

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milena Z. Trajković

**REGENERACIJA BILJAKA *IN VITRO* I  
GENETIČKA TRANSFORMACIJA  
*Viola cornuta* (Violaceae)  
GENOM ZA  
KAPSANTIN-KAPSORUBIN-SINTAZU**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milena Z. Trajković

**PLANT REGENERATION *IN VITRO*  
AND GENETIC TRANSFORMATION  
OF *Viola cornuta* (Violaceae) USING  
CAPSANTHIN-CAPSORUBIN-SYNTHASE  
GENE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

**Mentori:**

---

dr Slađana Jevremović, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

dr Aleksandar Čingel, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**Članovi Komisije:**

---

dr Ivana Dragičević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

dr Svetlana Radović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

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

## Zahvalnica

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije pod naslovom „Regeneracija biljaka in vitro i genetička transformacija Viola cornuta (Violaceae) genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu” urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.*

*Ovom prilikom želim da se zahvalim svojoj mentorki, dr Slađani Jevremović, na angažovanju u oblasti krioprezervacije biljaka, kao i na analizi akumulacije pigmenata u biljnom tkivu V. cornuta. Veliko hvala za svu pozitivnu energiju koju mi je pružala svih ovih godina, a koja mi je u mnogim situacijama bila potrebna, naročito kada se stvari nisu odvijale po planu. Brojni saveti, sugestije pa i kritike su mi mnogo značili u trenucima izrade ove teze ali i tokom pisanja i uobličavanja teksta doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se i svom drugom mentoru, dr Aleksandru Cingelu, koji me je uveo u svet genetičkih transformacija. Hvala mu za sve savete koji su mi mnogo značili i što je bio tu za svaku konsultaciju kad god mi je bila potrebna. Izuzetno mi je drago što sam imala priliku da sarađujem, i nadam se da će u budućnosti biti još takvih prilika.*

*Profesorki dr Ivani Dragičević se iskreno zahvaljujem na svim sugestijama, savetima i objašnjenjima koja su mi bila jako korisna prilikom uobličavanja teksta doktorske disertacije.*

*Profesorki dr Svetlani Radović se zahvaljujem na izdvojenom vremenu i korisnim savetima prilikom uobličavanja teksta doktorske teze.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem dr Angelini Subotić, koja mi je omogućila da učestvujem u istraživanjima na projektu „Razvoj i primena biotehnoških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka”. Hvala joj na svim sugestijama, savetima, razumevanju, razgovorima i podršci koju mi je pružala svih ovih godina. Takođe joj se zahvaljujem i na angažovanju oko histoanatomskih istraživanja.*

*Dr Zoranu Jekniću se najpre zahvaljujem na dobijenim transformacionim vektorima pomoću kojih su rađeni eksperimenti genetičkih transformacija V. cornuta. Takođe želim da se zahvalim za svu pomoć koja nikada nije izostala, za sve savete vezane za nedoumice koje su postojale i objašnjenja iz oblasti genetičkog inženjerstva koja su mi mnogo značila prilikom izrade ove teze.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj kolegici Dragani Antić-Reljin koja je na samom početku učestvovala u realizaciji eksperimenata regeneracije biljaka Viola cornuta i na taj način dala svoj doprinos ovoj doktorskoj disertaciji.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Ani Simonović koja me je naučila tehnikama analize ekspresije gena. Dr Milanu Dragičeviću se zahvaljujem na angažovanju oko analize pigmenata HPLC metodom.*

*Dr Žarku Kevrešanu sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu se zahvaljujem što nam je omogućio da uradim analizu određivanja boje cveta instrumentalnom metodom i što mi je pomogao prilikom analize dobijenih podataka.*

*Kolegicama dr Milani Trifunović-Momčilov i dr Snežani Milošević hvala na svakoj pomoći i savetima koji su mi mnogo značili u pojedinim trenucima.*

*Svim svojim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” želim da se zahvalim prvenstveno na kolegijalnosti i pozitivnoj atmosferi koja je rad činila lakšim i lepšim. Hvala i svima onima koji su na bilo koji način doprineli kvalitetu ove teze.*

*Svojoj dragoj kolegini, dr Mariani Stanišić, se beskrajno zahvaljujem na svemu što mi je pružila, a pre svega na iskrenom prijateljstvu. Mnogi njeni saveti su mi dosta značili prilikom izrade ove teze a nesebična pomoć mi je u više navrata dobrodošla.*

*Želim da se zahvalim i svom suprugu Predragu koji je od samog početka doktorskih studija bio uz mene, podržavao moj rad i imao razumevanja za sve ono što radim. Hvala mu za sve ove godine požrtvovanja, strpljenja i nadanja u bolje sutra. Hvala mu za svu ljubav koju mi pruža i što je deo mog života.*

*Svojoj mami Svetlani ipak dugujem najveću zahvalnost. Hvala joj na bezuslovnoj ljubavi, optimizmu koji i dan danas ima, i pomoći u svakom trenutku i segmentu mog života. Beskrajno joj hvala na svemu što je učinila za mene i, i dalje čini, i na svoj žrtvi koju je sama podnela da bi me izvela na pravi put. Stoga ovu doktorsku disertaciju njoj i posvećujem.*

**Regeneracija biljaka *in vitro* i genetička transformacija  
*Viola cornuta* (Violaceae) genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu**

**SAŽETAK**

Razvijen je protokol za regeneraciju biljaka *Viola cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens', sitnocvetne ljubičice sa cvetovima žute boje, i genetičku transformaciju genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu u cilju promene boje cveta metaboličkom modifikacijom biosinteze karotenoida. Najuspešnija indukcija adventivnih izdanaka dobijena je od eksplantata hipokotila gajenih na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2 mg/l BAP u uslovima dugog dana. Indukcija adventivnih izdanaka odvijala se procesom indirektno i direktno organogeneze. Transformisani izdanci dobijeni su genetičkom transformacijom pomoću "praznog" (*Llccs*-) i pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos (35S-*Llccs*) vektora, dok je korišćenjem pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos (PchsA-*Llccs*) vektora dobijen transformisani kalus. Prisustvo *Llccs*, *hpt* i *uidA* gena u genomu *V. cornuta* potvrđeno je PCR analizom, dok je qPCR analiza pokazala neujednačen nivo ekspresije *Llccs* gena u kruničnim listićima cvetova i listovima 35S-*Llccs* transformisanih linija. Boja kruničnih listića cvetova i žiga tučka promenjena je iz žute, odnosno zelene u nijanse narandžaste boje, usled akumulacije kapsantina, novosintetisanog crvenog pigmenta u hromoplastima 35S-*Llccs* transformisanih biljaka. Fenotip transformisanih biljaka se značajno razlikovao od fenotipa netransformisanih biljaka. Razvijen je protokol za dugotrajno čuvanje (krioprezervaciju) netransformisanih i transformisanih linija korišćenjem metode vitifikacije sa PVS3 rastvorom. Oporavak vrhova izdanaka i regeneracija biljaka transformisanih linija (*Llccs*- i 35S-*Llccs*) posle krioprezervacije bili su značajno manji u odnosu na oporavak vrhova netransformisanih izdanaka. Nivo ploidnosti biljaka *V. cornuta* regenerisanih u kulturi *in vitro*, transformisanih linija kao i biljaka regenerisanih posle krioprezervacije bio je identičan.

