprečni preseki potvrđuju da je promena prisutna kroz celu cvetnu dršku (**Slika 14 f**). Sve ove promene u boji delova cveta nisu uočene kod kontrolnih biljaka transformisanih praznim vektorom koje imaju tamno zelene cvetne drške (**Slika 14 e**).

#### **4.2.4. EKSPRESIONA ŠEMA *CRTB*-TRANSGENIH PERUNIKA**

Da bi se utvrdilo da li je *PLlccs* promotor zaista obezbedio cvet-specifičnu ekspresiju *crtB* transgena kod transgenih perunika, izveli smo ispitivanje ekspresije *crtB* transgena kod različitih delova biljke (standardima, folovima, tučkovima, plodnicima, prašnicima, cvetnim drškama, listovima i rizomu) koristeći RT-PCR. Pod kontrolom *PLlccs* došlo je do ekspresije *crtB* gena prvenstveno u cvetovima (standardima, folovima, tučkovima, plodnicima i prašnicima, **Slika 15**). Samo tragovi transkripta *crtB* gena su otkriveni, u listovima i rizomu transgenih biljaka perunike (**Slika 15**).



**Slika 15.** Analiza ekspresije *crtB* gena pod kontrolom PLlccs u različitim delovima (standardi, folovi, tučkovi, plodnici, prašnici, cvetne drške, listovi i rizomi) *crtB*-transgenih *I. germanica* 'Fire Bride' biljaka. Analiza ekspresije gena za 18S subjedinicu ribozomalne RNK je korišćena kao kontrola.

#### 4.2.5. UHPLC ANALIZA KAROTENOIDA U STANDARDIMA I FOLOVIMA *CRTB*-TRANSGENIH PERUNIKA

UHPLC analiza karotenoida sprovedena je na ekstraktima standarda i folova *crtB*-transgenih biljaka, kao i kontrolnih biljaka, da bi se utvrdile promene u sastavu karotenoidnih pigmenta usled stabilne integracije i ekspresije *crtB* transgena.

Kao što je ranije pomenuto roze boja standarda i folova cvetova *I. germanica* 'Fire Bride' posledica je akumulacije likopena. Profil karotenoida u standardima i folovima otvorenih cvetova *crtB*-transgenih biljaka bio je sličan onom kod kontrolnih biljaka. Standardi i folovi kontrolnih biljaka akumulirali su likopen u količini od 595  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW dok je kod *crtB*-transgenih biljaka uočeno akumuliranje likopena u standardima i folovima u količini od 521  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW (**Slike 16a, b; Tabela 6**). Veoma male količine drugih karotenoida osim likopena određene su u standardima i folovima kontrolnih cvetova mada su bile prisutne male količine neoksantina, violaksantina i luteina (**Slike 16a, b, Tabela 6**). Slično likopenu količine ovih karotenoida u *crtB*-transgenim biljkama bile su smanjene u poređenju sa kontrolnim biljkama (**Tabela 6**). Količina luteina u *crtB*-transgenim biljkama smanjena je za 48% dok su količine neoksantina i violaksantina smanjene za 43% odnosno 35% (**Tabela 6**). Kao što je ranije rečeno baze standarda i folova zadržavaju vidljive količine hlorofila i imaju svetlo-zelenu boju dok

su one kod *crtB*-transgenih biljaka narandžaste boje (Slika 5; Tabele 8A, B). Kvantitativna UHPLC analiza hlorofila je otkrila da se ovaj pigment akumulira u standardima i folovima kod cvetova kontrolnih biljaka. Sadržaj hlorofila je iznosio 120  $\mu\text{g g}^{-1}$  hlorofila a i 31  $\mu\text{g g}^{-1}$  hlorofila b, dok ovi pigmenti u *crtB*-transgenim biljakama nisu bili detektovani (Slike 16a, b; Tabela 6).

#### **4.2.6. UHPLC ANALIZA KAROTENOIDA U PLODNICIMA I CVETNIM DRŠKAMA *CRTB*-TRANSGENIH PERUNIKA**

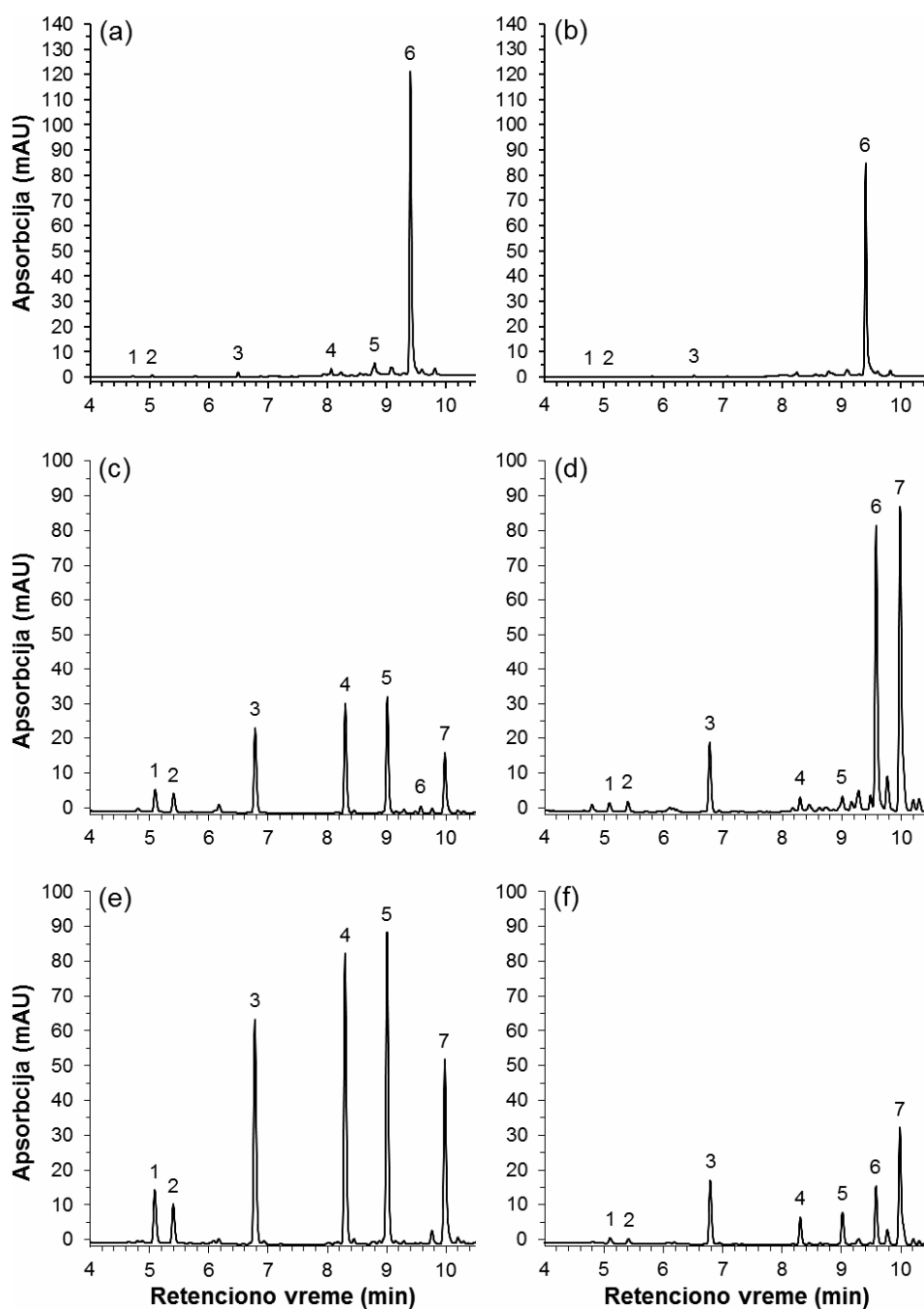
Kao što je opisano u sekciji 4.2.3. u poređenju sa kontrolnim biljkama *crtB*-transgene biljke pokazale su značajnu narandžastu pigmentaciju u prirodno zelenim delovima cveta, uključujući plodnike i cvetne drške (Slike 12, 13, 14). Takođe, UHPLC analiza karotenoida pokazala je da je promena boje plodnika *crtB*-transgenih biljaka prvenstveno posledica akumulacije velikih količina likopena i  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotena (nedovoljno razdvojenih vrhova, ovde i dalje predstavljeni kao jedna vrednost), koji su se akumulirali u količini od 184  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW odnosno 174  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW u poređenju sa 8  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW odnosno 52  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW u kontrolnim biljkama (Slike 16c, d; Tabela 6). Promena boje u zelenim tkivima posledica je takođe i približno desetostrukog smanjenja količine hlorofila a i b, od 680  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW odnosno 236  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW u kontrolnim biljkama do 67  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW odnosno 22  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW u *crtB*-transgenim biljkama (Slike 16c, d; Tabela 6). Dalja analiza je pokazala da su količine neoksantina, violaksantina i luteina znatno smanjene, za oko 2-3 puta, u poređenju sa kontrolnim biljkama (Slika 16c, d; Tabela 6).

Slični rezultati su dobijeni za cvetne drške *crtB*-transgenih biljaka kod kojih je promena boje prvenstveno posledica akumulacije likopena i velikog smanjenja koncentracije hlorofila a i b. Cvetne drške *crtB*-transgenih biljaka akumulirale su likopen u količini od 45  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW dok cvetne drške kontrolnih biljaka uopšte nisu akumulirale likopen (Slika 16e, f; Tabela 6). Količine hlorofila a i b u cvetnim drškama *crtB*-transgenih perunika su se smanjile u odnosu na kontrolne za oko osam odnosno



**Tabela 6.** Sastav i sadržaj karotenoida i hlorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$  suve mase) u nesaponifikovanim ekstraktima iz perigona cvetova (standarda i folova), plodnika i cvetnih drški kontrolnih (transformisanih „praznim vektorom“) i *crtB*-transgenih *I. germanica* ‘Fire Bride’ određenim na osnovu UHPLC analiza i poređenjem sa odgovarajućim standardima. (\*n.d.-nije detektovan)

Redni broj vrha	ID vrha	Perigon (standardi i folovi)		Plodnici		Cvetne drške	
		Kontrolni	<i>crtB</i> -transgeni	Kontrolni	<i>crtB</i> -transgeni	Kontrolni	<i>crtB</i> -transgeni
1	Neoksantin	3.25 ± 0.05	1.41 ± 0.10	25.98 ± 1.16	7.07 ± 0.06	37.40 ± 1.20	4.35 ± 0.48
2	Violaksantin	3.09 ± 0.08	1.09 ± 0.11	16.60 ± 0.70	6.44 ± 0.08	21.17 ± 0.66	3.17 ± 0.18
3	Lutein	5.41 ± 0.10	2.60 ± 0.17	62.95 ± 2.99	37.47 ± 0.27	103.42 ± 3.14	34.41 ± 2.34
4	Hlorofil b	30.76 ± 2.75	n.d.*	236.85 ± 11.15	22.03 ± 0.20	381.08 ± 12.09	40.91 ± 5.28
5	Hlorofil a	119.33 ± 11.93	n.d.	680.89 ± 31.81	67.04 ± 1.21	1100.32 ± 34.75	134.11 ± 16.05
6	Likopen	595.20 ± 33.27	521.60 ± 19.08	8.52 ± 1.05	184.04 ± 3.92	n.d.	45.64 ± 0.64
7	$\alpha$ + $\beta$ karoten	n.d.	n.d.	52.28 ± 2.40	174.19 ± 3.67	95.91 ± 2.24	70.19 ± 4.23



**Slika 16.** UHPLC hromatogrami karotenoidnih ekstraktata iz različitih delov cveta kontrolnih (transformisanih „praznim vektorom“) i *crtB*-transgenih *I. germanica* ‘Fire Bride’ biljaka. Standardi i folovi (a), plodnici (c) i cvetne drške (e) kontrolnih biljaka; Standardi i folovi (b), plodnici (d) i cvetne drške (f) *crtB*-transgenih biljaka. Vrhovi: (1) neoksantin; (2) violaksantin; (3) lutein; (4) hlorofil b; (5) hlorofil a; (6) likopen; i (7)  $\alpha$ -plus  $\beta$ -karoten.

devet puta (**Slike 16e, f; Tabela 6**). Međutim, slično kao kod plodnika, cvetne drške *crtB*-transgenih biljaka pokazale su znatno smanjenje količine neoksantina, violaksantina i luteina u poređenju sa kontrolnim. Kvantitativni podaci koji pokazuju sadržaj i sastav karotenoida i hlorofila u plodnicima i cvetnim drškama kontrolnih i *crtB*-transgenih biljaka prikazani su u **Tabeli 6**.

### **4.3. KLONIRANJE I FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA GENA ZA KAPSANTIN-KASPORUBIN SINTAZU (*LLCCS*) IZ TIGRASTOG LJILJANA (*LILIUM LANCIFOLIUM* THUNB. "SPLENDENS")**

#### **4.3.1. MOLEKULARNO KLONIRANJE I ANALIZA SEKVENCE *LLCCS* GENA**

Kloniranje gena započeto je tako što je prvo pomoću par heterolognih nedegenerisanih prajmera, forvardni Cs-F i reverzni Cs-R, amplifikovan DNK fragment (~400 bp) koji kodira predpostavljenu aminokiselinsku sekvencu koja je veoma slična onoj za likopen  $\beta$ -ciklazu (LCYB). Dva poravnavanja višestrukih sekvenci koji pokazuju poziciju i homologiju Cs-F i Cs-R prajmera u odnosu na *LllycB*, *Llccs* i *C. annuum ccs* (*Caccs*) gena su prikazani na **Slici 17a, b**. Određeni broj forvardnih prajmera dizajniran je na osnovu ove novoklonirane sekvence i upotrebljen u kombinaciji sa 3'-spoljašnjim prajmerom iz RACE kita. Nekoliko produkata 3'RACE bili su identični jedan drugom; međutim jedan od produkata je bio veoma sličan drugim ali je ipak bio različit. Zbog svega toga, koristeći ovaj pristup, bilo je moguće identifikovati dva različita gena koji su veoma slični kako LCYB genu iz različitih vrsta tako i CCS genu iz paprike.

Jedan od ova dva gena je kloniran pomoću forvardnog prajmera lcyB-3Rc u kombinaciji sa 3'-spoljašnjim prajmerom iz RACE kita. *LllycB* cDNK gen u punoj dužini od 1986 bp formiran je poravnavanjem i spajanjem DNK fragmenata dobijenih 3' i 5' RACE prajmerima. Gen sadrži ORF (sekvencu koja kodira protein) od 1500 bp, 5' UTR (5' regiju mRNK koja se ne prevodi) od 375 bp i 3' UTR (3' regiju mRNK koja se ne prevodi) sa poly (A) krajem nizvodno od stop kodona od 108 bp. Na osnovu analiza homologije ovaj gen je uslovno identifikovan kao gen za LCYB (GenBank pristupni broj GU471230).



U cilju analize novodobijene LICCS sekvence urađena su ispitivanja homologije upotrebom BLASTp, i kao što je pretpostavljeno, pokazalo se da je LICCS vrlo sličn genima LCYB, NSY i CCS genu paprike. Najveće sličnosti bile su sa likopen  $\beta$ -ciklazom iz *Citrus x paradisi* (GenBank pristupni broj ACR09635.1; 63% istovetnosti, 77% pozitivnosti; sa 96% pokrivenosti), neoksantin sintazom iz *Solanum lycopersicum* (GenBank pristupni broj CAB93342.1; (61% istovetnosti, 75% pozitivnosti; pokrivenost 97%) i kapsantin-kasporubin sintazom iz *Capsicum annuum* (GenBank pristupni broj Q42435.1; 60% istovetnosti, 75% pozitivnosti; pokrivenost 95%). Multi-sekvencijalno sparivanje izvedenih sekvenci aminokiselina LICCS i LILCYB gena sa *C. annuum* CCS prikazano je na **Slici 18**. Ovi rezultati potvrđuju da LICCS pripada familiji proteina likopen ciklaza u koju takođe spadaju likopen  $\beta$ -ciklaza (LCYB), lycopene  $\epsilon$ -ciklaza (LCYE) i neoksantin sintaza (NSY).

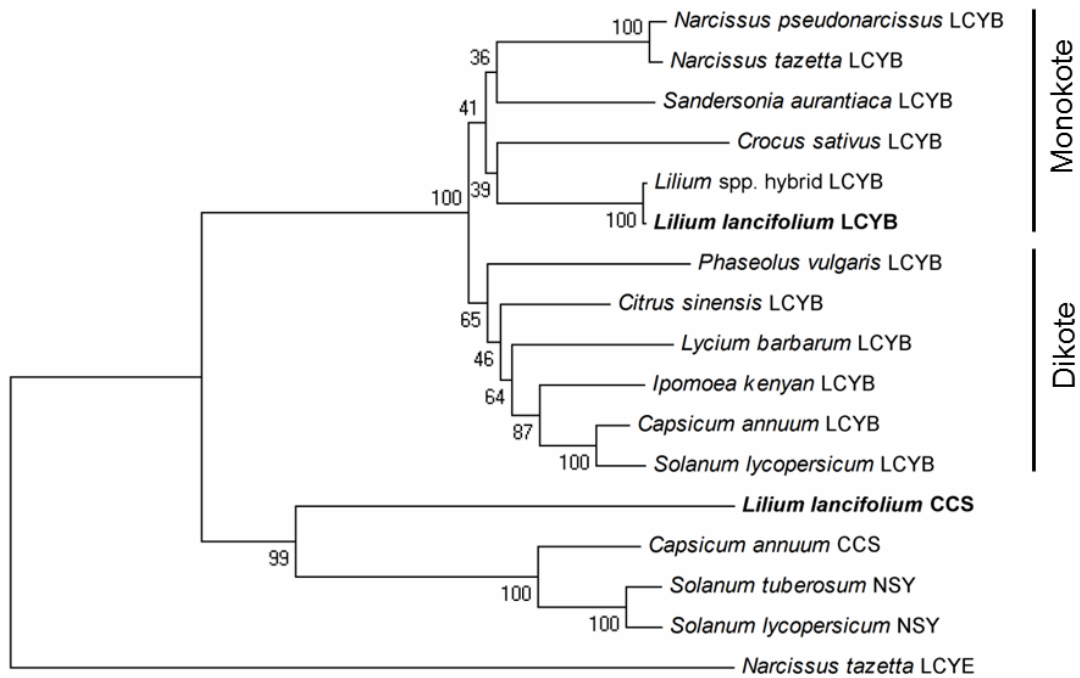
Pretraga motiva i ispitivanja homologije izvedene sekvence aminokiselina LICCS proteina otkrili su N-terminalni dinukleotid-vezujući motiv sa karakterističnom konfiguracijom za flavoproteine, poznatom kao „Rossmann fold” (Rossmann i sar., 1974; Mialoundama i sar., 2010). Takođe je identifikovan i 269-FLEET-273 motiv sa dva tandem Glu (E) ostatka koji je od suštinskog značaja kako za  $\beta$ - tako i za  $\kappa$ -ciklaznu aktivnost CCS gena paprike (**Slika 18**; Bouvier i sar., 1997; Mialoundama i sar., 2010). Pored FLEET motiva, Mialoundama i sar., (2010) otkrili su još pet aminokiselina sa važnim katalitičkim ulogama u CCS paprike (Asp-127, Asp-259, Glu-128, Glu-332 i His-360) koje su sve sačuvane u LICCS (Asp-102, Asp-235, Glu-103, Glu-308 i His-336, **Slika 18**).