**Ključne reči:** ljubičica, hipokotil, *de novo* organogeneza, *Agrobacterium tumefaciens*, karotenoidi, *Llccs* gen, kapsantin, promena boje cveta, krioprezervacija.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i molekularna biologija biljaka

**UDK broj:**

**Plant regeneration *in vitro* and genetic transformation of  
*Viola cornuta* (Violaceae) using capsanthin-capsorubin-synthase gene**

**ABSTRACT**

A protocol for the plant regeneration of *Viola cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens', horned pansy with yellow flowers and the genetic transformation with the capsanthin-capsorubin-synthase gene in order to change flower color by metabolic modification of carotenoid biosynthesis were developed. The most efficient induction of adventitious shoots was obtained from hypocotyl explants grown on ½MS medium with 0,1 mg/l 2,4-D and 2 mg/l BAP under 16h light/8h dark conditions. The induction of adventitious shoots was achieved through a process of indirect and direct organogenesis. Transformed shoots were obtained by genetic transformation using "empty" (*Llccs*-) and pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos (35S-*Llccs*) vectors, while using pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos (PchsA-*Llccs*) vectors transformed calli were obtained. The presence of the *Llccs*, *hpt* and *uidA* genes in the *V. cornuta* transformed plants were confirmed by PCR analysis, while qPCR analysis showed an unequal level of *Llccs* gene expression in the petals and leaves of 35S-*Llccs* transformed lines. The color of the flower petals and the stigma changed from yellow or green to shades of orange, due to the accumulation of capsanthin, a newly synthesized red pigment in the chromoplasts of 35S-*Llccs* transformed plants. The phenotype of transformed plants differed significantly from the phenotype of untransformed plants. A protocol for the long-term storage (cryopreservation) of untransformed and transformed lines using the vitrification method with PVS3 solution has been developed. The recovery of shoot tips and regeneration of transformed lines (*Llccs*- and 35S-*Llccs*) after cryopreservation was significantly lower compared to the recovery of the shoot tips of the untransformed shoots. The ploidy levels of *V. cornuta* plants regenerated in culture *in vitro*, transformed lines and plants recovered after cryopreservation were similar.

**Key words:** horned pansy, hypocotyl, *de novo* organogenesis, *Agrobacterium tumefaciens*, carotenoids, *Llccs* gene, capsanthin, flower colour change, cryopreservation.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology and molecular biology

**UDC number:**

# SADRŽAJ

## SKRAĆENICE

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. <i>Viola cornuta</i> .....	1
1.2. Klasične metode oplemenjivanja ukrasnih biljaka.....	3
1.3. Savremene metode oplemenjivanja i dugotrajnog čuvanja ukrasnih biljaka.....	3
1.3.1. Regeneracija ukrasnih biljaka u kulturi <i>in vitro</i> .....	4
1.3.1.1. Regeneracija biljaka roda <i>Viola in vitro</i> .....	4
1.3.2. Krioprezervacija ukrasnih biljaka.....	8
1.3.3. Genetičko inženjerstvo ukrasnih biljaka.....	9
1.3.3.1. Transfer gena posredovan bakterijom <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	10
1.3.3.2. Primena genetičkog inženjerstva u hortikulturi.....	11
1.3.4. Promena boje cveta.....	14
1.3.4.1. Modifikacija biosinteze flavonoida.....	14
1.3.4.2. Modifikacija biosinteze karotenoida.....	17
1.3.4.2.1. Promena boje cveta genetičkom modifikacijom biosinteze karotenoida.....	23
1.4. Status i perspektive gajenja ukrasnih biljaka sa promenjenom bojom cveta.....	25
<b>2. CILJ RADA</b> .....	26
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	27
3.1. Biljni materijal.....	27
3.1.1. Sterilizacija semena.....	27
3.2. Sastav hranljivih podloga.....	27
3.3. Uslovi gajenja u kulturi <i>in vitro</i> .....	29
3.4. Klijanje semena u kulturi <i>in vitro</i> .....	30
3.5. Regeneracija izdanaka <i>V. cornuta</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	30
3.5.1. Regeneracija izdanaka iz odsečaka klijanaca.....	30
3.5.1.1. Uticaj svetlosti na regeneraciju izdanaka.....	30
3.5.1.2. Uticaj pozicije odsečaka hipokotila na regeneraciju izdanaka.....	31
3.5.1.3. Histoanatomska analiza organogeneze izdanaka.....	31
3.5.2. Regeneracija izdanaka na eksplantatima poreklom od <i>in vitro</i> gajenih izdanaka <i>V. cornuta</i> .....	31
3.6. Umnožavanje izdanaka <i>V. cornuta</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	32
3.7. Ožiljavanje izdanaka <i>V. cornuta</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	32
3.8. Aklimatizacija biljaka <i>V. cornuta</i> iz kulture <i>in vitro</i> .....	32
3.9. Genetička transformacija <i>V. cornuta</i> .....	33
3.9.1. Vektori korišćeni za genetičku transformaciju.....	33
3.9.2. Sastav hranjive podloge za rast bakterija.....	33
3.9.3. Određivanje selektivne koncentracije higromicina.....	34
3.9.4. Genetička transformacija eksplantata hipokotila <i>V. cornuta</i> pomoću <i>A. tumefaciens</i> .....	34
3.10. Potvrda uspešnosti genetičke transformacije <i>V. cornuta</i> .....	37
3.10.1. Histoemijski GUS test.....	37
3.10.2. PCR analiza.....	37
3.11. Umnožavanje i ožiljavanje transformisanih izdanaka <i>V. cornuta</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	39
3.12. Aklimatizacija transformisanih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	39
3.13. Analiza genske ekspresije.....	40
3.13.1. Izolacija RNK.....	40
3.13.2. RT-PCR.....	41
3.13.3. Kvantitativni PCR (qPCR).....	43



3.14. Analiza akumulacije karotenoida u biljnom tkivu <i>V. cornuta</i> .....	45
3.14.1. Detekcija novosintetisanog pigmenta.....	45
3.14.2. Određivanje promene hromatičnosti pomoću CIE L*a*b* koordinatnog sistema..	45
3.14.3. HPLC analiza karotenoidnih pigmenata.....	46
3.15. Analiza fenotipskih karakteristika transformisanih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	47
3.16. Krioprezervacija vrhova izdanaka <i>V. cornuta</i> .....	47
3.17. Analiza ploidnosti regenerisanih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	48
3.18. Statistička obrada podataka.....	48
<b>4. REZULTATI</b> .....	49
4.1. Klijanje semena i regeneracija biljaka <i>V. cornuta</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	49
4.1.1. Klijanje semena.....	49
4.2. Indukcija organogeneze izdanaka na eksplantatima klijanaca <i>V. cornuta</i> .....	50
4.2.1. Uticaj svetlosti na indukciju organogeneze izdanaka na odsečcima hipokotila.....	52
4.2.2. Uticaj pozicije odsečaka hipokotila na indukciju formiranja izdanaka.....	53
4.2.3. Histoanatomska analiza indukcije organogeneze izdanaka na odsečku hipokotila....	55
4.3. Indukcija organogeneze izdanaka na eksplantatima <i>in vitro</i> gajenih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	57
4.3.1. Uticaj citokinina na formiranje kalusa i izdanaka.....	57
4.3.2. Uticaj kombinacije auksina i citokinina na formiranje kalusa i izdanaka.....	59
4.4. Umnožavanje izdanaka <i>V. cornuta</i> .....	62
4.4.1. Umnožavanje izdanaka dobijenih regeneracijom na eksplantatima klijanaca.....	62
4.4.2. Umnožavanje i izduživanje izdanaka dobijenih od eksplantata <i>in vitro</i> gajenih biljaka.....	63
4.5. Ožiljavanje izdanaka <i>V. cornuta</i> .....	63
4.6. Aklimatizacija biljaka <i>V. cornuta</i> .....	66
4.7. Genetička transformacija <i>V. cornuta</i> .....	67
4.7.1. Selektivna koncentracija higromicina.....	67
4.8. Transformacija genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu ( <i>Llccs</i> ).....	69
4.8.1. Potvrda genetičke transformacije.....	71
4.8.1.1. Histochemijski GUS test.....	71
4.8.1.2. PCR.....	72
4.9. Umnožavanje izdanaka transformisanih linija <i>V. cornuta</i> .....	74
4.10. Ožiljavanje izdanaka transformisanih linija <i>V. cornuta</i> .....	74
4.11. Aklimatizacija biljaka transformisanih linija <i>V. cornuta</i> .....	77
4.12. Ekspresija <i>Llccs</i> gena.....	79
4.13. Akumulacija karotenoida u kalusu i cvetovima <i>V. cornuta</i> .....	81
4.13.1. Detekcija novosintetisanog pigmenta.....	81
4.13.2. Promene hromatičnosti u CIE L*a*b* sistemu kod transformisanih cvetova.....	83
4.13.3. HPLC analiza sadržaja ksantofila.....	84
4.14. Fenotipske karakteristike transformisanih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	85
4.15. Krioprezervacija vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih linija <i>V. cornuta</i> .....	90
4.16. Analiza nivoa ploidnosti regenerisanih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	94
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	96
5.1. Klijanje semena <i>V. cornuta</i> .....	96
5.2. Uticaj tipa eksplantata i hranljive podloge na regeneraciju biljaka.....	97
5.2.1. Odsecci hipokotila kao početni eksplantati za regeneraciju i genetičku transformaciju <i>V. cornuta</i> .....	101
5.3. Genetička transformacija <i>V. cornuta</i> .....	103
5.3.1. Ekspresija <i>Llccs</i> gena u transformisanih biljkama.....	107

5.3.2. Akumulacija karotenoida u cvetovima transformisanih biljaka.....	108
5.3.3. Fenotipske karakteristike transformisanih linija.....	110
5.4. Krioprezervacija transformisanih linija <i>V. cornuta</i> .....	111
5.4.1. Nivo ploidnosti regenerisanih biljaka <i>V. cornuta</i> .....	113
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>114</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>116</b>

#### BIOGRAFIJA AUTORA

Prilog 1 - Izjava o autorstvu

Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Prilog 3 - Izjava o korišćenju

## SKRAĆENICE

2,4-D	2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina
ABA	abscisinska kiselina
ANOVA	analiza varijanse
ANS	antocijanidin-sintaza
AS	acetosiringon
BAP	6-benzilaminopurin
BCH	$\beta$ -karoten-hidroksilaza
CaMV	mozaični virus karfiola (eng. <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> )
CCD	karotenoid-dioksigenaza
CCS	kapsantin-kapsorubin-sintaza
CHI	halkon-izomeraza
CHS	halkon-sintaza
CHYB	$\beta$ -karoten-hidroksilaza
CPPU	N-fenil-N'-(2-hloro-4-piridil) urea
CYP97C	citohrom P450 monooksigenaza 97C
DFR	flavonoid-4-reduktaza
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DXS	1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat-sintaza
F3'5'H	flavonoid-3',5'-hidroksilazu
F3'H	flavonoid-3'-hidroksilaza
F3H	flavonoid-3-hidroksilaza
GA <sub>3</sub>	giberelna kiselina
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPT	higromicin-fosfotransferaza
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
KIN	kinetin – 6-furfuril-aminopurin
LCYB	likopen- $\beta$ -ciklaza
LCYE	likopen- $\epsilon$ -ciklaza
LN	tečni azot (eng. <i>Liquid Nitrogen</i> )
LS	rastvor za krioprotekciju (eng. <i>Loading Solution</i> )
LSD	najmanja statistički značajna razlika (eng. <i>Least Significant Difference</i> )
MS	Murashige & Skoog hranljiva podloga
NAA	$\alpha$ -naftalen-sirćetna kiselina
NXS	neoksantin-sintaza
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDS	fitoen-desaturaza
PSY	fitoen-sintaza
PTGS	eng. <i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>
PVS	rastvor za vitrifikaciju (eng. <i>Plant Vitrification Solution</i> )
qPCR	kvantitativni PCR
RNK	ribonukleinska kiselina
RT	reakcija reverzne transkripcije (eng. <i>Reverse Transcription</i> )
T-DNK	eng. <i>Transfer-DNA</i>
TDZ	tidiazuron – 1-fenil-3-tidiazol-5-urea
TGS	eng. <i>Transcriptional Gene Silencing</i>
Ti	eng. <i>Tumor-inducing</i>
<i>uidA</i> (GUS)	$\beta$ -glukuronidaza
VDE	violaksantin-de-epoksidaza

WPM	eng. <i>Woody Plant Medium</i>
YEP	hranljiva podloga za gajenje bakterija (eng. <i>Yeast Extract Pepton</i> )
ZDS	ζ-karoten-desaturaza
ZE	zeaksantin-epoksidaza
Z-ISO	ζ-karoten-izomeraza

## 1. UVOD

### 1.1. *Viola cornuta*

*Viola cornuta* pripada porodici ljubičica (Violaceae) koja obuhvata oko 1100 biljnih vrsta raspoređenih u do sada opisana 22 roda (Ballard i sar., 2014), rasprostranjena širom sveta izuzev Arktičke oblasti. Najbrojniji rod ove porodice je upravo *Viola*, a za njim slede rodovi *Rinorea* i *Hybanthus*. Rod *Viola* (ljubičice) obuhvata oko 600 biljnih vrsta rasprostranjenih u područjima sa umerenom klimom severne i južne hemisfere, uglavnom u planinskim regionima (Marcussen i sar., 2015). Centri diverziteta su u Južnoj Americi, Jugoistočnoj Evropi i Istočnoj Aziji, a pojedine endemične vrste mogu se pronaći u Africi, Istočnoj Australiji, na Tasmaniji, Novom Zelandu i Havajima (Marcussen i Karlsson, 2010). Pripadnici ovog roda mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste, žbunaste i ređe drvenaste biljne vrste. Cvetovi mogu biti bele, žute, plave i ljubičaste boje, sa šarama ili bez njih.