Pomoću TargetP 1.1 alata za pretraživanje (na sajtu <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) urađena je analiza radi utvrđivanje prisustva sekvence tranzitnog peptida (TP) u LICCS sa ciljem da se predvidi subcelularna lokacija enzima. Na taj način otkrivena je N-terminalna sekvenca (tj. TP) koja usmerava enzim u plastide. Sekvenca FLDLT od mesta odvajanja TP prikazana je na **Slici 18** (Bouvier i sar., 2000). Aminokiselinska sekvenca LICCS gena je vrlo slična CCS genu paprike sa izuzetkom N-terminalnog TP (**Slika 18**).

LlCCS	1	MSTLQLPALLTAGETRHPS---R-----R TK-CSSL
CaCCS	1	METLLKPF--PSPLSIPNPMYSFKHNSFPNPTKQK--SRKFVY---RNKSSTHF
LlLCYB	1	MDTILRTH--SRLELSHEL---RGFADROSLPSSPKQPRFCGRKPNWTSCKQASA-MATF
LlCCS	28	RSFLDLTPVSKPEPTLDIDIPYHDPS-SAHRVDAATIIGCGPAGLR LAECAAAARGLRVCCID
CaCCS	52	CSFLDLAPTSKPESELDVNISWVDTDLDGAEFDVIIIGTGPAGLR LAEQVSKYGIKVCVVD
LlLCYB	55	SFLDLVPETKKENLDFDLPLYDPS-KGLTVDLAIVGGGPAGLAVAQQVSEAGLSVCSID
LlCCS	87	EAPLSPWPNNYGAWLDELHPLGLASIFDHIWPTATIAIDGDNIKHLSRPYGRVNRSSLKT
CaCCS	112	PSPLSMWPNNYGWVDFEFKLGLEDCLDHKNPVS CVHISDHKTKVLD RPYGRVSRKKLKL
LlLCYB	114	ESPKVLPWNNYGWVDFEFAMGLLDCIDTSW SGATVYIDEGSKVLD RPYARVNRKQLKS
LlCCS	147	LLENC TTTGVRFHPSKAWNIEHEELRSSVSCSDGSAVTASLVIDAGCFSTPFIEYDRPR
CaCCS	172	KLLNSCVENRVKFKAKV LKVKVHEEFESSIVCDDGRKISGSLIVDASGYASDFVIEDKPR
LlLCYB	174	KMMQK CIMNGVKFHQAKVIKVVHEEMKSLVVCNDGVTIQATVVLDAICFSRCLVQYQEPKY
LlCCS	207	NRRGYQIAHGILAEVNRHPPFDLNOMLLMDWSDAHLDNEPHLRAHNAAIPTFLYAMPFNEEN
CaCCS	232	N-HGYQVAHGILAEVDNHPFDL DKMMLMDWRD SHLGNPEYLRVKNTEPTFLYAMPFDRN
LlLCYB	234	N-PGYQVAVGILAEVEEHPPFDL DKMFLMDWRD SHLKDGEIKERNSEIPTFLYAMPFSSE
LlCCS	267	LVFLEETSLVGRPVLDYSEVKKRMVARLRHLG IKVERVLEEEKCLFPMGGPLPRMPQVRVM
CaCCS	291	LVFLEETSLVSRPMLSXMEVKKRMVARLRHLG IKVRSVLEEEKCVITMGGPLPRIPQNVVM
LlLCYB	293	RFLEETSLVARPGLRMEIDQERMVARLRHLG IKVKSTIEEDERCVIPMGGPLPVLPRQVV
LlCCS	327	GYGGAGGMVHPSSGYQIARALALAPELAEAMVECLGSTRMITGKSNCKVWGS LWPAGRR
CaCCS	351	ATGGTSGIVHPSSGYMVARSMALAPVLAEAIVE SLGSTRMIRGSQLYHRVWNGLWPSDRR
LlLCYB	353	GIGGTAGMVHPSTGYMVARLLAAAPIVAKSTVRF LGS DHGLL GRELSAEVWKDLWPIERR
LlCCS	387	WEREYCYFCGMETLLSLDKOTRRFFDAFFNLEPRYWHGFMSSRLSTETELAQLSLSLFAHA
CaCCS	411	RVRECYFCGMETLLKLDLEGRRLFDFAFFVDPKYWHGFLSSRLSRELAVLSLYLFLGHA
LlLCYB	413	RQREFFCFGMVLLKLDLQGRGFFDAFFDLEPRYWHGFLSSRLFPELFFFGLSLFKNA
LlCCS	447	SWKSRVDVVTCKCPLPLARMIGNLALQAI
CaCCS	471	SNLARLDIVTKCTVPLVKILGNLAIESL
LlLCYB	473	SNTSRLEIMAKGTVPLVNMLNLLQDRD

**Slika 18.** Multi-sekvencijalno sparivanje izvedenih aminokiselinskih sekvenci kapsantin-kaposrubin sintaze (LICCS) iz *L. lancifolium* (GenBank pristupni broj JF304153), kapsantin-kaposrubin sintaze (CaCCS) iz *C. annuum* (GenBank pristupni broj Q42435.1) i likopen  $\beta$ -ciklaze (LlLCYB) iz *L. lancifolium* (GenBank pristupni broj GU471230). Bela slova na crnoj pozadini označavaju globalno konzervirane ostatke; crna slova na svetlosivoj podlozi označavaju identične ostatke a bela slova na tamnosivoj podlozi označavaju slične aminokiselinske ostatke. Crtice predstavljaju praznine uvedene da bi se poboljšalo sparivanje. Mesto restrikcije (odsecanja) N-terminalnog tranzitnog peptida (TP) je označeno posebnim kvadratom. Pozicija heterolognog nedegenerisanog prajmera (ccs-3Rc) korišćenog kod 3'RACE *Llccs* gena je označena strelicom. Konzervirani FLEET motiv koji je esencijalan i za  $\beta$ - i za  $\kappa$ -ciklaznu aktivnost je podvučen. Crni trouglovi označavaju konzervirane aminokiseline sa značajnom katalitičkom ulogom kao što su identifikovali Mialoundama i sar., (2010).

Uporedna filogenetska analiza LICCS sa CCS, NSY, LCYB i LCYE iz drugih biljnih vrsta (**Slika 19**) pokazala je da NSY i CCS proteini dele zajedničkog evolutivnog pretka koji je najrodniji LYCB genu dok LCYE formira posebnu grupu. LCYB grupa je dalje podeljena na dve posebne podgrupe koje čine monokotiledone odnosno dikotiledone biljne vrste (**Slika 19**). Na osnovu testa za procentnu podudarnost izvedenog iz „bootstrap“ testa sa 1000 replikacija može se zaključiti da su ova grupisanja posledica jakih veza u evolutivnoj prošlosti.



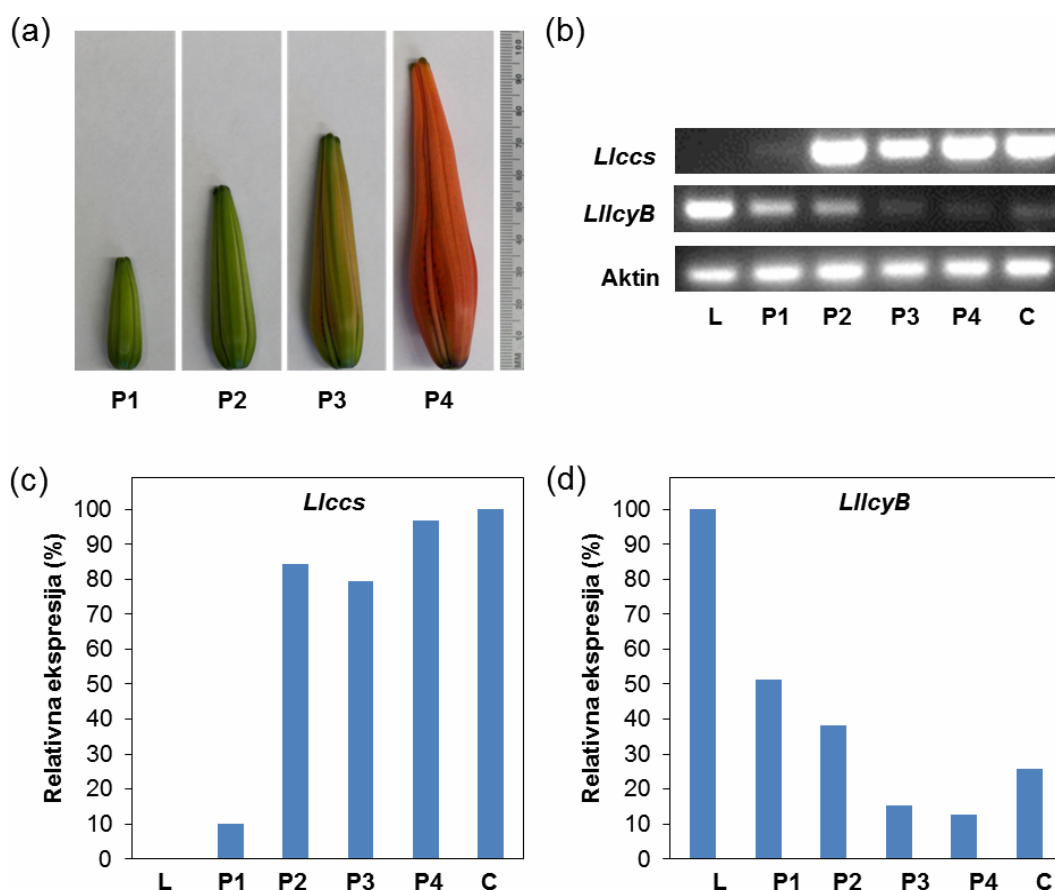
**Slika 19.** Filogenetsko stablo na bazi aminokiselinskih sekvenci LCYB gena iz šest monokotiledonih vrsta [*Crocus sativus* (ADA82241.1), *Narcissus pseudonarcissus* (ACT78995.1), *Narcissus tazetta* (AFH53820.1), *Sandersonia aurantiaca* (AAL92175.1), Hibrid azijskog ljljajana (*Lilium* spp.) (BAH10590.1), *Lilium lancifolium* (JF304153)] i šest dikotiledonih vrsta [*Capsicum annuum* (ADH04271.1), *Solanum lycopersium* (NP001234226.1), *Ipomoea kenyan* (BAI47577.1), *Citrus sinensis* (AAM21152.1), *Phaseolus vulgaris* (ADX60450.1), *Lycium barbarum* (AAW88382.1)], NSY iz *Solanum tuberosum* (Q9M424.1) i *Solanum lycopersicum* (CAB93342.1), CCS iz *Capsicum annuum* (Q42435.1) i *Lilium lancifolium* (JF304153), i LCYE iz *Narcissus tazetta* (AFG19394.1). LCYE je odabran zbog toga što je to likopen ciklaza koja je vrlo srodna gore navedenim enzimima, a koja katalizuje formiranje  $\epsilon$ -prstenova u  $\beta, \epsilon$  grani biosintetičkog puta karotenoida. Vrednosti prikazane na čvorovima predstavljaju procenat sličnosti izračunat pomoću „bootstrapping“ testa sa 1000 replikacija.

Pored toga, ranije je pokazano da CCS takođe može da katalizuje sintezu  $\beta$ -karotena iz likopena sa efikasnošću od približno 10-20% tj. da poseduje  $\beta$ -ciklaznu aktivnost, dok  $\epsilon$ -ciklazna aktivnost nije utvrđena (Hugueney i sar., 1995). Takođe, analiza LICCS gena pomoću BLASTp otkrila je da je jedan od najbližnjih LCYE gena (*Narcissus tazetta*; GenBank pristupni broj AFG19394.1) imao samo 35% identičnosti i 53% pozitivnosti, (pokrivenost 89%) , dok je najbližnji LCYB gen (*Citrus x paradise*; GenBank pristupni broj ACR09635.1) imao 63% identičnosti i 77% pozitivnost (pokrivenost 96%) ukazujući na to da je CCS gen više srodniji LCYB nego LCYE genu.

Sve ove analize podržavaju početnu pretpostavku da klonirani protein predstavlja CCS gen ljiljana. Njegova konačna identifikacija potvrđena je putem funkcionalne ekspresije u kalusu perunike (pogledati sekciju 4.3.3.).

#### 4.3.2. EKSPRESIJA *LLCCS* I *LLICYB* GENA KOD *L. LANCIFOLIUM*

Analiza ekspresije *LlcyB* i *Llccs* kandidat gena u različitim tkivima ljiljana izvršena je tehnikom RT-PCR korišćenjem ukupne RNK iz perijanta cvetnih pupoljaka (iz 4 razvojnog stadijuma), potpuno otvorenih cvetova i listova (Slika 20 a-d).



**Slika 20.** Analiza ekspresije *Llccs* i *LlcyB* gena kod *L. lancifolium*. **(a)** Stadijumi razvoja pupoljaka (P1-P4). **(b)** Rezultati ispitivanja RT-PCR metodom koji prikazuju relativne nivoe transkripata *Llccs* i *LlcyB* gena sa genom za aktin ljiljana kao kontrolom za normalizaciju, u listovima (L), pupoljcima (P1-P4) i potpuno otvorenim cvetovima (C). Relativni nivoui ekspresije **(c)** *Llccs* gena i **(d)** *LlcyB* gena normalizovanih u odnosu na ekspresiju gena za aktin i izraženih kao procenat maksimalnog nivoa ekspresije.



Za *Llccs* je utvrđeno da je do njegove ekspresije došlo samo u perijantu cvetova, ali ne i u vegetativnim tkivima tj. listovima (**Slika 20b, c**).

Nasuprot *Llccs* genu do ekspresije *LlcyB* gena došlo je i u listovima i u cvetovima (**Slika 20b, d**). Najviši nivo transkripta *LlcyB* gena otkriven je u listovima. Nivo transkripcije *LlcyB* gena je u obrnutoj korelaciji sa obojenošću perijanta i smanjuje se kako se cvetni pupoljci razvijaju (**Slika 20b, d**).

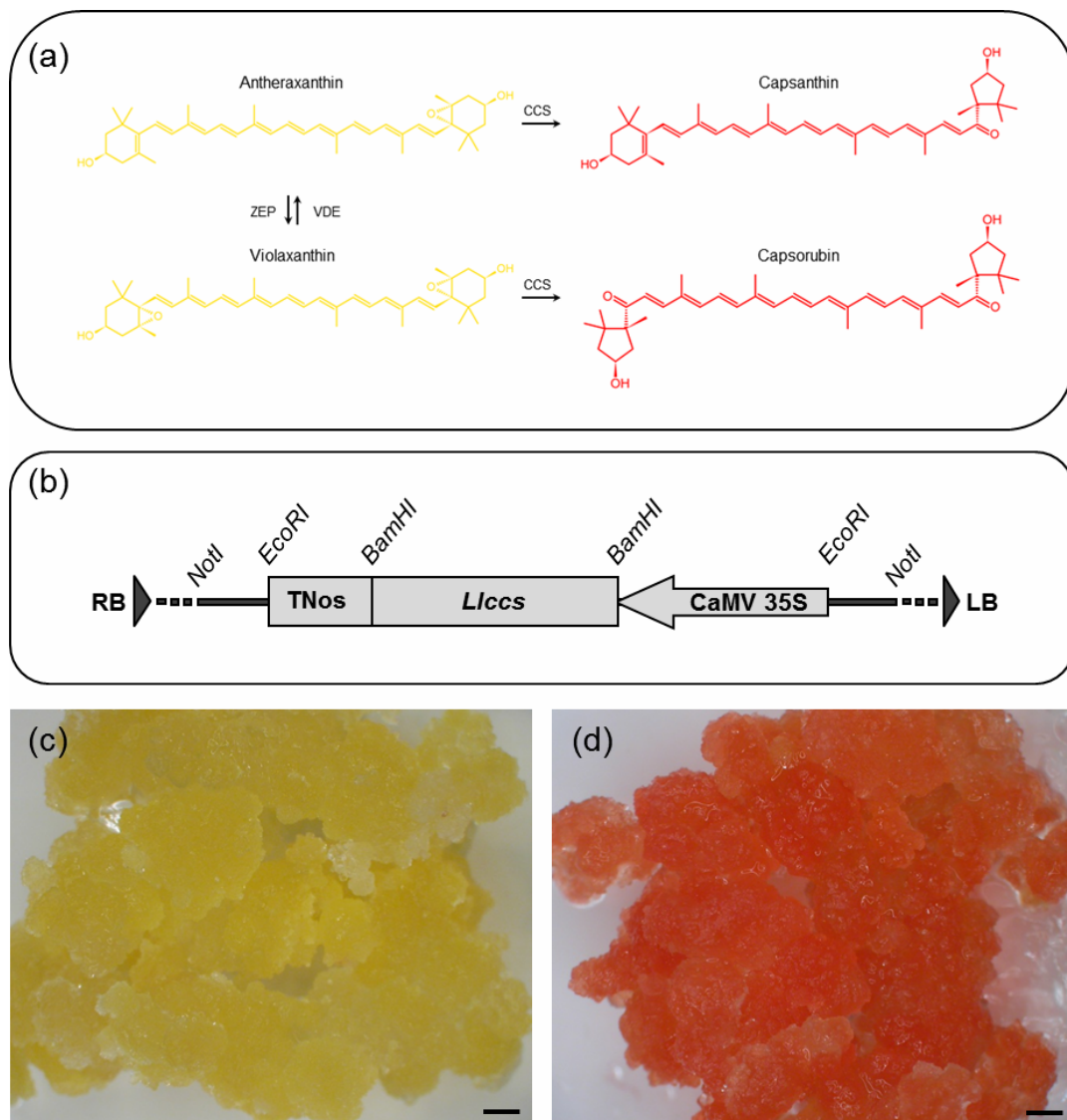
#### 4.3.3. EKSPRESIJA *LLCCS* TRANSGENA U KALUSNOM TKIVU *I. GERMANICA*

Novoklonirani *Llccs* kandidat gen je funkcionalno analiziran kroz stabilnu transformaciju u kalusnom tkivu perunike (*I. germanica* 'Hot Property') čija je prirodno žuta boja posledica akumulacije nekoliko ksantofila kao što je violaksantin, prekursor kapsorubina (**Slika 21a**).

*Agrobacterium*-posredovana transformacija je urađena pomoću binarnog plazmida pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos koji nosi *Llccs* pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S promotora (**Slika 21b**). Ukupno je dobijeno sedam zasebnih *Llccs*-transgenih kalusa i pomoću GUS bojenja i PCR analize potvrđena stabilna transformacija *Llccs*-transgena. *Llccs*-transgeni kalusi promenili su boju iz prirodne žute u više nijansi crveno-narandžaste različitog intenziteta u nezavisnim transgenim linijama (**Slika 21c, d**).

Ovi rezultati ukazuju na to da je *Llccs* funkcionalan gen i da je odgovoran za pojavu ove nove crveno-narandžaste boje u kalusnim kulturama perunike. Dve nezavisne transgene linije koje su pokazale najveću promenu boje, označene kao *Llccs*-1 i *Llccs*-2, odabrane su za dalje ispitivanje.

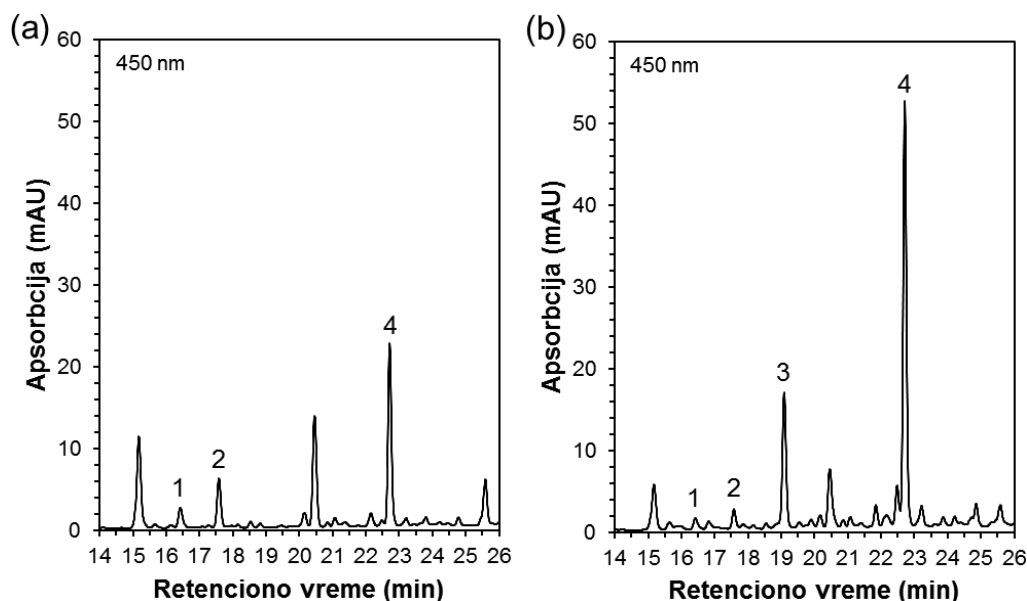
Transgene perunike iz ovih kalusa nisu regenerisane. Regeneracija biljaka nije postignuta nikada, ni kod netransformisanih kalusa, kao ni kod *Llccs*-transgenih kalusa. I pored mnogobrojnih pokušaja, uz korišćenje smene velikog broja različitih hranljivih podloga i kombinacija regulatora rastenja biljaka do indukcije somatskih embriona i/ili primordija izdanaka nije dolazilo. Može se pretpostaviti da je razlog tome što je ispitivani kutivar imao generalno vrlo slab morfogenetski potencijal, iako je pokazao dobro rastenje u vidu nediferenciranog kalusnog tkiva odnosno ćelijskih suspenzija.



**Slika 21.** (a) Šematski prikaz biosinteze kapsantina i kaporubina iz anteraksantina i violaksantina katalizovane kapsantin-kaporubin sintazom; (b) Deo mape T-DNK regiona pWBVec10a/CaMV35S::*Llccs*::TNos binarnog transformacionog vektora koja pokazuje ekspresionu kasetu koja uključuje gen za kapsantin-kaporubin sintazu (*Llccs*) pod kontrolom CaMV 35S promotora i Nos terminatora; (c) Kontrolni (netransformisani) kalus *Iris germanica* 'Hot Property'. (d) *Llccs*-transgeni kalus *Iris germanica* 'Hot Property' koji je akumulirao kapsantin i kaporubin. ZEP, zeaksantin epoksidaza; VDE, violaksantin de-epoksidaza; CCS, kapsantin-kaporubin sintaza; RB, „right border“ (desna granica); LB, „left border“ (leva granica). Barovi: 1 mm.

4.3.4. HPLC ANALIZE KAROTENOIDA U *LLCCS*-TRANSGENIM KALUSIMA *I. GERMANICA*

HPLC analize karotenoidnih pigmenata urađene su na dva tipa uzoraka: sa nesaponifikovanim i saponifikovanim uzorcima netransformisanih i dve nezavisne linije (Llccs-1 i Llccs-2) *Llccs*-transgenih kalusa perunike (Slika 22a, b i Tabela 7).



**Slika 22.** HPLC hromatogrami nesaponifikovanih karotenoidnih ekstrakata iz kontrolnog (netransformisanog) kalusa (a) i *Llccs*-transgenog kalusa *I. germanica* 'Hot Property' (b). Vrh kapsantina (3) na 19 min u hromatogramu (b) je identifikovan upoređivanjem njegovog retencionog vremena i spektralnih karakteristika sa onim kod odgovarajućeg standarda kapsantina. Vrhovi: (1) neoksantin; (2) violaksantin; (3) kapsantin i (4) lutein.

U transgenim kalusima novi karotenoidni vrh se pojavio na hromatogramu 19 minuta nakon početka HPLC analize (Slika 22b). Retenciono vreme i spektroskopske karakteristike ovog vrha u poređenju sa odgovarajućim standardom kapsantina ukazuju na to da je ovaj karotenoid kapsantin (Slika 22b). Ovaj novi vrh nije detektovan kod netransformisanih kontrolnih kalusa (Slika 22a). Dve nezavisne *Llccs*-transgene kalusne linije (Llccs-1 i Llccs-2) akumulirale su kapsantin u svom slobodnom, neesterifikovanom obliku, u količini od 1.8 odnosno 2  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW; međutim, količina ukupnog kapsantina (neesterifikovanog i esterifikovanog) bila je mnogo veća, 10

**Tabela 7.** Sastav i sadržaj karotenoida ( $\mu\text{g g}^{-1}$  suve mase) u nesaponifikovanim i saponifikovanim ekstraktima iz kontrolnog (netransformisanog) kalusa i dve nezavisne *Llccs*-transgene kalusne linije (*Llccs*-1 and *Llccs*-2) perunike (*I. germanica* ‘Hot Property’) određenim na osnovu HPLC analiza i poređenjem sa odgovarajućim standardima. (\* n.d.- nije detektovan)

Redni broj vrha	ID vrha	Nesaponifikovani uzorci			Saponifikovani uzorci		
		Kontrolni	<i>Llccs</i> -1 transgeni	<i>Llccs</i> -2 transgeni	Kontrolni	<i>Llccs</i> -1 transgeni	<i>Llccs</i> -2 transgeni
1	Neoksantin	0.38	0.24	n.d.*	2.13	n.d.	n.d.
2	Violaksantin	0.73	0.34	0.58	2.34	n.d.	2.20
3	<b>Kapsantin</b>	n.d.	<b>1.99</b>	<b>1.81</b>	n.d.	<b>9.65</b>	<b>12.83</b>
4	Lutein	2.13	4.89	0.92	7.21	10.97	3.80

odnosno  $13 \mu\text{g g}^{-1}$  DW (**Tabela 7**). Nakon saponifikacije ekstrakta karotenoida količina slobodnog, neesterifikovanog, kapsantina u dve nezavisne transgene linije povećala se otprilike 5-7 puta, ukazujući na to da se 80% do 85% kapsantina u hromoplastima *Llccs*-transgenog kalusa perunike nalazi u esterifikovanom obliku.

Identifikacija kapsorubina u kalusima transgenih biljaka HPLC metodom nije mogla da se izvede zbog nedostatka odgovarajućeg standarda kapsorubina.

#### 4.3.5. UPLC-MS/MS ISPITIVANJE KAROTENOIDA U *LLCCS*-TRANSGENIM KALUSIMA *I. GERMANICA*

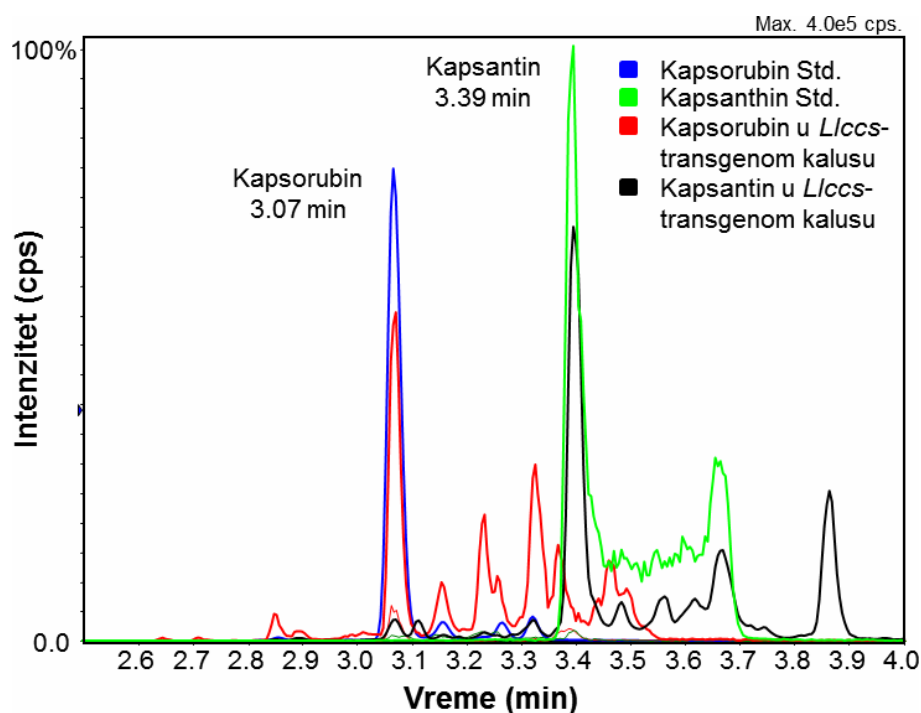
Kapsantin i kapsorubin standardi su kasnije nabavljeni od CarotNature (Lupsingen, Švajcarska) i korišćeni za UPLC-MS/MS ispitivanje karotenoida ekstrahovanih iz *Llccs*-transgenog kalusa perunike. Upotrebom ABSciex 5600 Triple ToF (Foster City, CA, USA), masenog spektrometra velike brzine skeniranja i visoke rezolucije povezanog sa Shimadzu Prominence LC-30AD (Columbia, MD, USA).

UPLC sistemom potvrđene su mase i retenciona vremena kao i predviđene šeme fragmentacije standarda kapsantina i kapsorubina, a rezultati su zatim upoređeni sa ekstraktom dobijenim iz crveno-narandžastog *Llccs*-transgenog kalusa perunike (**Slika 23**; **Slika 24 a-d**).

Retenciono vreme i precizno izračunata masa kapsorubina ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$ )<sup>H+</sup> u ekstraktu iz *Llccs*-transgenog kalusa perunike bili su 3.067 min i  $m/z$  od 601.4260 +0.5 ppm (**Slika 24c**). Retenciono vreme i precizno izračunata masa kapsantina ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_3$ )<sup>H+</sup> u ekstraktu iz *Llccs*-transgenog kalusa perunike iznosili su 3.395 min i  $m/z$  od 585.4304 -0.6 ppm (**Slika 24d**).

Rezultati UPLC-MS/MS ispitivanja za kapsorubin i kapsantin iz uzoraka *Llccs*-transgenog kalusa perunike (**Slika 24c, d**) bili su u skladu sa rezultatima dobijenim za standarde kapsorubina i kapsantina (**Slika 24a, b**).

Možemo zaključiti da je UPLC-MS/MS analiza pokazala da se i kapsorubin i kapsantin akumuliraju u crveno-narandžastom *Llccs*-transgenom kalusu perunike (**Slika 24**).

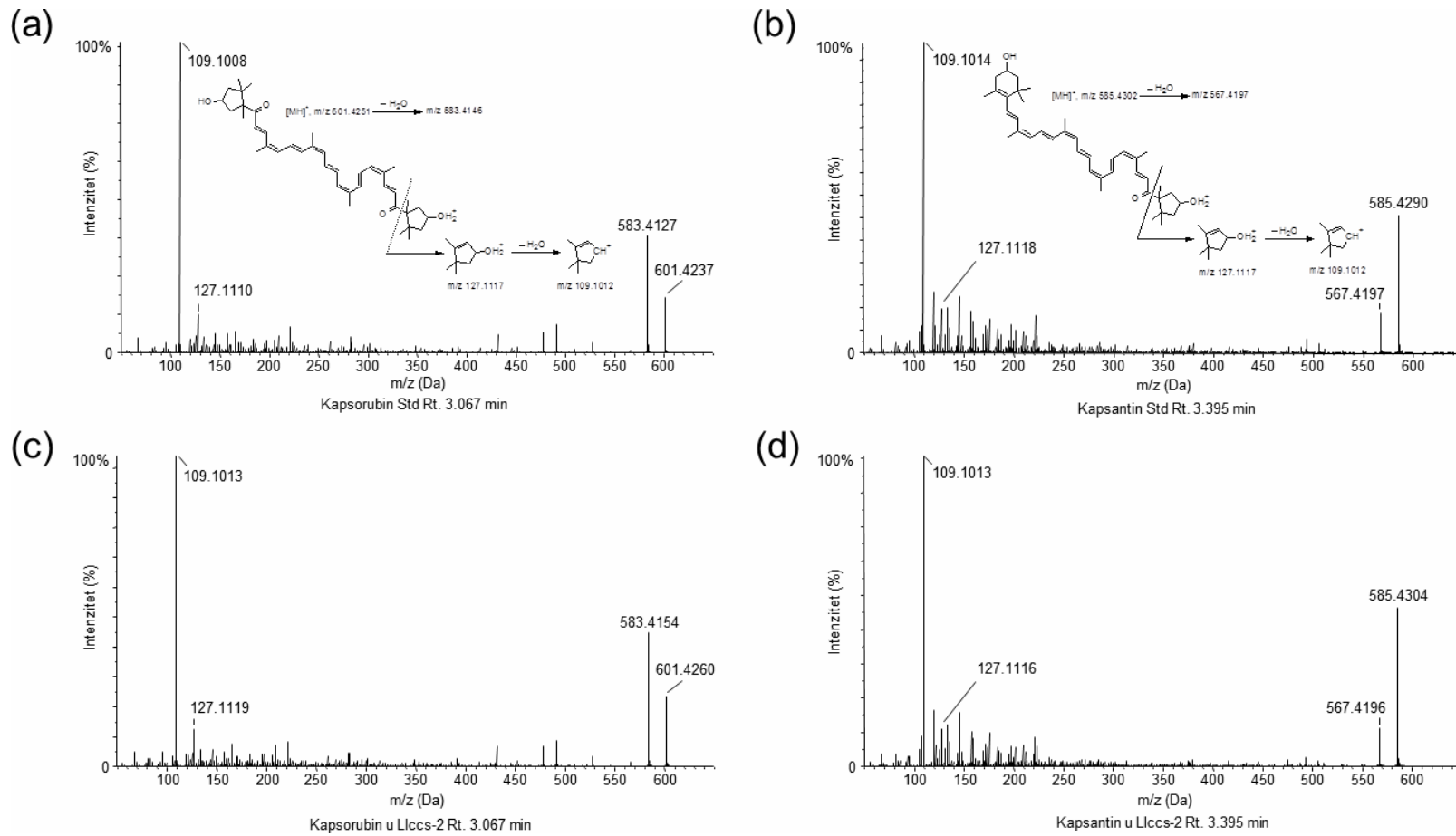


**Slika 23.** Analiza kapsorubina i kapsantina u *LlcCs*-transgenom kalusu perunike UPLC-MS/MS metodom. Preklapanje ekstahovanih jon hromatograma standarda (Std) za kapsorubin i kapsantin i onih dobijenih za kapsorubin i kapsantin u ekstraktu karotenoida iz *LlcCs*-transgenih kalusa *I. germanica* 'Hot Property' (*LlcCs*-2).

#### 4.3.6. KLONIRANJE PROMOTORA *LLCCS* GENA

Kloniranje *LlcCs* gena omogućilo je i kloniranje njegovog uzvodnog regulatornog regiona odnosno njegovog promotora (dužine 1877 bp).

Nakon preliminarnog sekvenciranja, produkt LDI-PCR reakcije nastao posle digeracije sa *BamHI* odabran je za dalju karakterizaciju jer je pretpostavljeno da, zbog svoje dužine (6000-7000 bp), najverovatnije sadrži kompletan *LlcCs* lokus sa njegovim regulatornim regionima. Nakon sekvenciranja, dizajnirana su dva prajmera (L-*LlcCs*-F i L-*LlcCs*-R) koja su upotrebljena za amplifikaciju celog *LlcCs* lokusa. Sama amplifikacija je obuhvatala promotorski region od 1877 bp uzvodno od mesta inicijacije transkripcije, 5' UTR od 94 bp, *LlcCs* ORF od 1425 bp i 3' UTR od 425 bp sa poli(A) krajem i pretpostavljenim PoliA signalom nizvodno od terminacionog kodona (GenBank pristupni broj GU443955).



**Slika 24.** Identifikacija kapsorubina i kapsantina UPLC-MS/MS metodom u *LlcCs*-transgenom kalusu *I. germanica* ‘Hot Property’ (*LlcCs*-2). Gornji paneli: UPLC-MS/MS spektar koji predstavlja šemu fragmentacije utvrđenu za **(a)** kapsorubin i **(b)** kapsantin standarde. Donji paneli: odgovarajući UPLC-MS/MS spektar koji predstavlja šemu fragmentacije utvrđenu za kapsorubin **(c)** i kapsantin **(d)** u *LlcCs*-transgenom kalusu.