Ljubičice su poznate od davnina, prema nekim podacima čak iz perioda pre nove ere kada su ih uzgajali antički Grci i Rimljani. Koristili su ih u ishrani i pravili od njih biljne preparate i vina, a smatrali su ih i simbolom ljubavi i plodnosti. Stari Rimljani su pravili venac od ljubičica kako bi se ublažile glavobolje i vrtoglavice (<https://www.theflowerexpert.com>). Sa početka XIX veka ljubičice su gajene u vrtovima kao ukrasne biljke, a procesom ukraštanja dobijen je veliki broj raznovrsnih hibrida. Ljubičice sa žutim cvetovima, *V. lutea* i *V. altaica* bile su osnov za stvaranje hibrida poznatih kao *V. x wittrockiana*. Danas postoji veliki broj *Viola* sa cvetovima različitih boja, od žute, preko crvene i ljubičaste, do onih sa raznovrsnim šarama (<http://americanvioletsociety.org/>).

Zbog svog mirisa, cvetovi i listovi *V. odorata* se koriste u industriji parfema (Karioti i sar., 2011; Saint-Lary i sar., 2014). Ljubičice su pre svega ukrasne biljke, ali su među njima i vrste koje su retke, ugrožene (*V. stagnina*) ili su bogate sekundarnim metabolitima pa se koriste u terapijske svrhe (*V. patrinii*, *V. pilosa*, *V. odorata*) (Chalageri i Babu, 2012; Soni i Kaur, 2014; Zabicki i sar., 2019). Pojedine vrste *Viola* su bogate antocijaninima koji imaju antioksidativna svojstva (Zhang i sar., 2011), a značajan broj vrsta ne samo iz roda *Viola* već i iz drugih rodova porodice Violaceae bogat je ciklotidima, cikličnim ribozomalnim proteinima koji imaju brojne biološke aktivnosti, uključujući insekticidalnu, antiviralnu, antimikrobnu, antitumorsku, hemolitičku i citotoksičnu aktivnost (Trabi i sar., 2009; Tang i sar., 2010; Slazak i sar., 2015; Narayani i sar., 2017). Pretpostavlja se da su ciklotidi prisutni kod skoro svih vrsta roda *Viola*. Kao narodni lek koristio se čaj od cvetova ljubičica a njegova lekovita svojstva dokazana su kliničkim studijama. Tako sirup *V. odorata* može pomoći u suzbijanju kašlja kod dece koja boluju od astme (Qasemzadeh i sar., 2015), a uljani ekstrakt cvetova iste vrste pomaže kod problema sa nesanicom (Feyzabadi i sar., 2014).

Becker (1925) je rod *Viola* podelio u 14 sekcija, 28 podsekcija i 7 serija na osnovu ultrastrukture tučka. Od tada, mnogi istraživači su radili reviziju Becker-ove klasifikacije, međutim, podela unutar roda je ostala nedovoljno objašnjena. Na osnovu rasprostranjenosti vrsta, kariotipa i filogenetskih dokaza pretpostavljeno je da vrste ovog roda vode poreklo sa južne hemisfere odakle su se postepeno širile ka severnoj hemisferi (Clausen, 1929; Ballard i sar., 1999; Marcussen i sar., 2012). Neke od predloženih ideja su se bazirale na razlici u morfološkim karakteristikama, ali i ukrštanju između vrsta. Nedavno su Marcussen i saradnici (2015) izvršili podelu unutar roda *Viola* na osnovu rasprostranjenosti, broja hromozoma i nivoa ploidijske, rasporedivši ih u 16 sekcija. Smatra se da su *Viola sp.* tokom evolucije bile zahvaćene aloploploidijom koja je bila u visokom procentu zastupljena prilikom njihovog nastanka.

Vrstu *Viola cornuta*, sitnocvetnu ljubičicu, prvi je opisao Karl Line (1763). Ona potiče sa Pirineja u Francuskoj i Španiji, a vremenom je introdukovana u Veliku Britaniju, Austriju, Švajcarsku, Češku, Slovačku, Italiju, prostore bivše Jugoslavije i Rumuniju (Royal Botanic Gardens, 2017). *V. cornuta* pripada sekciji *Melanium*. U narodu je poznata i kao „Dan i noć” (eng. *horned pansy*, *horned violet*), zbog toga što donji krunični listić ima razvijenu ostrugu u kojoj se skladišti nektar (Slika 1a). *V. cornuta* je tokom vremena ukrštana sa vrstama iz istog roda pri čemu

su nastajali hibridi čiji su cvetovi bili jednobojni, jakog i slatkog mirisa. Smatralo se da su prave sitnocvetne ljubičice samo one čiji su cvetovi čistih boja.

Klasifikacija:

Carstvo	Plantae
Razdeo	Magnoliophyta
Klasa	Magnoliopsida
Podklasa	Dilleniidae
Red	Violales
Familija	Violaceae
Rod	<i>Viola</i> L.
Sekcija	<i>Melanium</i>
Vrsta	<i>Viola cornuta</i> L. (eng. <i>horned pansy</i> )

*V. cornuta* L. kultivar 'Lutea Splendens' je sitnocvetna ljubičica sa cvetovima jasno žute boje (Slika 1b). Biljke dostižu visinu do 30 cm, listovi su prosti, naizmenični, jajastog do ovalnog oblika i nejednako nazubljeni. U pazuhu listova formiraju se cvetni pupoljci koji se razvijaju na dugačkim stabljikama u čijim se osnovama nalazi par brakteola. Cvetovi su pojedinačni i zigomorfni. Sastoje se od pet kruničnih listića koji su slobodni i pet čašičnih listića lancetastog oblika koji ne opadaju nakon cvetanja. Četiri krunična listića su upravljena na gore, a jedan na dole. Cvetovi imaju pet prašnika, a tučak je sinkarpan i sastoji se od tri oplodna listića. Plod je čaura i pripada grupi prostih, pucajućih plodova. Prilikom sušenja kapsule dolazi do pucanja čaure pri čemu se oslobađaju semena koja mogu da se raseju u daljinu do nekoliko metara. *V. cornuta* cveta od ranog proleća pa sve do kasnog leta. Oprašuje se insektima, najčešće mravima i pčelama. Generativno se razmnožava semenom, a vegetativno reznicama.



**Slika 1.** *Viola cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens'. a - cvetovi sitnocvetne ljubičice, b - sitnocvetna ljubičica u fazi cvetanja. Bar = 15 mm.

Danas se komercijalno gaji više od 25 kultivara *V. cornuta*, od kojih je većina nastala ukrštanjem sa *V. x wittrockiana*. Nastali kultivari imaju širok spektar boja cvetova od bele, žute pa sve do ljubičaste boje (Royal Botanic Gardens, 2017).

## 1.2. Klasične metode oplemenjivanja ukrasnih biljaka

Ukrasne biljne vrste od davnina privlače pažnju svojim mirisom, cvetovima raznih boja, veličina i struktura, kao i ukrasnim listovima. One se koriste za ukrašavanje javnih površina i životnog prostora, a mogu se koristiti kao saksijske ili rezane biljke. Osim svojih estetskih karakteristika, ukrasne biljne vrste predstavljaju ekonomski važan segment hortikulture i već dugi niz godina se nalaze u komercijalnoj upotrebi. Glavni cilj istraživača je razvoj sorti i hibrida sa novim karakteristikama kao što su drugačija boja i arhitektura cveta. Proteklih decenija nove osobine su dobijene pomoću klasičnih metoda kao što su selekcija iz prirodnih populacija, metod hibridizacije i metod odabiranja mutacije. Međutim, sve te metode su karakterisala i određena ograničenja i nedostaci, kao što su visok stepen heterozigotnosti, poliploidije i somaklonalna variranja (Shibata, 2008), a za dobijanje sorti sa željenom osobinom bilo je potrebno više godina. Biljke proizvedene ovim putem bile su skupe i samim tim dostupne samo malom broju potencijalnih kupaca (Pierik, 1987).