#### 4.4. PROMENA BOJE CVETA PARADAJZA (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) 'MONEYMAKER' PUTEM METABOLIČKOG INŽENJERINGA KAPSANTIN-KAPSORUBIN BIOSINTETIČKOG PUTA UPOTREBOM *LLCCS* GENA IZ *LILIUM LANCIFOLIUM*

Sposobnost novokloniranog *Llccs* gena da izmeni boju cveta testirana je i na paradajzu, dikotiledonoj biljci koja je dobar model sistem za istraživanje biosintetskog puta karotenoida. Cvetovi paradajza prirodno akumuliraju prekursore kapsantina i kapsorubina pa su podestni za promenu boje cvetova putem metaboličkog inženjeringa pomoću *Llccs* gena koja bi bila rezultat povećanog akumuliranja ovih  $\kappa$ -karotenoida.

##### 4.4.1. REGENERACIJA *LLCCS*-TRANSGENIH BILJAKA PARADAJZA

Uspešno su regenerisane tri nezavisne transgene linije paradajza i odgajene do fiziološke zrelosti i cvetanja u uslovima staklenika. Do ekspresije *Llccs* gena u transformantima došlo je pod kontrolom himernog promotora E35S-PchsA koji uključuje promotor sekvencu (~ 220 bp) *chsA* gena spojenu sa pojačavač regionom CaMV 35S promotora (**Slika 25**).

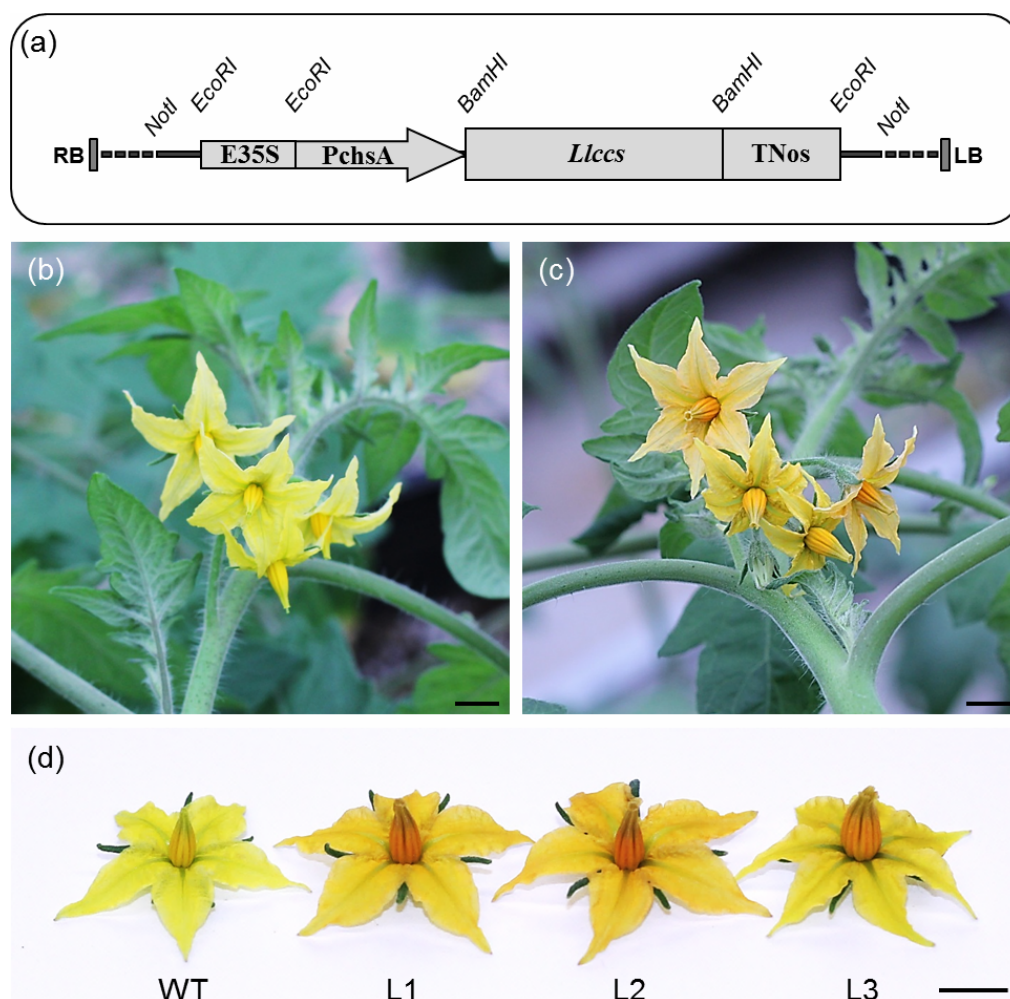
Relativno niska efikasnost transformacije i regeneracije transgenog paradajza posledica je najverovatnije visoke osetljivosti tkiva paradajza čak i na vrlo niske koncentracije higromicina (2-5 mg L<sup>-1</sup>) koje su korišćene za selekciju stabilnih transformisanih biljaka.

##### 4.4.2. FENOTIPSKE PROMENE KOD *LLCCS*-TRANSGENIH BILJAKA PARADAJZA

Delovi cvetova (krunice i prašnici) *Llccs*-transgenih biljaka paradajza promenili su boju od prirodno žute u različite nijanse narandžaste (**Slika 25b-e**). Krunični listićicvetova transgenih linija L1 i L2 su bili narandžasti dok su prašnici bili crveno-narandžasti.

Nijanse kruničnih listića cvetova transgene linije L3 su bile svetlije od onih koje su uočene kod L1 i L2 linije transgenih biljaka (**Slika 25c-e**)



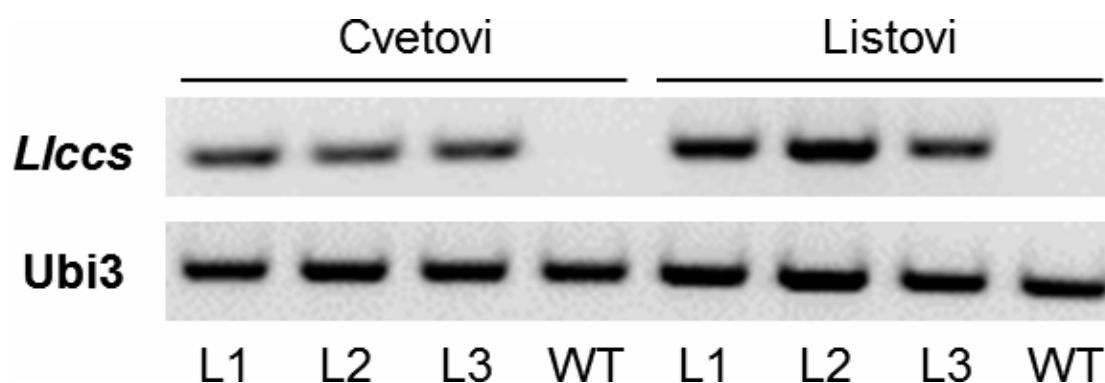


**Slika 25.** (a) Parcijalna mapa T-DNK regiona pWBVec10a/E35S-PchsA::*Llccs*::TNos binarnog transformacionog vektora koja prikazuje ekspresionu kasetu koja uključuje gen za kapsantin-kasporubin sintazu pod kontrolom E35S-PchsA himernog promotora i Nos terminatora. Promene boje cveta kod *Llccs*-transgenog paradajza: (b) netransformisana biljka u cvatu; (c) *Llccs*-transgena linija L2 u cvatu; (d) Individulani cvetovi netransformisanog paradajza, (WT, *eng.* wild type), *Llccs*-transgene linije L1, L2 i L3. Barovi: 5 mm (b, c) i 1 cm (d).

#### 4.4.3. ISPITIVANJE EKSPRESIJE *LLCCS* TRANSGENA KOD TRANSGENIH BILJAKA PARADAJZA

Da bi se utvrdilo da li upotrebljeni E35S-PchsA promotor daje cvet-specifičnu ekspresiju *Llccs* transgena ispitivana je ekspresija ovog gena primenom RT-PCR metode. Upoređivana je ekspresija u delovima cvetova (krunica i prašnika) i

vegetativnim tkivima (listova) transgenih i netransformisanih biljaka paradajza. Ispitivanjem ekspresije je pokazano da se ekspresija *Llccs* transgena javlja u cvetovima *Llccs*-transgenih biljaka paradajza (Slika 26).



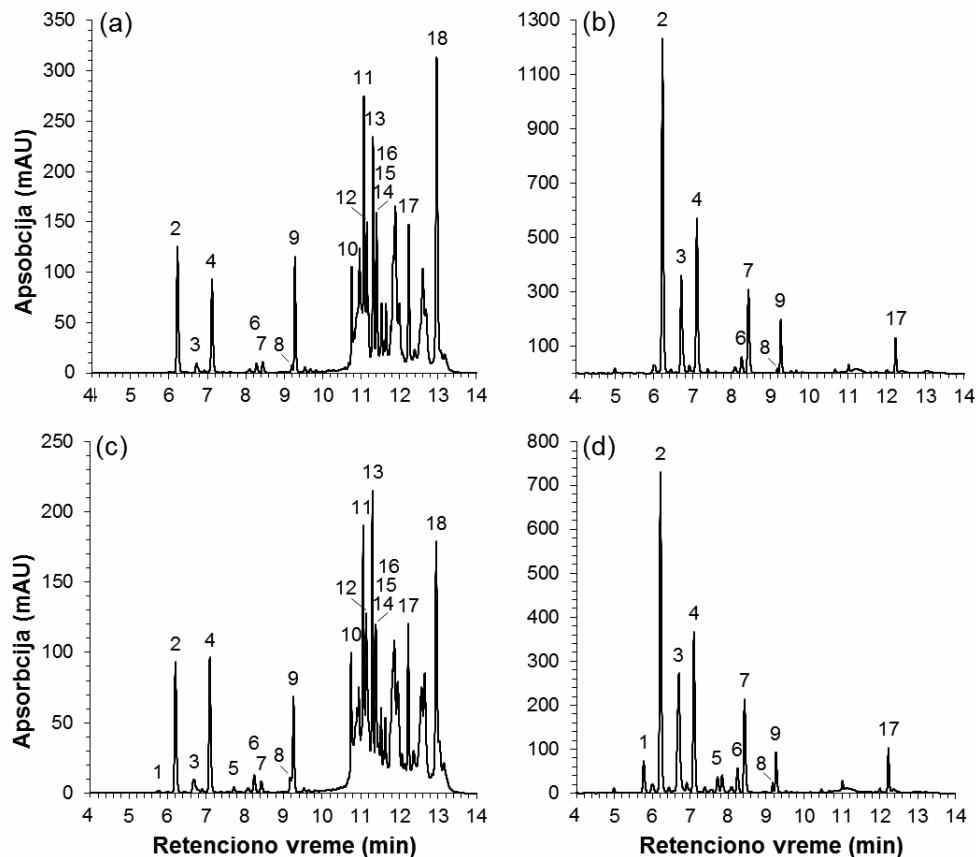
**Slika 26.** Analiza ekspresije *Llccs* gena pod kontrolom E35S-PchsA promotora u cvetovima (kronicama i prašnicima) i listovima netransformisanog divljeg tipa (WT) i *Llccs*-transgenim *S. lycopersicum* ‘Moneymaker’ biljkama, transgenim linijama L1, L2 i L3. Analiza ekspresije gena za ubikvitin (*Ubi3*) je korišćena kao kontrola.

Međutim, ove studije su takođe pokazale da E35S-PchsA promotor nije cvet-specifičan s obzirom na to da je utvrđeno da je došlo do ekspresije *Llccs* gena i u vegetativnim tkivima (listovima, Slika 26). Ispitivanje RT-PCR metodom pokazalo je da su relativno viši nivoi *Llccs* transkripta bili prisutni u listovima nego u cvetovima (Slika 26).

#### 4.4.4. UPOREDNA ANALIZA SADRŽAJA KAROTENOIDA U CVETOVIMA NETRANSFORMISANIH I *LLCCS*-TRANSGENIH BILJAKA PARADAJZA METODOM UHPLC

UHPLC metod je korišćen za ispitivanje karotenoidnih pigmenata potpuno otvorenih cvetova (krunica i prašnika) netransformisanih i *Llccs*-transgenih (L1) biljaka paradajza. Dobro je poznato da su karotenoidi uglavnom prisutni u esterifikovanim oblicima u hromoplastima viših biljaka. Esterifikacija karotenoida izaziva promenu retencionog vremena tokom ispitivanja metodom UHPLC proizvodeći veoma složene hromatograme, što komplikuje njihovu identifikaciju. Kvantitativno i kvalitativno ispitivanje karotenoidnih ekstrakata iz cvetova paradajza obavljeno je i sa

nesaponifikovanim i sa saponifikovanim uzorcima (Slika 27, Tabela 8). Analiza karotenoida metodom UHPLC pokazala je prisustvo dva nova vrha. Za prvi vrh (označen kao “1” na UHPLC hromatogramu, Slika 27c, d) utvrđeno je da ima retenciono vreme od 5.8 min i da je spektroskopski vrlo sličan kapsantinu pa je označen kao “kapsantinu-sličan”.



**Slika 27.** UHPLC hromatogrami karotenoidnih ekstrakata iz cvetova (krunica i prašnika) netransformisanog divljeg tipa (WT) i *Llccs*-transgenih (L1) *S. lycopersicum* ‘Moneymaker’ biljaka. WT nesaponifikovane (a), WT saponifikovane (b), i *Llccs*-transgene nesaponifikovane (c) i *Llccs*-transgene saponifikovane (d) Vrhovi: (1) kapsantinu-sličan; (2) violaksantinu-sličan; (3) neoksantin; (4) violaksantin; (5) kapsantin; (6) luteinu-sličan; (7) neoksantinu-sličan; (8) zeaksantin; (9) lutein; (10) hlorofil b; (11) violaksantinu-sličan; (12) neoksantinu-sličan; (13) hlorofil a; (14) neoksantinu-sličan; (15) neoksantinu-sličan; (16) violaksantinu-sličan; (17)  $\alpha$ + $\beta$ -karoten; (18) violaksantinu-sličan.

Drugi vrh koji ima retenciono vreme od 7.7 min (označen kao “5” na UHPLC hromatogramu) je identifikovan da pripada kapsantinu na osnovu poređenja retencionih

**Tabela 8.** Sastav i sadržaj karotenoida i hlorofila ( $\mu\text{g g}^{-1}$  sveže mase) u nesaponifikovanim i saponifikovanim ekstraktima iz cvetova (krunice i prašnici) kontrolnog netransformisanog i *Llccs*-transgenog paradajza (L1) određenim na osnovu UHPLC analiza i poređenjem sa odgovarajućim standardima. (\*n.d.-nije detektovan)

Redni broj vrha	ID vrha	Kontrolni (netransformisani)		<i>Llccs</i> -transgeni	
		Nesaponifikovani	Saponifikovani	Nesaponifikovani	Saponifikovani
1	<b>Kapsantin-sličan</b>	<b>n.d.*</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.14 ± 0.00</b>	<b>5.58 ± 0.02</b>
2	Violaksanin-sličan	11.33 ± 0.04	107.27 ± 0.47	8.76 ± 0.02	68.18 ± 0.06
3	Neoksantin	1.17 ± 0.01	37.02 ± 0.11	1.35 ± 0.00	37.66 ± 0.08
4	Violaksanin	8.50 ± 0.00	53.76 ± 0.16	9.05 ± 0.03	35.44 ± 0.03
5	<b>Kapsantin</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.30 ± 0.00</b>	<b>2.95 ± 0.00</b>
6	Luten-sličan	0.57 ± 0.00	4.19 ± 0.01	0.86 ± 0.00	3.89 ± 0.01
7	Neoksantin-sličan	1.02 ± 0.00	30.62 ± 0.09	0.86 ± 0.00	22.07 ± 0.03
8	Zeaksantin	0.32 ± 0.00	0.88 ± 0.01	0.44 ± 0.00	1.07 ± 0.00
9	Lutein	5.26 ± 0.01	9.66 ± 0.02	3.40 ± 0.03	5.08 ± 0.01
10	Hlorofil b	12.86 ± 0.65	n.d.	12.09 ± 0.57	n.d.
11	Violaksanin-sličan	16.61 ± 2.16	n.d.	12.22 ± 1.65	n.d.
12	Neoksantin-sličan	8.26 ± 0.87	n.d.	7.33 ± 1.03	n.d.
13	Hlorofil a	85.02 ± 1.52	n.d.	80.43 ± 0.72	n.d.
14	Neoksantin-sličan	11.58 ± 0.10	n.d.	3.71 ± 0.04	n.d.
15	Neoksantin-sličan	3.86 ± 0.31	n.d.	3.71 ± 0.04	n.d.
16	Violaksanin-sličan	3.74 ± 0.25	n.d.	2.62 ± 0.07	n.d.
17	$\alpha+\beta$ karoten	2.42 ± 0.08	2.27 ± 0.09	1.95 ± 0.07	1.85 ± 0.04
18	Violaksanin-sličan	28.83 ± 0.07	n.d.	16.25 ± 0.13	n.d.

vremena i karakteristika spektra u odnosu na one kod odgovarajućeg standarda kapsantina (**Slika 27c, d**). UHPLC ispitivanja karotenoidnih ekstrakata iz cvetova *Llccs*-transgenih biljaka paradajza nisu otkrila prisustvo kapsorubina čiji standard inače ima retenciono vreme od 6.2 min. Ispitivanje UHPLC metodom takođe je pokazalo da su i kapsantinu-sličan karotenoid i kapsantin prisutni uglavnom kao estri u hromoplastima cvetova *Llccs*-transgenih biljaka paradajza. Količina slobodnog, neesterifikovanog kapsantinu-sličanog karotenoida u kruničnim laticama i prašnicima *Llccs*-transgenih biljaka bila je  $0.14 \mu\text{g g}^{-1}$  DW. Količina slobodnog, neesterifikovanog, kapsantinu-sličanog karotenoida povećala se na  $5.58 \mu\text{g g}^{-1}$  DW kao posledica saponifikacije ukazujući na to da se  $\sim 97.5\%$  kapsantin-sličanog karotenoida u kruničnim listićima i prašnicima *Llccs*-transgenih biljaka nalazi u esterifikovanom obliku. Količina slobodnog, neesterifikovanog kapsantina u kruničnim listićima i prašnicima *Llccs*-transgenih biljaka bila je  $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$  DW. Količina slobodnog, neesterifikovanog, kapsantina povećala se na  $2.95 \mu\text{g g}^{-1}$  DW kao posledica saponifikacije. Rezultati kvantitativne analize kapsantina pokazuju da je  $\sim 90\%$  kapsantina u kruničnim listićima i prašnicima *Llccs*-transgenih biljaka esterifikovano dok je samo oko 10% kapsantina prisutno u svom slobodnom, neesterifikovanom obliku. Kvantitativni podaci o količini i sastavu karotenoida i hlorofila u krunicama i prašnicima cvetova netransformisanih i *Llccs*-transgenih biljaka paradajza prikazani su zbirno u **Tabeli 8**.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. GENETIČKA TRANSFORMACIJA *IRIS GERMANICA* L.

Genetički inženjering biljaka postao je jedan od osnovnih biotehnoloških postupaka za savremeno molekularno oplemenjivanje mnogih poljoprivredno značajnih i hortikulturnih biljnih vrsta. Uspešno su razvijeni protokoli za efikasnu *Agrobacterium*-posredovanu transformaciju mnogih dikotiledonih vrsta. Međutim, dugo vremena se smatralo da monokotiledone biljke nije moguće transformisati pomoću *Agrobacterium* sp. što je vodilo razvoju alternativnih metoda transformacije za direktan transfer DNK u ćelije monokotiledonih biljaka. Najpoznatija od ovih metoda jeste biolistička transformacija (bombardovanje mikroprojektilima), koju su prvi razvili Sanford i sar., (1990). Međutim, kasnije je postalo očigledno da biolistička transformacija ima nekoliko nedostataka u poređenju sa *Agrobacterium*-posredovanom transformacijom kao što su niska učestalost transformacije, viša učestalost integracije više kopija transgena, gubitak ekspresije transgena, rearanžiranje ekspresionih kaseti, integracija neželjenih delova DNK itd. Takođe, za primenu ove metode potrebno je mnogo vremena i troškovi nabavke potrebne opreme i potrošnog materijala su izuzetno visoki. Od sredine devedesetih, kada su razvijeni prvi uspešni protokoli za *Agrobacterium*-posredovanu transformaciju monokotiledonih biljaka, biolistička transformacija je postala manje važna metoda. Kada su započeti preliminarni eksperimenti na razvoju metoda za transformaciju biljaka roda *Iris* u Odeljenju za hortikulturu, Corvallis, Oregon State Univerzitet, SAD postojao je samo jedan rad o uspešnoj *Agrobacterium*-posredovanoj transformaciji ukrasnih monokotiledonih biljaka i to kod vrste *Anthurium scherzerianum*, varijeteti Schott "Rudolph" i "UH1060" koji je objavljen od strane Chen i Kuehnle, (1996).

Prvi deo istraživanja na razvoju uspešnih metoda za genetičku transformaciju perunika podrazumevao je razvoj i primenu metoda biolističke transformacije. Jedan od glavnih faktora koji je uticao na povećanje frekvencije transformacije ćelijskih suspenzija ovom metodom je bio tretman sa osmotocima (Kikkert i sar., 2004). Predtretman suspenzije ćelija ekvimolarnim rastvorom manitola i sorbitola tokom 2 sata

---

značajno je povećao frekvencu transformacije. Transgene biljke koje sadrže GUS marker gen (*uidA*) i gen za rezistenciju na herbicid Basta (*bar*) uspešno su dobijane ovim modifikovanim metodom. Međutim, učestalost transformacije primenom ove metode za neku praktičnu primenu je bila relativno niska. Pored toga, iako se herbicid Basta pokazao kao uspešan za proizvodnju stabilnih (integrativnih) transformisanih biljaka biolostičkom metodom, transgeni kalusi selektovani na 10 mg L<sup>-1</sup> Basta pokazali su nizak potencijal za regeneraciju biljaka.

Zbog svega toga, pristupilo se razvijanju metode za transformaciju perunika primenom *Agrobacterium*-posredovane transformacije. Najpre, da bi pronašli najefikasnije selekzione agense za dobijanje transgenih biljaka perunika, testirano je devet jedinjenja za koja su klonirani geni za rezistenciju. Četiri od njih 4-metil-triptofan, gentamicin, fleomicin i glifosat nisu jasno inhibirali rastenje kalusnih ćelija iz suspenzija perunika pa su isključeni iz daljeg ispitivanja. Pet najefikasnijih selekcionih agenasa iz preliminarnih eksperimenata ponovo su ispitani i dva od njih, higromicin i geneticin identifikovani su kao najefikasniji za selekciju stabilnih transformanata *I. germanica*.

Tokom procesa selekcije većina kalusa koji su preneti na podlogu koja sadrži geneticin nastavila je da raste mnogo sporije od onih koji su preneti na podlogu koja sadrži higromicin. Sporiji rast na podlozi sa geneticinom mogao bi biti posledica, bar jednim delom, razlike u jačini promotora između gena za rezistenciju na higromicin (*hpt*) i gena za rezistenciju na geneticin (*nptII*), koji su u plazmidu pTOK233 pod kontrolom CaMV 35S odnosno Nos (PNos) promotora. U preliminarnim eksperimentima bombardovanjem mikroprojektilima utvrđeno je da je ekspresija GUS gena u kalusnim ćelijama *I. germanica* bila mnogo izraženija kada je *uidA* gen bio pod kontrolom promotora CaMV 35S nego promotora PNos. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da postoji povećana rezistencija kod *I. germanica* na higromicin usled postojanja mnogo jačeg ekspresionog sistema. Ali i pored toga, na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji može se videti da je ipak najefikasniji selekциони agens za *I. germanica*, od svih testiranih, baš higromicin.

Najviša učestalost transformacije *I. germanica* 'Skating Party' postignuta je upotrebom *A. tumefaciens* soja LBA4404 koji nosi superbinarni vektor pTOK233. Ovaj plazmid pripada klasi koja se zove superbinarni vektori zato što nosi *virB*, *virC*, i *virG*

---

gen iz *A. tumefaciens* A281 (nosi pTiBo542), visokoefikasnog soja za transformisanje viših biljaka (Komari, 1990). Pokazalo se da uvođenje ovih virulentnih gena iz Ti-plazmida u binarni vector ili u poseban (ternarni) plazmid vodi ka povećanju virulencije *A. tumefaciens* i mnogo većoj učestalosti transformacija kod nekoliko vrsta biljaka (Arias-Garzón i Sarria, 1995; Hiei i sar., 1994; Li i sar., 1996; Liu i sar., 1992; Wenck i sar., 1999).

Pod ovim selekcionim uslovima dobijeno je preko 300 potencijalno transgenih biljaka perunike u periodu od 6 meseci. Kod 80% ispitanih biljaka je potvrđeno da su transgene na osnovu pozitivnog GUS bojenja i na osnovu antibiotik-rezistentnog fenotipa. Podaci dobijeni posle Southern-blot analize su potvrdili stabilnost integracije transgena u genom perunike. GUS pozitivno bojenje i fenotipska rezistencija na paromomicin ukazuju i na funkcionalnu ekspresiju oba transgena. Predpostavljamo da je CaMV 35S promotor dovoljno snažan promotor za perunike na šta ukazuje intenzivna reakcija pri GUS bojenju. Ekspresija GUS gena se najverovatnije pojavila u transformisanim ćelijama, a ne u *Agrobacterium* koji sadrži pTOK233. Prisustvo introna u regionu koji kodira GUS efikasno sprečava njegovu ekspresiju u ćelijama bakterija (Ohta i sar., 1990). Prema tome CaMV 35S promotor bi mogao biti dobar izbor za konstitutivnu ekspresiju i drugih gena koji su značajni za peruniku.

Ovi rezultati potvrđuju da bi *Agrobacterium*-posredovana transformacija mogla da se primeni kod hortikulturno značajnih monokotila kao što su perunike. Metoda *Agrobacterium*-posredovane transformacije za unošenje novih transgena u biljke *I. germanica* predstavlja značajno efikasniji i jednostavniji eksperimentalni postupak u odnosu na metod biolističke transformacije (bombardovanje mikroprojektilima). Prikazana metoda *Agrobacterium*-posredovane transformacije se može koristiti kao dopuna konvencionalnim postupcima oplemenjivanja u cilju poboljšanja osobina perunika. Transfer gena heterolognih vrsta je dobar način za uvođenje novih osobina u genom *Iris* sp., jer na taj način dolazi do proširenja genetičkog fonda vrsta mnogo više u odnosu na ono što je dostupno primenom tradicionalnih sistema za oplemenjivanje perunika.

Prikazana dva protokola za genetičku transformaciju perunika, biolistička i *Agrobacterium*-posredovana metoda, su prve i za sada jedine metode za genetičku



---

transformaciju vrsta roda *Iris* koje su osnovni preduslov za razvoj istraživanja na polju molekularnog oplemenjivanja ove vrlo važne ukrasne biljne vrste.

## 5.2. PROMENA BOJE CVETOVA *I. GERMANICA* L. 'FIRE BRIDE' PUTEM EKTOPIČNE EKSPRESIJE GENA ZA FITOEN SINTAZU (*CRTB*) IZ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Boja cveta predstavlja jednu od najznačajnijih kvalitativnih osobina ukrasnih biljaka pre svega zbog uticaja na povećanje diverziteta ukrasnih vrsta, sve većih i specifičnih zahteva tržišta, što u krajnjem slučaju ima komercijalni značaj za ovu oblast poljoprivrede. U ovom delu diskutovaće se o pokušaju da se promeni boja cveta i dobiju crveni cvetovi perunike metaboličkom modulacijom biosintetičkog puta karotenoida kod kultivara 'Fire Bride', koji prirodno formira roze cvetove. Mogućnost promena boje cveta je ispitana putem ektopične ekspresije bakterijskog gena za fitoen sintazu (*crtB*) poreklom iz *P. agglomerans*.

Karotenoidi su esencijalni biljni pigmenti važni za fotosintezu, fotoprotekciju fotosintetičkog aparata i sintezu nekih biljnih hormona, poput abcisinske kiseline i strigolaktona, kao i za determinisanje boje cvetova i plodova biljaka (Niyogi, 2000; Nambara i Marion-Poll, 2005; Dun i sar., 2009). Zbog svega toga, sve modifikacije biosintetičkog puta karotenoida bi podrazumevale upotrebu specifičnih promotora koji osiguravaju prostornu i vremensku regulaciju ovih promena sa ciljem da se izbegnu ili umanje sporedni efekti koje bi ove promene mogle da imaju na procese regeneracije i rastenja transgenih biljka.

Međutim, korisno bi bilo i koristiti strane gene koji imaju malu homologiju u odnosu na endogene gene da bi se izbegle komplikacije u vezi sa gubitkom ekspresije gena usled utišavanja gena („gene silencing“). Primeri za utišavanje gena su brojni, kao što je objavljeno u radu Fray i sar., (1995) kod paradajza sa prejakom ekspresijom endogenog gena za PSYI. Kasnije je takodje kod paradajza pokazano da se ove komplikacije mogu izbeći upotrebom bakterijskog gena za fitoen sintazu i tako spriječiti kosupresija i gubitak ekspresije gena (Fraser i sar., 2002).

Iz tih razloga, deo ove disertacije predstavlja pokušaj da se umanje potencijalne negativne posledice modifikovanja biosintetičkog puta karotenoida korišćenjem bakterijskog gena za fitoen sintazu (*crtB*) iz *P. agglomerans* pod kontrolom cvet-

---

specifičnog promotora. Na žalost trenutno nema podataka o prirodnim cvet-specifičnim promotorima kod *I. germanica*. Zbog toga je odabran promotor region gena za kapsantin-kapsorubin sintazu (PLlccs) iz *Lilium lancifolium* koji je odgovoran za cvet specifičnu ekspresiju tog gena kod ljiljana (Jeknić i sar., 2011; 2012).

Ispitivanje ekspresije je pokazalo da je *crtB* transgen koga reguliše PLlccs promotor prvenstveno bio eksprimiran u različitim delovima cveta, a samo je tragove *crtB* transkripta bilo moguće detektovati u listovima i rizomima transgenih perunika.

Ektopična ekspresija *crtB* gena pod kontrolom PLlccs promotora dovodi do povećane sinteze i akumulacije karotenoida u kalusnom tkivu. Normalni, netransformisani kalusi perunike kultivara 'Fire Bride' su žuti usled akumulacije žutih ksantofila kao što su lutein,  $\alpha$ -karoten, violaksantin, zeaksantin i neoksantin (**Slika 10**). Nasuprot tome *crtB*-transgeni kalus menja boju u različite nijanse roze-narandžaste i crvene prvenstveno usled akumulacije likopena što ukazuje na to da likopen presudno utiče na dobijanje roze-narandžaste i crvene nijanse kalusa (**Slika 10**). Ovi rezultati potvrđuju da ektopična ekspresija *crtB* gena u kalusnom tkivu perunike prouzrokuje značajne promene u biosintetičkom putu karotenoida i usmerava metabolički protok u pravcu sinteze likopena. Osim što je došlo do velikog povećanja akumulacije likopena došlo je i do otprilike trostrukog povećanja akumulacije i drugih karotenoida kao što je lutein i  $\alpha$ -karoten dok se akumulacija neoksantina i violaksantina povećala otprilike sedam puta.

Nasuprot kalusnom tkivu u potpuno formiranim biljkama, pre svega delovima perigona cvetova, standardima i folovima, *crtB*-transgenih perunika nisu dobijene značajno povećane akumulacije likopena ili drugih karotenoida. I pored toga što je analiza ekspresije *crtB* gena primenom RT-PCR metode jasno pokazala da je došlo do ekspresije *crtB* transgena u standardima i folovima *crtB*-transgenih biljaka (**Slika 15**), UHPLC analiza ekstrakata karotenoida nije pokazala značajno povećanje sadržaja karotenoida u ovim delovima cveta u poređenju sa kontrolnim biljkama transformisanih „praznim“ vektorom (**Slike 16a, b; Tabela 6**).

Malo je verovatno da je smanjenje sadržaja likopena u perigonu cvetova (standardima i folovima) transgenih perunika posledica kosupresije endogenih gena za PSY. Baš zbog toga je i korišćen bakterijski gen za fitoen sintazu (*crtB*) da bi se smanjila mogućnost nastanka takve kosupresije. Verovatnija je pretpostavka da je do

---

zmanjenja sadržaja likopena kao i sadržaja luteina, neoksantina i violaksantina u standardima i folovima *crtB*-transgenih biljaka došlo kao posledica potrošnje prekursora karotenoida u delovima cveta koji prethode standardima i folovima kao što su cvetne drške i plodnici. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati UHPLC analiza karotenoida koji pokazuju značajno povećanje biosinteze tj. akumuliranja karotenoida i izražene promene boje u tkivima ovih organa.

U poređenju sa kontrolnim biljkama *crtB*-transformanti akumuliraju velike količine karotenoida u normalno zelenim ili belim delovima cveta uključujući cvetne drške, plodnike, brakteje (braktične listiće), i bazalne delove standarda i folova. Sva ova tkiva pokazuju značajnu narandžastu pigmentisanost (**Slika 12, 13, 14**). Promena boje u plodnicima *crtB*-transgenih biljaka posledica je pre svega značajne akumulacije likopena čija se količina povećala skoro dvadeset dva puta (**Slika 16c, d; Tabela 6**). U isto vreme količina  $\alpha$ - plus  $\beta$ -karotena (zajedno) povećala se preko tri puta dok je količina ostalih karotenoida uključujući neoksantin, violaksantin i lutein smanjena (**Slika 16c, d; Tabela 6**). Promene boje u cvetnim drškama *crtB*-transgenih biljaka rezultat su samo akumulacije likopena dok je količina  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotena smanjena u poređenju sa kontrolnim biljkama (**Slika 16e, f; Tabela 6**). Slično kao u plodnicima količine neoksantina, violaksantina i luteina su smanjene u cvetnim drškama. Pored toga, zapaženo je da i u plodnicima i u cvetnim drškama narandžasta boja takođe nastaje usled velikog smanjenja sadržaja hlorofila a i b (**Slika 16e, f; Tabela 6**). Jedan od mogućih razloga za smanjenje hlorofila bi mogao biti taj da je glavni deo GGPP koji služi kao precursor za sintezu karotenoida, (ali i kao precursor za sintezu hlorofila), bio preusmeren na sintezu karotenoida kao posledica ektopične ekspresije *crtB* gena.

Visok nivo akumulacije karotenoida u plodnicima i cvetnim drškama *crtB*-transgenih biljaka ukazuje na to da CRTB ima snažan pozitivan uticaj na biosintezu karotenoida u ovim delovima cveta. Takođe, slično onome što je utvrđeno u kalusnom tkivu ektopična ekspresija *crtB* gena u plodnicima i cvetnim drškama preusmerila je metabolički protok u pravcu sinteze likopena. Međutim, za razliku od plodnika i cvetnih drški, ekspresija CRTB ne igra značajnu ulogu u sintezi likopena u standardima i folovima *crtB*-transgenih biljaka. Zbog toga se može pretpostaviti da je biosintetički put karotenoida drugačije regulisan kod zelenih u odnosu na delove cveta koji nisu zeleni kod *I. germanica* "Fire Bride". Zaista, kao što je pokazano ranije, regulatorni

---

mehanizmi koji kontrolišu karotenogenezu funkcionišu drugačije u cvetovima i plodovima u odnosu na zelena fotosintetski aktivna tkiva (Hirschberg, 2001).

Jedan od mogućih razloga zašto se likopen nije u većoj količini akumulirao u standardima i folovima *crtB*-transgenih biljaka mogao bi biti taj da sinteza fitoena nije ograničavajući korak u biosintezi karotenoida u ovim delovima cveta. Kao što je gore navedeno, dokazano je da biljni ortolog PSY reguliše limitirajući korak u biosintezi karotenoida u različitim delovima mnogih biljaka, uključujući endosperm pirinča i kukuruza i semena uljane repice, lana i *Arabidopsis* (Rosati i sar., 2009). Međutim, ranije je takođe dokazano da je jedan od osnovnih mehanizama koji kontrolišu karotenogenezu kod različitih vrsta regulacija transkripcije u različitim koracima biosintetičkog puta karotenoida, a šire i izoprenoida (Hirschberg, 2001; Cazzonelli i Pogson, 2010; Cazzonelli, 2011). Dokazano je da pojačana ekspresija 1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfat sintaze (DXS) koja reguliše prvi korak MEP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat) biosintetskog puta vodi ka povećanju sinteze i akumulacije karotenoida kod nekoliko vrsta uključujući *Arabidopsis*, paradajz i krompir. Ovi rezultati ukazuju na to da DXS reguliše i predstavlja limitirajući korak i u biosintezi karotenoida (Estévez i sar., 2001; Enfissi i sar., 2005; Morris i sar., 2006). Može se pretpostaviti da je slična situacija i u standardima i folovima *I. germanica* 'Fire Bride'. Naime, verovatno još neki enzimi osim PSY regulišu ove limitirajuće korake u biosintezi izoprenoida i/ili karotenoida i imaju veći uticaj na metabolički protok kroz ove biosintetičke puteve.