Oplemenjivanje putem hibridizacije započeto je sredinom XIX veka (Horn, 1956). Međusobnim ukrštanjem vrsta roda *Viola* dobijeno je na stotine kultivara sa krupnim cvetovima različitih boja. Hibridi ljubičica koji su dobijeni na ovaj način bili su viši, i imali su veće cvetove i duže lisne drške u odnosu na biljke koje su odabrane za sam proces ukrštanja. Cvetovi hibrida su bili jednobojni, dvobojni ili višebojni (Wittrock, 1895). U cilju dobijanja genotipova sa željenim osobinama, oplemenjivanje ljubičica bilo je postignuto ili autopoliploidijom koja je indukovana mutagenezom ili alopolidijom koja je nastala kao posledica interspecijske hibridizacije (Schum, 2003). Razvoj biotehnologije omogućio je prevazilaženje nedostataka i ograničenja klasičnih metoda oplemenjivanja biljaka primenom savremenih metoda.

## 1.3. Savremene metode oplemenjivanja i dugotrajnog čuvanja ukrasnih biljaka

Pretpostavka o sposobnosti izolovanih biljnih ćelija da se dele i formiraju kompletnu biljku, s početka XX veka, dovela je do razvoja metoda za gajenje biljaka u kulturi *in vitro* (Haberlandt, 1902). Od male količine početnog biljnog materijala mogao se dobiti veliki broj biljaka za relativno kratko vreme, koji je garantovao zdrav i visokokvalitetni biljni materijal (Vasil, 2008). Sa razvojem kulture *in vitro*, počele su da se osnivaju kompanije koje se bave proizvodnjom cveća na ovaj način. Najveći proizvođači ukrasnih biljaka koji koriste metode razmnožavanja biljaka *in vitro* su Holandija, Kolumbija, Izrael i Italija (Rout i sar., 2006). Prihod od proizvodnje ukrasnih biljaka raste iz godine u godinu i meri se u desetinama biliona američkih dolara. Osim u komercijalne svrhe, tehnike kulture *in vitro* se koriste za očuvanje i zaštitu genofonda ugroženih i retkih vrsta, uklanjanje virusa iz zaraženih biljaka, i propagaciju lekovitih vrsta u cilju proizvodnje sekundarnih metabolita (Snyman i sar., 2011).

Metode krioprezervacije omogućavaju čuvanje biljnog materijala na ultra niskoj temperaturi (-196 °C) u tečnom azotu neograničeno dugo (Matsumoto, 2017). Krioprezervirani materijal se čuva na malom prostoru i zaštićen je od kontaminacije (Dulloo i sar., 2009).

Razvoj nauke i usavršavanje laboratorijskih tehnika tokom druge polovine XX veka omogućili su manipulacije genetičkim materijalom i razvoj genetičkog inženjerstva. Zahvaljujući otkriću sposobnosti bakterija iz roda *Agrobacterium* da unesu sopstveni genetički materijal u genom biljne ćelije, tj. izvrše njenu prirodnu transformaciju, dobijene su biljke sa poboljšanim već postojećim ili novim karakteristikama metodama genetičkog inženjeringa (Saeed i Shahzad, 2016).

### 1.3.1. Regeneracija ukrasnih biljaka u kulturi *in vitro*

Regeneracija biljaka u kulturi *in vitro* odvija se zahvaljujući totipotentnosti biljnih ćelija, odnosno njihovoj sposobnosti da se dediferenciraju, dele i regenerišu pojedine organe, embrione ili celu biljku (Fehér, 2019). U zavisnosti od tipa eksplantata i načina na koji se regeneranti formiraju, vegetativno razmnožavanje biljaka u kulturi *in vitro* može se odvijati putem mikropropagacije, organogeneze i somatske embriogeneze (Rout i sar., 2006).

Mikropropagacija u širem smislu podrazumeva svaki način razmnožavanja *in vitro*. U užem smislu, mikropropagacija se odnosi na vegetativno razmnožavanje izolovanih apikalnih i aksilarnih pupoljaka. Kao početni eksplantati koriste se vrhovi izdanaka koji imaju razvijene bar dve lisne primordije. Somaklonalna variranja su u tom slučaju svedena na minimum jer se takvim načinom propagacije podstiče razviće prethodno formiranih primordija pupoljaka. Mikropropagacija obuhvata uspostavljanje aseptične kulture, indukciju izdanaka, njihovo izduživanje i umnožavanje, ožiljavanje genetički identičnih izdanaka i njihovu aklimatizaciju (Singh, 2015). Najznačajnije vrste ukrasnih biljaka koje su umnožene metodom mikropropagacije su *Gerbera* (Murashige i sar., 1974), *Anthurium* (Kunisaki, 1980), *Pelargonium* (Cassells i Minas, 1983), *Passiflora spp.* (Ozarowski i Thiem, 2013), *Eustoma* (Kaviani i sar., 2014), *Rosa* (Aryan i Poonam, 2016), *Ajuga* (Park i sar., 2017). Organogeneza podrazumeva formiranje biljnih organa *de novo*, izdanaka i korenova, iz nemeristemskih tkiva. Organogeneza po načinu postanka može biti direktna ili indirektna. U procesu direktne organogeneze, ćelije trajnih tkiva se dediferenciraju i organizuju u meristemske centre koji će dati začetke novih organa. Kod indirektno organogeneze dediferencirane ćelije se prvo dele i formiraju kalusno tkivo, a potom lokalizovani meristemski centri stiču strukturu apikalnog meristema određenog organa. Organogeneza se sastoji iz tri faze. U prvoj fazi ćelije stiču kompetenciju za regeneraciju, u drugoj fazi dolazi do indukcije odnosno determinacije ćelija za formiranje meristema i na kraju dolazi do formiranja organa, izdanaka ili korenova, na podlozi bez ili sa regulatorima rasteinja (Duclercq i sar., 2011). Za formiranje biljnih organa uglavnom su neophodni regulatori rasteinja čiji odnos određuje koji će organ biti formiran. Najčešće se koriste hranljive podloge sa auksinima i citokininima. Ukoliko je veća koncentracija citokinina u hranljivoj podlozi formiraće se izdanci, a ako je veća koncentracija auksina u odnosu na citokinine u hranljivoj podlozi onda će se formirati korenovi. Prva ukrasna biljka koja je regenerisana u kulturi *in vitro* bila je ciklama, čiji su segmenti krtola gajeni na hranljivoj podlozi sa  $\alpha$ -naftalen-sirćetnom kiselinom (NAA) (Mayer, 1956). Morel (1964) je opisao propagaciju orhideja *in vitro* i procenio da se od samo jednog eksplantata *Cymbidium* godišnje može dobiti čak četiri miliona biljaka. Nakon toga je propagacija u kulturi *in vitro* postala metod za proizvodnju orhideja čije je razmnožavanje klasičnim metodama predstavljalo mukotrpan posao. Brojne ukrasne biljke su regenerisane iz različitih eksplantata procesom organogeneze, kao što su *Rosa* (Elliott, 1970), *Petunia* (Sharma i Mitra, 1976), *Pelargonium* (Cassells i Minas, 1983), *Chrysanthemum* (Nalini, 2012), *Gerbera* (Cardoso i Teixeira da Silva, 2013), *Anthurium* (Teixeira da Silva i sar., 2015).