Još jedno od mogućih objašnjenja koja bi mogla dati odgovor na pitanja zašto se likopen nije akumulirao u većoj količini u standardima i folovima *crtB*-transgenih biljaka je taj da su mesta za skladištenje karotenoida u hromoplastima standarda i folova već zasićena što za posledicu ima to da dolazi do nemogućnosti daljeg povećanja količine likopena u ovim tkivima. Ranije je dokazano da se u transgenom paradajzu koji ima pojačanu ekspresiju karotenoid-vezujućeg proteina fibrilina, koji obezbeđuje dodatni kapacitet za skladištenje karotenoida, povećala i akumulacija karotenoida (Simkin i sar., 2007). Pored toga, dokazano je da je povećana akumulacija  $\beta$ -karotena u narandžastim glavicama jednog varijeteta karfiola (*Brassica oleracea*) nastala usled novonastale genske mutacije koja je stvorila dodatne mehanizme za skladištenje karotenoida putem diferencijacije proplastida i/ili drugih nebojenih plastida u hromoplaste (Li i sar., 2001; Lu i sar., 2006). Genetička transformacija perunika sa roze

---

cvetovima bilo kojim od ova dva gena pojedinačno, ili u koordinaciji sa genom za fitoen sintazu, mogla bi da stvori metabolički depo za skladištenje više likopena, što bi na kraju moglo da dovede do dobijanja crvenih cvetova perunike.

Posebna pažnja u istraživanjima posvećena je činjenici da bakterijski enzimi u biosintetičkom putu karotenoida ne sadrže N-terminalne tranzitne petide (TP) za usmeravanje novosintetisanih proteina u plastide. Zbog toga je neophodno tehnikama rekombinantne DNK dodati (fuzionisati) TP iz viših biljaka na 5' krajeve bakterijskih gena da bi produkti ovih himernih gena bili usmereni do plastida. TP koji potiče od male subjedinice RuBisCO iz graška (*Pisum sativum*) je najčešće korišćen za usmeravanje bakterijskih enzima u plastide (Rosati i sar., 2009). Da bi se CRTB usmerio u hromoplaste standarda i folova *I. germanica*, *crtB* gen je fuzionisan sa TP sekvencom male jedinice RuBisCO iz duvana (**Slika 9**). Povećana akumulacija karotenoida i prateće promene boje u plodnicima, cvetnim drškama i prašnicama ukazuju na to da je ovaj TP prepoznat kod perunike i da je efikasno usmerio CRTB u hloroplaste i plastide (najverovatnije proplastide i/ili leukoplaste u belim prašnicama) u ovim delovima cveta. Međutim, efikasnost ovog TP u usmeravanju CRTB u hromoplaste standarda i folova umesto u hloroplaste i druge plastide i njegov mogući uticaj na subcelularnu lokalizaciju CRTB i asocijaciju CRTB sa drugim izoprenoidnim enzimima još nije ispitan. Umemoto i sar., (2006) i Umemoto i Toguri, (2012) upotrebili su *crtW* gen povezan sa različitim N-terminalnim TP da bi ga usmerili u hromoplaste cvetova petunije (*Petunia* spp.) i utvrdili da postoji korelacija između upotrebljene TP sekvence i nivoa ekspresije transgena i promene boje u transformantima. Prema tome možemo pretpostaviti da CRTB koji se sintetiše u standardima i folovima *crtB*-transgenih perunika nije efikasno i/ili odgovarajuće usmeren ili lokalizovan u hromoplastima u ovim delovima cvetova što je dovelo do neznačajnog efekta CRTB na karotenogenezu u ovim delovima cveta.

Na osnovu svega iznetog možemo zaključiti da je ektopična ekspresija *crtB* gena u roze kultivaru *I. germanica* 'Fire Bride' dovela do promene boje kod nekih, ali ne svih delova cvetova. Dobijene su nove nijanse narandžastih i roze boja u pojedinim delovima cveta, što pokazuje određeni napredak u promeni boje cvetova genetičkom modulacijom karotenoidnog biosintetskog puta pomoću ektopične ekspresije gena za bakterijski CRTB. Potrebna su dalja istraživanja koja bi dovela do razjašnjenja

regulatornih mehanizama biosinteze karotenoida u spoljašnjem i unutrašnjem perigonu (standardima i folovima) cvetova perunike i do pronalaženja odgovora na pitanje zašto se ektopična ekspresija *crtB* gena kod perunika nije pokazala efikasnijom u smislu povećanja sadržaja likopena u ovim delovima cveta i dobijanju crvene boje cvetova.

### 5.3. KLONIRANJE I FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA GENA ZA KAPSANTIN-KAPSORUBIN SINTAZU (LICCS) IZ TIGRASTOG LJILJANA (*LILIUM LANCIFOLIUM* THUNB. 'SPLENDENS')

Strategija za kloniranje *Llccs* gena iz *L. lancifolium* zasnovana je na činjenici da likopen ciklaza (LCY), neoksantin sintaza (NSY) i kapsantin-kapsorubin sintaza (CCS) imaju izraženu homologiju sekvenci i slične katalitičke mehanizme (Bouvier i sar., 2000; Mialoundama i sar., 2010). Osnovna ideja je bila, da se pokuša dobiti parcijalna cDNK sekvenca gena za likopen  $\beta$ -ciklazu (*LlcyB*) koji je lociran između dva susedna regiona koji su konzervirani kako u *lcyB* genu različitih vrsta tako i u *ccs* genu paprike. Posle toga je bilo planirano upotrebiti dobijenu informaciju o sekvenci za sintezu određenog broja prajmera za 3'RACE. Očekivano je da ovaj pristup (3'RACE) omogući kloniranje 3' proksimalnog kraja *LlcyB* gena. Zbog pretpostavljene velike sličnosti između *LlcyB* gena i *Llccs* gena i podudaranja korišćenja kodona, postojala je mogućnost da bi neki od parova prajmera imali veći afinitet za amplifikaciju *Llccs* gena umesto *LlcyB* gena ili da bi dali mešavinu produkata PCR reakcije sa umnoženim fragmentima oba gena. Zbog svega iznetog, osnovni plan je bio u kloniranju i *LlcyB* i *Llccs* kandidat gena, a potom u određivanju koji je od njih pravi *Llccs* gen analizom sekvenci i na kraju funkcionalnom karakterizacijom u odgovarajućem test sistemu.

Koristeći ovaj plan istraživanja identifikovana su dva gena veoma slična genu za LCYB iz različitih vrsta i genu za CCS iz paprike. Na osnovu analize homologije jedan od ova dva gena je identifikovan kao potencijalni gen za LYCB ljiljana (*LlcyB*). Analiza ekspresije gena za LILYCB pokazuje njegovu ekspresiju u listovima i cvetovima ljiljana (Slika 20b, d) pri čemu je najviši nivo transkripcije detektovan u listovima.

Izvedena aminokiselinska sekvenca drugog gena (identifikovanog kao mogući gen za LICCS) upoređena je sa drugim proteinima upotrebom BLASTp i pokazalo se da

---

je takođe vrlo slična LYCB i NSY kao i CCS poreklom iz paprike. Međutim, LICCS je malo sličniji CCS paprike nego LILCYB. Na osnovu ove analize dobijeni gen se pokazao kao dobar kandidat za *Llccs* gen.

Analizom aminokiselinske sekvence izvedene iz LICCS proteina pokazano je da sadrži N-terminalni dinukleotid-vezujući motiv označen kao „Rossmann fold” koji je karakterističan za flavoproteine. Mialoundama i sar., (2010) su dokazali da je CCS paprike tipični flavoprotein sa jednim nekovalentno vezanim flavin adenin dinukleotidom (FAD) koji je esencijalan za enzimatsku aktivnost CCS u prisustvu NADPH kao reduktanta FAD. Reakcija se odvija bez neto promene u redoks potencijalu (Mialoundama i sar., 2010). Zatim, ispitivanjem aminokiselinske sekvence novokloniranog LICCS proteina otkriveno je da sadrži takozvani 269-FLEET-273 motiv. FLEET motiv sadrži dva konzervirana Glu (E) ostatka i esencijalan je i za  $\beta$ - i za  $\kappa$ -ciklaznu aktivnost CCS paprike (Bouvier i sar., 1997; Mialoundama i sar., 2010). Pored toga, analizom aminokiselinske sekvence pokazano je da LICCS ima svih pet konzerviranih aminokiselina (Asp-102, Asp-235, Glu-103, Glu-308 i His-336), koje su identifikovane kao one koje imaju važne katalitičke uloge u CCS kod paprike (Asp-127, Asp-259, Glu-128, Glu-332 i His-360).

Međutim, prisustvo takozvanog „Rossmann fold“, FLEET motiva i pet konzerviranih aminokiselina u LICCS su vrlo korisni za odgovarajuću identifikaciju članova familije enzima likopen-ciklaza ali se ne mogu koristiti za međusobno razlikovanje CCS, LCYB i NSY proteina jer su ovi motivi i aminokiseline konzervirani kod sva tri proteina. Zbog toga su neophodne dalje funkcionalne analize novokloniranog gena za LICCS da bi se potvrdio njegov pravi identitet.

Ispitivanje ekspresije gena za LICCS pokazalo je da je njegova ekspresija usko povezana sa razvojem pupoljka i pojavljivanjem crveno-naranžaste boje u njima dok transkripti gena za LICCS nisu otkriveni u listovima ukazujući na to da je ekspresija ovog gena cvet-specifična (**Slika 20b, c**). Tokom razvoja cveta šema ekspresije gena za LICCS (**Slika 20b, c**) slična je šemi ekspresije gena za CCS u *C. annumm* tokom razvoja ploda paprike a karakteriše se jakom indukcijom u početnim razvojnim stadijumima i konstantno visokim nivoom transkripta tokom razvića plodova (Bouvier i sar., 1994).

---

Pošto je potencijalni LICCS pokazao veću sličnost prema CCS paprike nego LILCYB i pošto se ekspresija gena za LICCS prostorno i vremenski podudara sa sintezom i akumulacijom kapsantina i kapsorubina u cvetnim pupoljcima i otvorenim cvetovima ljljana ovaj kandidat gen za LICCS je odabran za dalje ispitivanje i funkcionalnu karakterizaciju. Pored toga, zbog cvet-specifične ekspresije *Llccs* kandidat gena učinjen je dodatni napor da se klonira promotorski region ovog gena pretpostavljajući da bi mogao poslužiti za generalizovanu transformaciju monokotiledonih biljaka. Da bi se dokazala njegova funkcija *Llccs* kodirajući region pod kontrolom CaMV 35S konstitutivnog promotora stabilno je transformisan u kalusno tkivo *I. germanica* 'Hot Property' čija je prirodno žuta boja posledica akumulacije nekoliko ksantofila kao što je violaksantin, prekursor kapsorubina. *Llccs*-transgeni kalusi su promenili boju iz njihove prirodne žute u različite nijanse crveno-narandžaste u zavisnosti od transgene linije (**Slika 21c, d**). Pojava novih pigmenata ( $\kappa$ -ksantofila, kapsantina i kapsorubina) u transgenom kalusnom tkivu perunike pokazala je da je *Llccs* gen potpuno funkcionalan i da je odgovoran za razvoj ovih novih nijansi crveno-narandžaste boje kalusa. Rezultati takođe ukazuju na to da je tranzitni peptid bio odgovarajuće prepoznat i korektno dalje procesuiran i da je usmerio LICCS u hromoplaste.

HPLC analiza karotenoidnih ekstrakata iz *Llccs*-transgenog kalusa perunike otkrila je novi karotenoidni vrh koji se pojavio na 19. minutu hromatograma (**Slika 22b**). Ovaj novi vrh identifikovan je kao kapsantin na osnovu retencionog vremena i spektroskopskih karakteristika koje su bile identične onima dobijenim za standard kapsantina. Zanimljivo je pomenuti da su Kumagai i sar., (1998), nasuprot esterifikovanom obliku kapsantina u plodovima paprike i *Llccs*-transgenom kalusu perunike, utvrdili da kapsantin indentifikovan u listovima *N. benthamiana* inficiranim RNK virusnim vektorom koji nosi *ccs* gen paprike, nije bio esterifikovan. Ovi autori su pretpostavili da je CCS verovatno bio usmeren u hloroplaste, a ne u hromoplaste. Postepeno smanjenje nivoa slobodnih pigmenata, uz povećanje esterifikacije ksantofila masnim kiselinama, dešava se tokom zrenja plodova paprika i u direktnoj je vezi sa tranzicijom hloroplasta u hromoplaste (Camara i Monéger 1978; Márkus i sar., 1999). Kalus perunike koji je gajen u mraku ne sadrži hloroplaste i prema tome visok nivo (viši od 80%) esterifikacije kapsantina u *Llccs*-transgenom kalusu perunike je



najverovatnije posledica toga što je LICCS bio usmeren u hromoplaste što je slično procesima koji se odvijaju u kasnijim stadijumima razvoja plodova paprike, ali i cvetova ljiljana.

Prisustvo i kapsantina i kapsorubina u crveno-narandžastom transgenom kalusu perunike potvrđeno je UPLC-MS/MS analizom upoređivanjem retencionih vremena, preciznih merenja mase i odgovarajuće šeme fragmentacije koje su poređene sa odgovarajućim standardima kapsantina i kapsorubina (**Slika 23, 24**). Ispitivanjem karotenoidnih ekstrakata iz listova *N. benthamiana* inficiranog sa RNK virusnim vektorom koji nosi *ccs* gen paprike pomoću TLC utvrđeno je prisustvo kapsantina; međutim kapsorubin nije otkriven ovom metodom iako jeste njegov prekursor, violaksantin (Kumagai i sar., 1998). Nasuprot rezultatima ovih autora ispitivanjem UPLC-MS/MS otkriveno je da se i kapsantin i kapsorubin akumuliraju u crveno-narandžastom *Llccs*-transgenom kalusu perunike (**Slika 23, 24**). Po našim saznanjima ovo su po prvi put dobijeni rezultati o *in vivo* biosintezi kapsorubina koju katalizuje heterologno eksprimiran *ccs* gen, kod bilo koje biljne vrste. Ovo je takođe do sada, jedini primer uspešnog preusmeravanja puta karotenogeneze u cilju dobijanja kapsantina i kapsorubina putem stabilne transformacije *ccs* gena.

Dakle, funkcionalna analiza *Llccs* gena putem ektopijske ekspresije u kalusu perunike i dalja identifikacija kapsantina i kapsorubina u crveno-narandžastom *Llccs*-transgenom kalusu potvrdila je našu pretpostavku da je novoklonirani *Llccs* funkcionalni gen za kapsantin-kapsorubin sintazu CCS.

Kloniranje *Llccs* gena takođe je omogućilo i kloniranje njegovog uzvodnog promotorskog regiona. Kao što je već navedeno, ispitivanje ekspresije *Llccs* gena pokazalo je da je promotorski region odgovoran za cvet-specifičnu ekspresiju *Llccs* gena u *L. lancifolium* (**Slika 20b, c**). Ekspresija monokotiledonih gena, vođena njihovim odgovarajućim prirodnim promotorima, nije uvek regulisana na isti način i u dikotiledonim biljkama (Shimamoto, 1994) a verovatno je isti slučaj i u obrnutoj situaciji. Iako sveobuhvatna funkcionalna ispitivanja *Llccs* promotora nisu završena šema ekspresije *Llccs* gena u *L. lancifolium* ukazuje na to da bi *Llccs* promotor mogao biti korisna alatka za usmeravanje cvet-specifične ekspresije gena kod transgenih monokotiledonih biljaka.

---

Kao što je ranije pomenuto, sva tri enzima (LCY, NSY i CCS) imaju visoku homologiju sekvenci i slične odgovarajuće katalitičke mehanizme (Bouvier i sar., 2000, Mialoundama i sar., 2010). Ove sličnosti ukazuju na to da bi ova tri gena mogla biti filogenetski povezana (Kubasik i Sandmann, 2000, Ronen i sar., 2000). Rezultati filogenetskih ispitivanja LICCS (**Slika 19**) podržavaju hipotezu da su *ccs* i *nsy* evoluirali iz gena za likopen ciklazu kroz duplikaciju i neofunkcionalizaciju tog gena (Kubasik i Sandmann, 2000; Ronen i sar., 2000). Pored toga, ove analize ukazuju na to da je CCS srodniji LYCB nego LYCE (**Slika 19**).

Kompjuterske analize, uključujući ispitivanje multi-sekvencijalnog sparivanja nisu uspele da otkriju bilo koji očigledan dug motiv ili konzerviran region koji bi mogao da razlikuje LCY, CCS i NSY. Izgleda da su strukturne razlike u funkcionalnim regionima ovih proteina male i da su verovatno posledica promene jedne (ili nekoliko) aminokiselina. Međutim, postoje samo vrlo ograničeni izvori podataka (dva CCS gena, uključujući novoklonirani LICCS, i dva NSY gena) sa kojima se može obaviti ispitivanje multi-sekvencijalnog sparivanja. Kako trenutno ne postoji mogućnost da se odrede kristalne strukture, a ni konstruisanje strukturnih modela zasnovanih na homologiji između LCYB, NSY i CCS (Bouvier i sar., 2000) nije moguće, nemogu se pouzdano predvideti funkcionalni regioni i konzervirani motiv(i) koji razlikuju ove proteine. Ipak, identifikacija *Llccs* sekvence u ovom radu poslužiće u dizajniranju budućih strategija za kloniranje i funkcionalnu karakterizaciju drugih gena koji katalizuju formiranje  $\kappa$ -ksantofila iz raznih biljnih vrsta, što će zauzvrat pomoći u determinisanju funkcionalnih regiona koji diferenciraju ova tri gena primenom raznih istraživačkih strategija kao što su premeštanje domena, ciljane mutageneza i sl.

Jedan od interesantnih rezultata koje su objavili Mialoundama i sar., (2010) je da CCS takođe katalizuje sintezu dva retka 3,5,6-trihidroksi ksantofila: 5,6-diepikarpoksantina i 5,6-diepilatoksantina. Pored toga, postavljena je hipoteza da CCS katalizuje i sintezu nekoliko karotenoida sa 6-okso- $\kappa$ -terminalnim grupama. Predpostavlja se da CCS katalizuje konverziju  $\beta$ -kriptoksantin 5',6'-epoksida u 3'-deoksikapsantin i 3,4-dehidroksi-3'-deoksikapsantin u plodovima paprike kao i konverziju  $\beta$ -karotena preko  $\beta$ -karoten 5,6-epoksida u sapoteksantin u plodovima sapote (*Pouteria sapota*, Maoka i sar., 2004; Maoka, 2009; Murillo i sar., 2011). Nedavno su

Murillo i sar., (2012) iz plodova *P. sapota* izolovali dva nova retka karotenoida, 3'-deoksikapsorubina i 3,3'-dideoksikapsorubina, za čiju sintezu se pretpostavlja da je takođe odgovoran CCS. Iako sinteza ovih retkih karotenoida nije bila osnovni cilj istraživanja ove disertacije može se predpostaviti da kalus *Llccs*-transge perunike bi mogao da bude odličan model sistem za proučavanje potencijalne uloge LICCS u sintezi ovih retkih karotenoida kod monokotiledonih biljaka.