Somatska embriogeneza je takođe pokazala veliki potencijal za klonalnu propagaciju biljaka *in vitro*. Somatski embrioni su bipolarne strukture koje se mogu razviti iz somatskih ćelija eksplantata (direktna embriogeneza) ili iz prethodno formiranog embriogenog kalusa (indirektna embriogeneza), i potom formirati celu biljku. Regeneracija biljaka procesom somatske embriogeneze je postignuta kod vrsta iz rodova *Begonia* (Castillo i Smith, 1997), *Cyclamen* (Pueschel i sar., 2003), *Rosa* (Kim i sar., 2003) i *Saintpaulia* (Murch i sar., 2003). Iako se somatska embriogeneza pokazala kao dobar metod za mikropropagaciju ukrasnih biljaka, razvoj somatskih embriona zavisi od genotipa ispitivane biljne vrste i često se odlikuje niskom stopom klijanja (Rout i sar., 2006).

#### 1.3.1.1. Regeneracija biljaka roda *Viola in vitro*

U kulturu *in vitro* *Viola sp.* je uvedena devedestih godina XX veka (**Tabela 1**). Jedan od razloga je to što se neke vrste *Viola sp.* koriste u estetske svrhe (Babber i Sharma, 1991; Wang i



Bao, 2007; Chalageri i Babu, 2012; Narayani i sar., 2017). Iako postoje vrste sa cvetovima različitih boja i šara, na tržištu i dalje raste potražnja za novim kultivarima koji će i tokom zimskih meseci ukrašavati žardinjere, bašte i parkove, a koji se mogu obezbediti tehnikama *in vitro* kulture, pa samim tim i njihova komercijalna produkcija. Pored estetskih karakteristika, veliki broj vrsta je lekovito i poseduje različita biološka svojstva kao što su antiinflamatorna, antimalarijska, antioksidativna i brojna druga svojstva (Kaloo i sar., 2013; Soni i Kaur, 2014; Khajuria i sar., 2017; Zabicki i sar., 2019). One su bogate jedinjenjima kao što su alkaloidi, flavonoidi, triterpeni, glikozidi, zbog čega se koriste u terapijske svrhe (Zhu i sar., 2015). *V. odorata* (Narayani i sar., 2018) i *V. uliginosa* (Slazak i sar., 2015) su bogate ciklopeptidima koji takođe imaju brojna biološka svojstva. Poslednjih godina se sve više radi na identifikaciji ciklotida kod *Viola sp.*. Na osnovu nedavnih istraživanja ustanovljeno je da njihov sadržaj u biljci zavisi od razvojnog stadijuma biljke, sastava zemljišta na kojoj biljke rastu, vremenskih uslova i uticaja sredinskih faktora (Verma i Shukla, 2015). U kulturi *in vitro* uspešno su uspostavljene kulture kalusa, ćelijske suspenzije i somatskih embriona *V. odorata*. Na osnovu poređenja količine ciklotida kod biljaka različitog porekla, došlo se do otkrića da je njihov sadržaj veći u biljkama poreklom iz kulture *in vitro* nego u biljkama iz prirode. U pojedinim linijama kalusa su čak identifikovani ciklotidi kojih nema u drugim delovima regenerisanih biljaka (Narayani i sar., 2017). U ovim istraživanjima je potvrđeno da somatski embrioni mogu potencijalno biti glavni izvor ciklotida, a kultura *in vitro* metod koji bi obezbedio proizvodnju biomase kao i očuvanje genskog fonda *V. odorata*. Među vrstama roda *Viola sp.* postoje i vrste koje imaju sposobnost akumulacije teških metala, a naročito kadmijuma (Li i sar., 2010). Zbog prekomerne eksploatacije većina ovih vrsta je postala ugrožena na svojim staništima. Uvođenjem u kulturu *in vitro* omogućeno je njihovo razmnožavanje, primena u farmaceutskoj industriji kao i reintrodukcija na prirodna staništa.

Do sada su razvijeni protokoli za regeneraciju jedanaest vrsta roda *Viola* u kulturi *in vitro* (**Tabela 1**). Polovina istraživanja urađena je u proteklih pet godina. Za uspostavljanje kulture kalusa i kulture izdanaka korišćeni su različiti početni eksplantati, uključujući neoplođene jajne ćelije (Wijowska i sar., 1999), delove klijanaca (Babber i Sharma, 1991; Wang i Bao, 2007; Li i sar., 2010) i delove *in vitro* ili *ex vitro* gajenih biljaka (Naeem i sar., 2013; Antičić i sar., 2017). Najčešće korišćeni početni eksplantati bili su listovi i lisne drške (Sato i sar., 1995; Wang i Bao, 2007; Shabena i sar., 2010; Li i sar., 2010; Vishwakarma i sar., 2013; Naeem i sar., 2013; Slazak i sar., 2015; Mokhtari i sar., 2016; Haralkar i Biradar, 2016; Khajuria i sar., 2017; Narayani i sar., 2018; Zabicki i sar., 2019). Pored toga, kao početni eksplantati korišćeni su i korenovi klijanaca (Babber i Sharma, 1991; Li i sar., 2010). Kod nekih vrsta mikropropagacija *Viola sp.* dobijena je korišćenjem apikalnih i aksilarnih pupoljaka (Kaloo i sar., 2013; Soni i Kaur, 2014). Odsecci hipokotila korišćeni su samo za uspostavljanje kultura *V. tricolor* (Babber i Sharma, 1991).