Kao što je već ranije pomenuto, dokazano je da CCS poseduje i aktivnost  $\beta$ -ciklaze i u stanju je da katalizuje sintezu  $\beta$ -karotena iz likopena sa efikasnošću od otprilike 10-20% (Hugueney i sar., 1995). Dakle, CCS je enzim koji može da koristi više supstrata, pa tako pored kapsantina i kapsorubina izgleda da katalizuje i sintezu svih gore pomenutih karotenoida.

Kao generalni zaključak u ovom delu istraživanja možemo reći da je pokazano uspešno kloniranje i funkcionalna karakterizacija gena za kapsantin-kapsorubin sintazu (*Llccs*) iz tigrastog ljiljana (*L. lancifolium*) što je vrlo značajno za buduću genetičku modifikaciju žutih cvetova i plodova biljaka u narandžaste i crvene nijanse boja.

#### **5.4. PROMENA BOJE CVETOVA PARADAJZA (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L. 'MONEYMAKER') PUTEM METABOLIČKOG INŽENJERINGA KAPSANTIN-KAPSORUBIN BIOSINTETIČKOG PUTA UPOTREBOM *LLCCS* GENA IZ *L. LANCIFOLIUM***

Da bi se testirala sposobnost novokloniranog *Llccs* gena da promeni boju cvetova iz žute u narandžasto-crvenu i crvenu izvedena je transformacija paradajza čiji cvetovi akumuliraju anteraksantin i violaksantin, prekursore kapsantina odnosno kapsorubina. Zbog toga što je *Agrobacterium*-posredovana transformacija paradajza relativno jednostavna i efikasna paradajz je u ovom slučaju odličan model za proučavanje efekata ektopične ekspresije *Llccs* gena. Kratak vremenski raspon potreban da transformant paradajza izraste u odraslu biljku koja cveta još je jedna od prednost upotrebe paradajza kao test biljke. Ipak, jedan nedostatak sa kojim smo se suočili u ovim istraživanjima jeste taj da je selekcija stabilnih transformanata paradajza morala da se uradi na higromicinu zato što su svi transformacioni vektori bili bazirani na pWBVec10a plazmidu koji nosi *hpt* gen za rezistenciju na higromicin. Za higromicin je

---

dokazano da je donekle toksičan za paradajz, čak i pri vrlo niskim koncentracijama (1 do 5 mg L<sup>-1</sup>), što dovodi do dobijanja na kraju malog broja stabilnih transformanata.

Za usmeravanje ekspresije *Llccs* gena samo u cvetovima paradajza korišćen je promotor halkon sintaza gena iz petunije (*PchsA*) koji je fuzionisan za pojačivačem (E35S) sekvence CaMV 35S promotora (van der Meer i sar., 1992). U cilju ispitivanja organ-specifične ekspresije *chsA* promotora van der Meer i sar., (1992) su analizirali himerne gene konstruisane spajanjem 5' delecija promotora za GUS reporter gen. Ovi autori su dokazali da do pojačanja ekspresije *uidA* (GUS) gena u prisustvu CaMV 35S domena B došlo je pre povećanjem broja ćelijskih tipova koji ekspimiraju *uidA* gena u samom organu nego povećanjem nivoa ekspresije *uidA* gena u specifičnim ćelijskim tipovima. Takođe su dokazali da je himerni *chsA* promotor sposoban da upravlja cvet-specifičnom ekspresijom *uidA* (GUS) gena kod *Petunia hybrida*. Međutim, kod *Llccs*-transgenih biljaka paradajza ovaj promotor nije pokazao cvet-specifičnu ekspresiju što je procenjeno analizom ekspresije *Llccs* gena primenom RT-PCR metode u cvetovima (kruničnim listićima i prašnicima) i listovima *Llccs*-transgenih biljaka paradajza.

Tri nezavisne *Llccs*-transgene biljke su regenerisane i odgajane do fiziološke zrelosti u uslovima staklenika. Netransformisane biljke paradajza su uzgajane istovremeno iz semena da bi se koristile kao kontrole. Nakon što su sve biljke cvetale vizuelno su ispitane na prisustvo fenotipskih promena. Sve tri nezavisne transgene linije razvile su različite nijanse nove narandžaste boje cvetova (kruničnih listića i prašnika). Cvetovi transgenih linija paradajza L1 i L2 su imale tamnije žuto–narandžaste nijanse dok su cvetovi transgene linije L3 bili svetlijih nijansi (**Slika 25b-e**). UHPLC metodom je pokazano da su promene u boji cvetova kod *Llccs*-transgenih biljaka paradajza posledica akumulacije dva nova karotenoida: kapsantina i jednog kapsantinu-sličnog karotenoida.

Prisustvo velike količine rezidualnog violaksantina u *Llccs*-transgenim cvetovima paradajza, što je otkriveno UHPLC metodom, ukazuje na to da bi se upotrebom jakog promotora koji bi upravljao ekspresijom *Llccs* gena moglo postići povećanje metaboličke konverzije ovog prekursora i dobijanje tamnije boje cveta na osnovu povećanih količina kapsantina i kapsantinu-sličnog karotenoida. Takođe, verovatno bi se mogla postići čak i jača ekspresija i efikasnija konverzija anteraksantina i violaksantina u kapsantin i kapsorubin u *I. germanica* u budućnosti kroz ekspresiju

---

*Llccs* gena pod kontrolom njegovog sopstvenog promotora (PLlccs). Ova pretpostavka je bazirana na rezultatima prikazanim u ovoj tezi koji su pokazali da je ekspresija *Llccs* gena prostorno i vremenski regulisana kod *L. lancifolium*. Odnosno ekspresija *Llccs* gena prisutna je samo u cvetnim delovima ali ne i u listovima, a pojava crveno-narandžaste boje u ovim cvetovima je prvenstveno posledica akumulacije kapsantina i kapsorubina. Dodatna ispitivanja će preciznije determinisati region u PLlccs koji će biti dovoljan za njegovu efikasniju cvet-specifičnu ekspresiju.

Nivo ekspresije LICCS gena se može poboljšati kod *I. germanica* u poređenju sa paradajzom pošto je *Llccs* gen kloniran iz monokotiledone biljke, *L. lancifolium*, a iskorišćavanje kodona se razlikuje između monokotiledonih i dikotiledonih biljaka (Campbell i Gowri, 1990; Kawabe i Miyashita, 2003). Stoga se očekuje da ektopična ekspresija *Llccs* gena bude optimalnija kod monokotila kao što su one iz roda *Iris* nego kod dikotila kao što je paradajz što bi vodilo ka efikasnijoj konverziji anteraksantina i violaksantina u kapsantin odnosno kapsorubin i dobijanju tamnijih nijansi narandžasto-crvene i crvene bije cvetova.

Preusmeravanje biosinteze karotenoida prema kapsantinu (i kapsantin-sličnom karotenoidu) kroz ektopičnu ekspresiju *Llccs* gena, uspešno je primenjeno u ovoj doktorskoj disertaciji za promenu boje cveta paradajza i prvi je primer uspešne promene boje cveta bilo koje biljne vrste genetičkom modifikacijom biosinteze kapsantina (i kapsantin-sličnog karotenoida). Na osnovu iznetih rezultata može se potvrditi početna pretpostavka da bi se ektopična ekspresija *Llccs* gena mogla iskoristiti za promenu boje tkiva koja akumuliraju anteraksantin i violaksantin u svojim hromoplastima, kao što je pokazano kod kalusnog tkiva *I. germanica* i cvetova (kruničnih listića i prašnika) paradajza. Mora se posebno naglasiti, da se samo kod malog broja biljnih vrsta prirodno sintetišu kapsantin i/ili kapsorubin (Rüttimann, 1982, Deli i sar., 2000). Prirodni izvori hrane koji sadrže ova dva  $\kappa$ -ksantofila u osnovi ograničeni su na plodove paprike i njihove produkte. Zbog ograničene distribucije kapsantina i kapsorubina u prirodi i njihovog značaja za zdravlje, kao što su snažna aktivnost uklanjanja aktiviranog kiseonika i inhibicija peroksidacije lipida slobodnim radikalima (Matsufuji i sar., 1998, Maoka i sar., 2001a) kao i potencijalna antitumorska aktivnost ovih substanci, oni su odlična ciljna grupa za genetički inženjering različitih poljoprivrednih kultura u cilju poboljšanja njihove nutritivne vrednosti.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Postignuta je stabilna genetička transformacija ćelijskih suspenzija *I. germanica* primenom biolističke transformacije, ali učestalost same transformacije je relativno niska. Pretretman sa osmoticima dovodi do značajnog povećanja učestalosti biolističke transformacije.
2. Postignuta je efikasna genetička transformacija ćelijskih suspenzija perunike preko *Agrobacterium tumefaciens* posredovane transformacije. Razvijen je protokol koji se može uspešno koristiti kao dopuna konvencionalnim metodama oplemenjivanja značajnih kultivara perunike kao i za proširenje genetičkog fonda vrsta roda *Iris*.
3. Veoma visoka frekvencija genetičke transformacije *I. germanica* pomoću *A. tumefaciens* postignuta je upotrebom superbinarnih vektora za transformaciju, kao što je pTOK233.
4. Kao najbolji agensi za uspešnu selekciju transgenih perunika pokazali su se higromicin, zatim geneticin (G418) i Basta.
5. Uspešno su regenerisane transgene perunike kod kojih je dobijena ektopična ekspresija bakterijskog *crtB* gena. Do povećanja sinteze i akumulacije karotenoida, posebno likopena, kao i promene boje došlo je u kalusnom tkivu i prirodno zelenim delovima cvetova *I. germanica*, kao što su cvetne drške, plodnici, braktični listići, bazalni delovi perigona (standardi i folovi) kao i u belim prašnicima.
6. Ektopična ekspresija CRTB u transgenim perunikama nije dovela do povećanja sadržaja likopena u standardima i folovima. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da nivo prekursora likopena, fitoen, verovatno nije limitirajući korak u biosintezi karotenoida u ovim delovima cveta.

7. Po prvi put uspešno je kloniran i funkcionalno okarakterisan gen za kapsantin-kapsorubin sintazu (*Llccs*) iz tigrastog ljiljana (*L. lancifolium*). Klonirani *Llccs* gen će omogućiti bolje razumevanje biosinteze  $\kappa$ -ksantofila, njegovo korišćenje za indukovanje promena boje u cvetovima i plodovima različitih biljnih vrsta kao i poboljšanju nutritivnih vrednosti poljoprivrednih kultura.
8. Promotorski region *Llccs* gena (PL*lccs*) je takođe identifikovan i uspešno koloniran. Ekspresija *crtB* transgena u transformisanim perunikama pod kontrolom ovog promotora ograničena je pre svega na različite delove cveta dok postoje samo tragovi ekspresije u listovima i rizomima. Prema tome PL*lccs* je podesan za cvet-specifičnu ekspresiju transgena kod perunika i drugih monokotila sa ciljem modifikacije boje cvetova.
9. Postignuta je genetička transformacija paradajza (*S. lycopersicum*) *Llccs* genom i dokazano je da dovodi do značajnih promena u boji cvetova. Boja cvetova je bila promenjena od prirodne žute do različitih nijansi narandžaste, kao posledica akumulacije dva za paradajz nova karotenoida, kapsantina i kapsantin-sličnog karotenoida.
10. Na osnovu ovih rezultata može se očekivati da bi se uz primenu snažnijih i za cvet-specifičnih promotora koji bi kontrolisali ekspresiju *Llccs* gena moglo doći do još većeg povećanja metaboličke konverzije prekursora u kapsantin i kapsorubin. Na taj način dobile bi se tamnije nijanse narandžasto-crvenih i crvenih boja cvetova nastale usled povećane akumulacije ovih crvenih pigmenata.
11. Kao generalni zaključak može se reći da rezultati ove teze nedvosmisleno dokazuju da je moguće promeniti boju cvetova biljaka pa samim tim i perunika genetičkim inženjeringom putem modulacije (upotrebom CRTB) i modifikacije (upotrebom LICCS) biosintetičkog puta karotenoida.

## 7. LITERATURA

- Abedinia M., Henry R.J., Blakeney A.B., Lewin L. (1997) An efficient transformation system for the Australian rice cultivar, Jarrah. *Austral. J. Plant. Physiol.* 24: 133–141.
- Arencibia A.D., Carmona E.R., Téllez P., Chan M-T., Yu S-M., Trujillo L.E., Oramas P. (1998) An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* sp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 7: 213–222.
- Arias-Garzón D.I., Sarria R. (1995) New *Agrobacterium tumefaciens* plasmids for cassava transformation. *Proc. 2nd Intl. Scientific Mtg. of The Cassava Biotechnol. Network. CIAT Working Doc.* 150, 1: 245–251.
- Bartley G.E., Scolnik P.A. (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7: 1027–1038.
- Bouvier F., Hugueney P., d'Harlingue A., Kuntz M., Camara B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6: 45–54.
- Bouvier F., d'Harlingue A., Camara B. (1997) Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 346: 53–64.
- Bouvier F., d'Harlingue A., Backhous R.A., Kumagai M.H., Camara B. (2000) Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur. J. Biochem.* 267: 6346–6352.
- Brand M.H. (2006) Ornamental plant transformation. *J. Crop Improvement*, 17: 27–50.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.P. (1995) *Carotenoids*, Vols. I and II. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander, H. (2004) *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Bruce B.D. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.* 10: 440–447.
- Camara B., Monéger R. (1978) Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry*, 17: 91-93.



- Camara B. (1993) Plant phytoene synthase complex—component enzymes, immunology, and biogenesis. *Methods Enzymol.* 214: 352-365.
- Campbell W.H., Gowri G. (1990) Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. *Plant Physiol.* 92: 1–11.
- Cazzonelli C.I., Pogson B.J. (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 15: 266-274.
- Cazzonelli C.I. (2011) Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* 38: 833–847.
- Chandler S., Tanaka Y. (2007) Genetic modification in floriculture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26: 169–197.
- Chandler S.F., Brugliera F. (2011) Genetic modification in floriculture. *BiotechnolLett.* 33: 207–214.
- Chandler S.F., Sanchez C. (2012) Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnol. J.* 10: 891–903.
- Chen F-C., Kuehnle A.R. (1996) Obtaining Transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolated internodes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 47–51.
- Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971–980.
- Chilton M.D., Currier T.C., Farrand S.K., Bendich A.J., Gordon M.P., Nester E.W. (1974) DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3672–3676.
- Christensen A. H., Qual P. H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5: 213–218.
- Comber H. F. (1949) A new classification of the genus *Lilium*. *Lily Yearbook*, Royal Hort. Soc. 13: 86–105.
- Conner A.J., Dommiss E.M. (1992) Monocotyledonous plants as host for *Agrobacterium*. *Int. J. Plant. Sci.* 153: 550–555.
- Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and

- promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Christensen A.H., Quail P.H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5: 213-218.
- Cunningham F.X. Jr., Sun Z., Chamovitz D., Hirschberg J., Gantt E. (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* Strain PCC7942. *Plant Cell*, 6: 1107–1121.
- Cunningham F. X. Jr., Gantt E. (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557–583.
- Cunningham F. X. Jr. (2002) Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74: 1409–1417.
- Cunningham F.X. Jr., Gantt E. 2005. A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoids biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant J.* 41: 478–492.
- Davis J., Henderson D., Kobayashi M., Clegg M.T., Clegg M.T. (1998) Genealogical relationship among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. *J. Hered.* 89: 319–323.
- De Jong P.C. (1974) Some notes on the evolution of lilies. *North Am. Lily Yearb.* 27: 23–28.
- Deli J., Matus Z., Tóth G (2000) Carotenoid composition in the fruits of *Asparagus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2793–2796.
- Dun E.A., Brewer P.B., Beveridge C.A. (2009) Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends Plant Sci.* 14: 364–372.
- Dyer A.G., Whitney H.M., Arnold S.E.J., Glover B.J., Chittka L. (2007) Mutations perturbing petal cell shape and anthocyanin synthesis influence bumblebee perception of *Antirrhinum majus* flower colour. *Arthropod-Plant Int.* 1: 45–55.
- Enfissi E.M.A, Fraser P.D., Lois L-M., Boronat A., Schuch W., Bramley P.M. (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and nonmevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 3: 17–27.

- Estévez J.M., Cantero A., Reindl A., Reichler S., León P. (2001) 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 22901–22909.
- Fraser P.D., Elisabete M., Pinto S., Holloway D.E., Bramley P.M. (2000) Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* 24: 551–558.
- Fraser P.D., Romer S., Shipton C.A., Mills P.B., Kiano J.W., Misawa N., Drake R.G., Schuch W., Bramley P.M. (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1092–1097.
- Fraser, P.D., Bramley P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43: 228–265.
- Fray R.G., Wallace A., Fraser P.D., Valero D., Hedden P., Bramley P.M., Grierson D. (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.* 8: 693–701.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 123: 6–13.
- Fujisawa M., Watanabe M., Choi SK., Teramoto M., Ohyama K., Misawa N. (2008) Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene *crtB*. *J Biosci. Bioeng.* 105: 636–641.
- Gardner W.H. (1960) The genus *Iris*—its pigments and chromosomes. *Dyestuffs*, quarterly journal of National Aniline Division of Allied Chemical Corp. 43: 137–148.
- Giuliano G., Bartley G.E., Scolnik P.A. (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*, 5: 379–387.
- Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E.C., Peterson G., Smith R.H. (1991) Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.* 95: 426–434.

- Gozu Y., Yokoyama M., Nakamura M., Namba R., Yomogida K., Yanagi M., Nakamura S. (1993) *In vitro* propagation of *Iris pallida*. Plant Cell Rep. 13: 12–16.
- Hayashi H., Alia, Mustardy L., Deshniem P., Ida M., Murata N. (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. Plant J. 12: 133–142.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J. 6: 271–282.
- Hirschberg J., Cohen M., Harker M., Lotan T., Mann V., Pecker I. (1997) Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. Pure Appl. Chem. 69: 2151–2158.
- Hirschberg J. (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 210–218.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature, 303: 179–180.
- Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S., Hoekema A. (1993) New *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Transgenic Res. 2: 208–218.
- Howitt, C.A. and Pogson, B.J. (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. Plant Cell Environ. 29: 435–445.
- Huguency P., Badillo A., Chen H-C., Klein A., Hirschberg J., Camara B., Kuntz M. (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. Plant J. 8: 417–424.
- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnol. 14: 745–750.
- Jarvis P., Soll J. (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. Biochim. Biophys. Acta. 1541: 64-79 [Erratum (2002) 1950: 177-189]
- Jefferson R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387–405.