Formiranje kalusa i izdanaka kod *Viola sp.* je indukovano na hranljivoj podlozi po Murashige i Skoog (1962). Korišćene su podloge sa punim koncentracijama mineralnih soli (MS), kao i podloge sa upola razblaženim rastvorom mineralnih soli ( $\frac{1}{2}$ MS). Pored MS mineralnih rastvora korišćeni su WPM (eng. *Woody Plant Medium*, Lloyd i McCown, 1980) i B5 (Gamborg i sar., 1968) mineralni rastvori, za uspostavljanje kulture kalusa i ćelijske suspenzije (Narayani i sar., 2017). Od biljnih regulatora rasteња za formiranje kalusa korišćeni su samo auksini ili auksini u kombinaciji sa citokininima. Kultura kalusa je kod nekoliko vrsta *Viola sp.* uspostavljena na podlozi sa 2,4-dihlorofenoksisirćetnom kiselinom (2,4-D) (Shabeena i sar., 2010; Vishwakarma i sar., 2013; Khajuria i sar., 2017; Narayani i sar., 2017), dok su Mokhtari i saradnici (2015) za formiranje kalusa pored 2,4-D koristili još jedan auksin, NAA. Za indukciju kalusa najčešće korišćena podloga sa auksinima i citokininima bila je podloga sa 2,4-D i 6-benzilaminopurinom (BAP) (Wijowska i sar., 1999; Wang i Bao, 2007; Naeem i sar., 2013; Haralkar i Biradar, 2016). Međutim, uspešno su se pokazale i druge kombinacije regulatora rasteња, kao što su BAP u kombinaciji sa NAA (Li i sar., 2010; Chalageri i Babu, 2012) i kinetin (KIN) u kombinaciji sa indol-3-buternom kiselinom (IBA) (Khajuria i Bisht, 2018). Za indukciju izdanaka korišćeni su različiti regulatori rasteња koji

**Tabela 1.** Morfogenetski odgovor različitih vrsta roda *Viola* u kulturi *in vitro*.

Biljna vrsta	Početni eksplantat	Hranljiva podloga (mg/l)	Morfogenetski odgovor	Referenca
<i>V. baoshanensis</i>	Delovi lista, lisne drške, korena	½MS + 0,93 NAA + 1,12 BAP ½MS + 0,5 IBA + 0,56 BAP	Kalusogeneza Indirektna organogeneza	Li i sar., 2010
<i>V. canescens</i>	Delovi lista, lisne drške	MS + 1-2 2,4-D	Kalusogeneza	Khajuria i sar., 2017
	Delovi lista	MS + 1,5 IBA + 1,5 KIN MS + 2 Zeatin ½MS + 1 IBA	Kalusogeneza Indirektna organogeneza Rizogeneza	Khajuria i Bisht, 2018
<i>V. cornuta</i>	Delovi lista, lisne drške	½MS + različite kombinacije BAP, KIN, TDZ ili CPPU + IAA/NAA ½MS	Direktna/indirektna organogeneza Rizogeneza	Antonić i sar., 2017
	Delovi hipokotila	½MS + 0,1 2,4-D + 2 BAP ½MS + 0,5 NAA + 1 BAP ½MS + 0,1 NAA	Kalusogeneza Indirektna organogeneza Rizogeneza	Trajković i sar., 2019
<i>V. odorata</i>	Neoplođena jajna ćelija	MS + 2,4-D + BAP	Kalusogeneza Rizogeneza	Wijowska i sar., 1999
	Delovi lista, lisne drške	MS + 2,4-D	Kalusogeneza	Shabeena i sar., 2010
	Apikalni/aksilarni pupoljci	MS + 2 NAA + 3,37 BAP	Mikropropagacija	Kaloo i sar., 2013
	Delovi lista, lisne drške, stabla	½MS + 0,15 2,4-D + 2,5 BAP ½MS + 0,5 NAA + 1,05 GA <sub>3</sub> + 0,42 AgNO <sub>3</sub> + 2,5 TDZ	Kalusogeneza Indirektna organogeneza	Naeem i sar., 2013
	Delovi lista, lisne drške	MS + 2,5 2,4-D + 2 NAA MS + 0,5/1 GA <sub>3</sub> + 2 TDZ	Kalusogeneza Indirektna organogeneza	Mokhtari i sar., 2015
	Delovi lista, lisne drške	MS + 0,5 IBA + 4 BAP MS + 1,5 IBA	Direktna organogeneza Rizogeneza	Mokhtari i sar., 2016
	Delovi lista, lisne drške	MS + 1,5 2,4-D + 3,5 BAP	Kalusogeneza	Haralkar i Biradar, 2016

Tabela 1. nastavak

<i>V. odorata</i>	Delovi lista, lisne drške	WPM + 4,5 2,4-D WPM + 3 2,4-D	Kalusogeneza	Narayani i sar., 2017
	Delovi lista, lisne drške	MS + 1 TDZ	Indirektna somatska embriogeneza	Narayani i sar., 2018
<i>V. patrinii</i>	Delovi lisne drške	MS + različiti regulatori rastenja	Kalusogeneza	Han i sar., 1990
	Delovi lisne drške	½MS + 0,93 NAA + 0,21 KIN	Indirektna organogeneza	Sato i sar., 1995
	Delovi lisne drške	MS + 3 NAA + 3 BAP MS + 0,5 NAA + 5 KIN ½MS + 2 IBA	Kalusogeneza Indirektna organogeneza Rizogeneza	Chalageri i Babu, 2012
<i>V. pilosa</i>	Aksilarni pupoljak	MS + 0,5 BAP + 0,5 GA <sub>3</sub> + 0,5 TDZ ½MS + 1 IBA	Mikropropagacija	Soni i Kaur, 2014
<i>V. serpens</i>	Delovi lisne drške	MS + 1,5 2,4-D	Kalusogeneza	Vishwakarma i sar., 2013
		MS + 2,5 BAP	Indirektna organogeneza	
		MS + 4 IBA	Rizogeneza	
<i>V. stagnina</i>	Delovi lista, lisne drške	MS + 0,5/1 TDZ ½MS + 0,5 IAA	Direktna/indirektna organogeneza Rizogeneza	Zabicki i sar., 2019
<i>V. tricolor</i>	Delovi hipokotila, kotiledona, korena	MS + različiti regulatori rastenja	Kalusogeneza	Babber i Sharma, 1991
<i>V. uliginosa</i>	Delovi lista, lisne drške	MS + 2 2,4-D + 2 KIN	Kalusogeneza	Slazak i sar., 2015
		MS + 0,5/1 TDZ	Direktna/indirektna organogeneza	
		½MS + 0,5 IBA	Rizogeneza	
<i>V. wittrockiana</i>	Delovi lisne drške	½MS + 0,1 2,4-D + 2 BAP	Kalusogeneza	Wang i Bao, 2007
		½MS + 0,2 NAA + 3 GA <sub>3</sub> + 2 TDZ	Indirektna organogeneza	
		MS + 0,2 NAA + 0,25 BAP	Rizogeneza	

MS, ½MS, WPM, B5 - mineralni rastvori; 2,4-D, IAA, IBA, NAA, BAP, KIN, TDZ, CPPU, zeatin, GA<sub>3</sub> - regulatori rastenja.

su predstavljali kombinaciju auksina (NAA ili IBA) i citokinina (BAP ili KIN) (Wijowska i sar., 1999; Wang i Bao, 2007; Haralkar i Biradar, 2016; Trajković i sar., 2019).

Kod nekih vrsta *Viola sp.* je pored ovih regulatora rastenja dodavan i tidiazuron (TDZ) koji se pokazao izuzetno efikasnim pri regeneraciji izdanaka (Wang i Bao, 2007; Soni i Kaur, 2014; Mokhtari i sar., 2015). TDZ kao jedini regulator rastenja u hranljivoj podlozi indukovao je izdanke (Slazak i sar., 2015; Zabicki i sar., 2019) ili somatske embrione (Narayani i sar., 2018). Indukcija izdanaka uspešno je dobijena na podlozi koja je pored auksina i citokinina sadržala srebro nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) i giberelnu kiselinu ( $\text{GA}_3$ ) (Naeem i sar., 2013). Hranljiva podloga sa zeatinom se takođe pokazala efikasnom za indukciju izdanaka u kulturi *Viola sp.* (Khajuria i Bisht, 2018).