- Jéhan H., Courtois D., Ehret C., Lerch K., Petiard V. (1994) Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. *Plant Cell Rep.* 13: 671–675.
- Jeknić Z., Lee SP, Davis J, Ernst RC, Chen THH (1999) Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 575–580.
- Jeknić Z., Jevremović S., Subotić A., Chen T. H.H. (2011) Modification of carotenoid pigments in *Iris germanica* L. by overexpression of phytoene synthase gene (*crtB*) from *Pantoea agglomerans*. 16<sup>th</sup> International Symposium on Carotenoids 17-22 July 2011, Krakow, Poland, *Acta Biologica Cracovensia* 52, pp. 90.
- Jeknić Z., Morré J.T., Jeknić S., Jevremović S., Subotić A., Chen T.H.H. (2012) Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from tiger lily (*Lilium lancifolium* Thunb. ‘Splendens’). *Plant Cell Physiol.* 53: 1899–1912.
- Jevremović S., Jeknić Z., Subotić A., Trifunović M., Petrić M., Milošević M. (2011) Mogućnost proizvodnje perunika pomoću *in vitro* kulture. XVI Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, Zbornik radova, Vol 16 (18): 215-220.
- Jevremović S., Jeknić Z., Subotić A. (2013) Micropropagation of *Iris* sp. In: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants* (Lambardi M., Ozudogru E.A. and Jain S.H., eds.), *Methods in Molecular Biology* vol. 11013, pp. 291–303. Springer Science+Business Media, New York.
- Kamo K., Blowers A., Smith F., Van Eck J. (1995) Stable transformation of *Gladiolus* using suspension cell and callus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 347–352.
- Kandeler R., Ullrich W.R. (2009) Symbolism of plants: examples from European-Mediterranean culture presented with biology and history of art. *J. Exp. Bot.* 60: 1067–1068
- Karrer P., Oswald A. (1935) Carotinoide aus den staubbeutel von *Lilium tigrinum*. Ein neues carotenoid: anthetaxanthin. *Helv. Chim. Acta*, 13: 1303–1305.
- Kawabe A., Miyashita N. (2003) Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species. *Genes Genet. Syst.* 78: 343–352.
- Kay Q.O.N., Daoud H.S., Stirton C.H. (2003) Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Bot. J. Linn. Soc.* 83: 57–84

- Kikkert J.R., Vidal J.R., Reisch B.I. (2004) Stable transformation of plant cells by particle Bombardment/Biolistics. In: *Methods in molecular biology* (Peña L, ed.), Transgenic plants: methods and protocols, pp. 61–78. Totowa, NJ, Humana Press Inc.
- Kohlein F. (1987) *Iris*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Komari T. (1990) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vector that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Rep.* 9: 303–306.
- Komari T., Hiei Y., Ishida Y., Kumashiro T., Kubo T. (1998) Advances in cereal gene transfer. *Plant Biotechnol.* 1: 161–165.
- Krinsky N., Johnson E. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* 26:459–516.
- Kubasik P., Sandmann G. (2000) Molecular evaluation of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem. Soc. T.* 28: 806–810.
- Kuehnle A.R., Sugii N. (1992) Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep.* 11: 484–488.
- Kumagai M.H., Keller Y., Bouvier F., Clry D., Camara B. (1998) Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin-capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 14: 305–315.
- Ladygin V.G. (2000) Biosynthesis of carotenoids in plastids of plants. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 1113-1128. Translated from *Biokhimiya*, 65: 1317–1333.
- Lee H.S., Castle W.S., Coates, G.A. (2001) High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr. A*, 913: 371–377.
- Lemaux P.G., Cho M.J., Zhang S., Bregitzer P. (1996) Bombardment-mediated transformation methods for barley. *Bio-Rad US/EG Bulletin 2007*, pp. 1-6.
- Li H-Q., Sautter C., Potrykus I., Puonti-Kaerlas J. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihotesculenta*Crantz). *Nat. Biotechnol.* 14: 736–740.
- Li L., Paolillo D.J., Parthasarathy M.V., Dimuzio E.M., Garvin D.F. (2001) A novel gene mutation that confers abnormal patterns of beta-carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.* 26: 59–67.

- Liu C-N., Li X-Q., Gelvin S.B. (1992) Multiple copies of *virG* enhance the transient transformation of celery, carrot, and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 20: 1071–1087.
- Lu S., Eck Van J., Zhou X., Lopez A.B., O'Halloran D.M., Cosman K.M., Conlin B.J., Paolillo D.J., Garvin D.F., Vrebalov J., Kochian L.V., Kupper H., Earle E.D., Cao J., Li L. (2006) The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *Plant Cell* 18: 3594–3605.
- Mann V., Harker M., Pecker I., Hirschberg J. (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat. Biotechnol.* 18: 888–892.
- Maoka T., Goto Y., Isobe K., Fujiwara Y., Hashimoto K., Mochida K. (2001a) Antioxidative activity of capsorubin and related compounds from paprika (*Capsicum annuum*). *J. Oleo. Sci.* 50: 663–665.
- Maoka T., Mochida K., Kozuka M., Ito Y., Fujiwara Y., Hashimoto K., Enjo F., Ogata M., Nobukuni Y., Tokuda H., Nishino H. (2001b) Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. *Cancer Lett.* 172: 103–109.
- Maoka T., Akimoto N., Fujiwara Y., Hashimoto K. (2004) Structure of new carotenoids with the 6-oxo-kend group from the fruits of paprika, *Capsicum annuum*. *J. Nat. Prod.* 67: 115–117.
- Maoka T. (2009) Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 483: 191–195.
- Märki-Fischer E., Eugster C.H. (1985) Das carotinoidspektrum der antheren und petalen von *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night'. *Helv. Chim. Acta*, 68: 1708–1715.
- Márkus F., Daood H.G., Kapitány J., Biacs P. A. (1999) Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *J. Agric. Food Chem.* 47: 100–107.
- Matsufuji H., Nakamura H., Chino M., Takeda M. (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 3468–3472.
- Meckenstock D.H. (2005) Breeding red irises: the carotenoids. Instant Publisher.com, USA.

- Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H. (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330: 677–678.
- Mialoundama A.S., Heintz, D., Jadid, N., Nkeng, P., Rahier, A., Deli, J., Camara, B., Bouvier, B. (2010) Characterization of plant carotenoid cyclases as members of the flavoprotein family functioning with no net redox change. *Plant Physiol.* 153: 970–979.
- Momonoi K., Yoshida K., Mano S., Takahashi H., Nakamori C., Shoji K., Nitta A., Nishimura M. (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J.* 59: 437–447.
- Morris W.L., Ducreux L.J.M., Hedden P., Millam S., Taylor M.A. (2006) Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J. Exp. Bot.* 57: 3007–3018.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Murillo E., McLean R., Britton G., Agócs A., Nagy V., Deli J. (2011) Sapotexanthin, an A-provitamin carotenoid from red mamey (*Pouteriasapota*). *J. Nat. Prod.* 74: 283–285.
- Murillo E., Mosquera Y., Kurtán T., Gulyás-Feket G., Nagy V., Deli J. (2012) Isolation and characterization of novel capsorubin-like carotenoids from the red mamey (*Pouteriasapota*). *Helv. Chim. Acta*, 95: 983–988.
- Nakamura N., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Ishiguro K., Suzuki K., Suzuki H., Okazaki K., Shibata D., Tanaka Y. (2010) Generation of pink flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirecting the flavonoid biosynthetic pathway from delphinidin to pelargonidin. *Plant Biotechnol.* 27: 375–383.
- Nakatsuka T., Abe Y., Kakizaki Y., Yamamura S., Nishihara M. (2007) Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 26: 1951–1959.
- Nambara E., Marion-Poll A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann. Rev. Biol.* 56: 165–185.



- Nielsen, K. M., Lewis, D. H., Morgan, E. R. (2003) Characterization of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook). *Euphytica*, 130: 25–34.
- Nishihara M., Nakatsuka T. (2011) Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnol. Lett.* 33: 433–441.
- Niyogi K. (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin. Plant Biol.* 3: 455–460.
- Ohmiya A. (2011) Diversity of carotenoid composition in flower petals. *JARQ-Jpn. Agr. Res. Q.* 45: 163–171.
- Ohta S., Mita S., Hattori T., Nakamura K. (1990) Construction and expression in tobacco of a b-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805–813.
- Olson, J. (1989) Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *J. Nutr.* 119: 105–108.
- Partali V., Liaaen-Jensen S., Huneck S., Khaidav T. (1987) Carotenoids from the flowers of *Lilium pumilum*. *Die Pharmazie.* 42: 208.
- Pinck M., Guilley E., Durr A., Hoff M., Pinck L., Fleck J. (1984) Complete sequence of one of the mRNAs coding for the small subunit of ribulosebiphosphate carboxylase of *Nicotiana sylvestris*. *Biochimie*, 66: 539–545.
- Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. (2006) PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell*, 18: 1274–1291.
- Ralley L., Enfissi E.M.A., Misawa N., Schuch W., Bramley P.M., Fraser P.D. (2004) Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J.* 39: 477–486.
- Rosati C., Diretto G., Giuliano G. (2009) Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnol. Genet. Eng.* 26: 151-174.
- Rawson J.R.Y., Thomas K., Clegg M.T. (1982) Purification of total cellular DNA from a single plant. *Biochem. Genet.* 20: 209–219.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. (2012) Physical methods for genetic plant transformation. *Phys. Life Rev.* 9: 308–345.

- Rodríguez-Concepción M. (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 504: 118–122.
- Ronen G., Carmel-Gorent L., Zamirt D., Hirschberg J. (2000) An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* and *old-gold* color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11102–11107.
- Rossmann M.G., Moras D., Olsen K.W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, 250: 194–199.
- Rüttimann A. (1982) Synthesis and stereochemistry of red pepper carotenoids. In: *Carotenoid chemistry and biochemistry* (Britton, G. and Goodwin, T.W., eds), pp. 71–86. Pergamon, Oxford.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Plainview, N.Y.
- Sanford, J.C. (1990) Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79: 206–209.
- Schaub P., Al-Babili S., Drake R., Beyer P. (2005) Why is golden rice golden (yellow) instead of Red? *Plant Physiol.* 138: 441–450.
- Schrott M. (1995) Selectable markers and reporter genes. In: *Gene transfer to plants* (Potrykus I. and Spangenberg G., eds.), pp. 325–336. Springer-Verlag, Berlin.
- Seybold A. (1953) Untersuchungen über den farbwechsel von blumenblättern, früchten und samenschalen. *Sber. Heidelb. Akad. Wiss. Math.-Naturwiss. Kl.* 4: 31–124.
- Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S., Ke D.Y. (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20: 401–412.
- Shimamoto K. (1994) Gene expression in transgenic monocots. *Curr. Opin. Biotech.* 5: 158–162.
- Shiono M., Matsugaki N., Takeda K. (2008) Structure of commelinin, a blue complex pigment from the blue flowers of *Commelina communis*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 84: 452–456.
- Simkin A.J., Gaffé J., Alcaraz J-P., Carde J-P., Bramley P.M., Fraser P.D., Kuntz M. (2007) Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry* 68: 1545–1556.

- Smith H.R., Hood E.E. (1995) *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci.* 35: 301–309.
- Suzuki S., Nishihara M., Nakatsuka T., Misawa N., Ogiwara I., Yamamura S. (2007) Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Rep.* 26: 951–959.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54: 733–749.
- Takeda K., Fujii A., Senda Y., Iwashina T. (2010) Greenish blue flower colour of *Strongylodon macrobotrys*. *Biochem. Syst. Ecol.* 38: 630–633.
- Tanaka Y., Brugliera F., Kalc G., Senior M., Dyson B., Nakamura N., Katsumoto Y., Chandler S. (2010) Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1760-1769.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11: 1369–1375.
- Umemoto N., Takano M., Shimada H., Mamiya K., Toguri T. (2006) Flower color modification by xanthophyll biosynthetic genes in petunia. *Plant Cell Physiol.* 47 Suppl. pp. S110.
- Umemoto N., Toguri T. (2012) Peptide transporting to chromoplasts in petals and method of constructing plant having yellowish petals by using the same. *US Pat* 8, 143, 478.
- Vain P., De Buyser J., Trang V.B., Haicour R., Henry Y. (1995) Foreign gene delivery into monocotyledonous species. *Biotechnol. Adv.* 13: 653–671.
- Valadon L.R.G., Mummery R.S. (1976) Carotenoids of lilies and of red pepper: biogenesis of capsanthin and capsorubin. *Z. Pflanzenphysiol.* 82: 407–416.
- van der Meer I.M., Brouwer M., Spelt C.E., Mol J.N.M., Stuitje A.R. (1992) The TACPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative cis-acting module in the control of organ-specific expression. *Plant J.* 2: 525-535.

- Van Heukelem L., Thomas C.S. (2005) The HPLC method. In: *The Second SeaWiFS HPLC Analysis Round-Robin Experiment (SeaHARRE-2)*, (Hooker S. et al. eds.), pp. 86–92. NASA Technical Memorandum 2005-212785.
- van Marrewijk G.A.M. (1994) Prospects of biotechnology in horticultural breeding. *Acta Hort.* 369: 199–219.
- Wang M.B., Li Z.Y., Matthews P.R., Upadhyaya N.M., Waterhouse P.M. (1998) Improved vectors for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of monocot plants. *Acta Hort.* 461: 401–407.
- Wang Y., Jeknić Z., Ernst R.C., Chen T.H.H. (1999a) Efficient plant regeneration from suspension-cultured cells of tall bearded iris. *HortScience*, 34: 730–735.
- Wang Y., Jeknić Z., Ernst R.C., Chen T.H.H. (1999b) Improved plant regeneration from suspension-cultured cells of *Iris germanica* L. ‘Skating Party’. *HortScience*, 34: 1271–1276.
- Walkerpeach C.R., Velten J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: Cointegrate and binary vector systems. In: *Plant molecular biology manual*, (Gelvin S.B. and Schilperoort R.A., eds.), pp. B1/1–B1/19. 2<sup>nd</sup> edn. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Warburton B. (1978) *The world of irises*. The American Iris Society, Salt Lake City.
- Welsch R., Beyer P., Huguency P., Kleinig H., von Lintig J. (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846–854.
- Wenck A.R., Quinn M., Whetten R.W., Pullman G., Sederoff R. (1999) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol. Biol.* 39: 407–416.
- Werckmeister P. (1960) Iris colors and pigments. *Bull. Amer Iris Soc.* 158: 25–33.
- Willis T.G., Jadayel D.M., Coignet L.J.A., Abdul-Rauf M., Treleaven J.G., Catovsky D., Dyer, M.J.S. (1997) Rapid molecular cloning of rearrangements of the *IGHJ* locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood*, 90: 2456–2464.
- Yabuya T., Nakamura M., Iwashina T., Yamaguchi M., Takehara T. (1997) Anthocyanin-flavone copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.) *Euphytica*, 98: 163–167.

- Yamagishi M., Kishimoto S., Nakayama M. (2010) Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. *Plant Breeding*, 129: 100–107.
- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303–305.
- Yoshida K., Miki N., Momonoi K., Kawachi M., Katou K., Okazaki Y., Uozumi N., Maeshima M., Kondo T. (2009) Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 85: 187–197.
- Zhu C., Bai C., Sanahuja G., Yuan D., Farré G., Naqvi S., Shi L., Capell T., Christou P. (2010) The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Arch. Biochem. Biophys.* 504: 132–141.

## **8. BIOGRAFIJA AUTORA**

Zoran D. Jeknić je rođen 11. jula 1964. godine u Kolašinu, Crna Gora gde je završio osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina, studijska grupa Profesor Biologije, upisao je 1984. godine, a završio 1989. godine. U periodu od 1986-1989. godine je bio angažovan kao student saradnik na Katedri za mikrobiologiju, Odseka za biologiju. Posle završenog fakulteta karijeru počinje na Institutu za Mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju "Dr Robert Freid" u Sarajevu gde radi kao istraživač saradnik od 1989 do 1992. godine. Godine 1989. upisuje magistarske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Imunologija, a zatim 1990. prelazi na smer Molekularna biologija. U periodu od 1989-1990. godine je bio na stručnom usavršavanju na Vojno Medicinskoj Akademiji u Beogradu gde je radio u oblasti produkcije i karakterizacije monoklonalnih antitela.

Marta 1992. godine odlazi na stručno usavršavanje iz oblasti molekularne biologije na Oregon State University, Corvallis, Sjedinjene Američke Države. Od 1992-1996. godine sa manjim prekidima, a od 1996-2012 bez prekida, radio je kao istraživač saradnik, kasnije kao stariji istraživač saradnik i Lab-menadžer na Odeljenju za hortikulturu, Oregon State Univerzitet, Sjedinjene Američke Države.

Do sada, je bio angažovan na dva nacionalna i pet međunarodnih projekata. Zoran Jeknić je do sada bio koautor tri poglavlja u međunarodnim monografijama, 17 radova međunarodnog značaja, 3 rada nacionalnog značaja i 15 kongresnih saopštenja.

Godine 2009. nastavlja svoje započete studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu i prelazi na doktorske studije. Od januara 2011. godine učesnik je projekta koje finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (TR31019).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани \_\_\_\_\_ Зоран Јекнић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ 1306/09 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

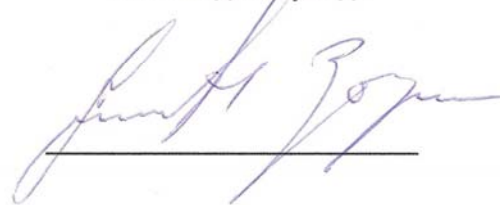
да је докторска дисертација под насловом

Промена боје цвета перунике (*Iris germanica* L.) генетичком модификацијом  
биосинтезе каротеноида

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 18.04.2013 \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Зоран Јекнић

Број индекса 1306/09

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада “Промена боје цвета перунике (*Iris germanica* L.) генетичком  
модификацијом биосинтезе каротеноида”

Ментор Др Светлана Радовић

Потписани/а Зоран Јекнић

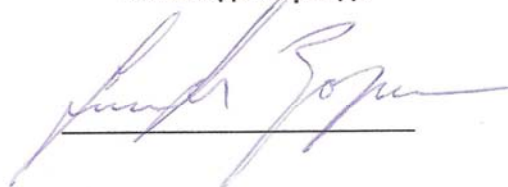
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 18.04.2013



\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Промена боје цвета перунике (*Iris germanica* L.) генетичком модификацијом

биосинтезе каротеноида

која је моје ауторско дело.

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

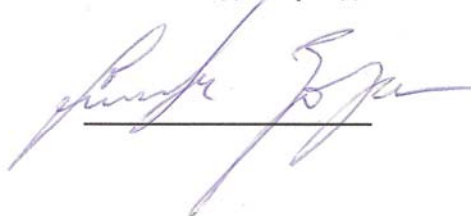
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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).

У Београду, 18.04.2013

Потпис докторанда



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

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

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

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

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

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