Organogeneza kod *Viola sp.* indukovana je uglavnom indirektnim putem, na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama auksina i citokinina (Chalageri i Babu, 2012; Naeem i sar., 2013; Khajuria i Bisht, 2018). Na hranljivim podlogama sa TDZ u opsegu koncentracija od 0,5-1,0 mg/l izdanci su indukovani i indirektnim i direktnim putem (Slazak i sar., 2015; Zabicki i sar., 2019). Direktnom organogenezom regenerisani su izdanci na podlozi sa različitim koncentracijama IBA i BAP (Mokhtari i sar., 2016). Ožiljavanje regenerisanih izdanaka *Viola sp.* na hranljivoj podlozi sa IBA pokazalo se vrlo uspešnim. Zabicki i saradnici (2019) su za ožiljavanje izdanaka koristili podlogu sa indol-3-sirćetnom kiselinom (IAA), dok su Wang i Bao (2007) na podlozi sa NAA i BAP postigli formiranje korenovog sistema.

### 1.3.2. Krioprezervacija ukrasnih biljaka

Tehnike *in vitro* kulture su značajne sa aspekta očuvanja biodiverziteta biljaka, posebno genetičkih resursa rekalcitrantnih semena i biljaka koje se vegetativno razmnožavaju, retkih i ugroženih biljnih vrsta, kao i elitnih genotipova i genetički modifikovanog biljnog materijala (Engelmann, 2011). Međutim, pre više od pola veka razvijena je metoda krioprezervacije koja omogućava dugotrajno čuvanje biljnog materijala, u tečnom azotu na  $-196\text{ }^\circ\text{C}$ . Na toj temperaturi ćelijske deobe i metabolički procesi bivaju zaustavljeni pa se biljni materijal može čuvati teoretski neograničeno dugo bez ikakvih promena. Prednosti ove metode naspram *in vitro* kulture su, što ona ne zahteva velike troškove za održavanje kultura u laboratorijskim uslovima, potrebno je malo prostora, rizik od kontaminacija i somaklonalnih variranja je smanjen, a troškovi i ulaganja u ovakav vid čuvanja biljnog materijala je minimalan. U tečnom azotu se može čuvati najrazličitiji biljni materijal: semena, embrioni, vrhovi izdanaka, kalusi, ćelijske suspenzije i polen. Za krioprezervaciju ukrasnih biljaka obično se koriste vrhovi apikalnih ili aksilarnih izdanaka, jer se njihovom upotrebom obezbeđuje visok stepen genetičke stabilnosti regenerisanih biljaka (Reed, 2001). Važno je da vrh izdanaka bude u odgovarajućem fiziološkom stanju koje bi nakon krioprezervacije obezbedilo što bolje preživljavanje. Thinh (1997) je sugerisao da je najbolje da sam vrh bude prekriven sa jednom do dve lisne primordije, kako bi se postigao što bolji oporavak nakon otapanja iz tečnog azota. Takođe, starost pupoljaka može značajno uticati na uspešnost krioprezervacije. Smatra se da je optimalna starost između 2 nedelje (za vrhove apikalnih izdanaka) i 7 nedelja (za vrhove aksilarnih izdanaka) (Popova i sar., 2010).

Krioprezervacija se bazira na uklanjanju vode iz biljnog tkiva fizičkom ili hemijskom dehidratacijom, koja je praćena brzim zamrzavanjem biljnog materijala u tečnom azotu (Kaviani, 2011). Podrazumeva upotrebu hemijskih supstanci – krioprotektanata, koji se koriste u cilju zaštite biljnih ćelija od povreda do kojih može doći prilikom zamrzavanja. Krioprotektanti deluju tako što povećavaju stabilnost ćelijske membrane i viskozitet citoplazme biljne ćelije (Tanaka i sar., 2018).

Početakom devedesetih godina XX veka razvijene su tehnike koje se baziraju na vitrifikaciji, pri čemu je dodavanje koncentrovanih krioprotektivnih rastvora kojima se obezbeđuje dehidratacija ćelija kritični korak za postizanje preživljavanja biljnog materijala (Volk i Walters, 2010). Danas je vitrifikacija najkorišćenija tehnika za krioprezervaciju različitih biljnih delova. U međuvremenu su razvijene i tehnike koje predstavljaju varijacije vitrifikacije (Fabre i Dereuddre, 1990; Hirai i sar.,

1998; Panis i sar., 2005; Yamamoto i sar., 2011; Niino i sar., 2013; Nadarjan i Pritchard, 2014). Tehnike bazirane na vitrifikaciji sastoje se od nekoliko koraka koji uključuju predtretman, predkondicioniranje, predkulturu, osmoprotekciju, dehidraciju, hlađenje u tečnom azotu, otapanje, uklanjanje krioprotektanata i oporavak biljnog tkiva (Sakai i sar., 2008).

**Vitrifikacija** predstavlja fizički proces tokom koga se vrhovi izdanaka dehidrišu pomoću rastvora za vitrifikaciju (eng. *Plant Vitrification Solution* – PVS). Uspešnost krioprezervacije zavisi i od vrste, odnosno toga koliko je vrsta tolerantna na dehidraciju. U cilju postizanja što većeg preživljavanja nakon krioprezervacije potrebno je optimizovati korake koji se odvijaju pre samog potapanja uzoraka u tečni azot, kao što su predkondicioniranje i osmoprotekcija, ali i vremena koje je potrebno da uzorci provedu u PVS (Sakai i Engelmann, 2007). Predkondicioniranje uzoraka obuhvata tretman hlađenja, koji je obično karakterističan za vrste iz umerenih regiona, i tretman na podlozi sa određenom koncentracijom saharoze u trajanju od jednog do dva dana, u zavisnosti od optimizacije protokola za datu vrstu. Pre nego što se uzorci potope u PVS, oni se tretiraju rastvorima za krioprotekciju (eng. *Loading Solution* – LS) koji predstavljaju smeše krioprotektanata koji povećavaju otpornost tkiva na koncentrovanije i toksične komponente PVS kao što je dimetil sulfoksid (DMSO). Ti rastvori najčešće predstavljaju smešu 2 M glicerola i 0,4 M saharoze. Dehidracija biljnog materijala se postiže inkubiranjem eksplantata u rastvoru za vitrifikaciju. Najkorišćeniji rastvori su PVS2 (Sakai i sar., 1990) i PVS3 (Nishizawa i sar., 1993). Oni mogu biti toksični zbog prisustva visokih koncentracija krioprotektivnih supstanci u svom sastavu, pa je neophodno optimizovati vreme izlaganja uzoraka ovim rastvorima kako bi se dobio što bolji oporavak biljnog materijala nakon krioprezervacije (Ibrahim i Normah, 2013). Krioprezervacija vrhova izdanaka tehnikom vitrifikacije uspešno je postignuta kod ukrasnih biljaka kao što su *Lilium sp.* (Bouman i sar., 2003), *Chrysanthemum* (Halmagyi i sar., 2004), *Saintpaulia ionantha* (Moges i sar., 2004), *Gentiana sp.* (Mikuła i sar., 2005) i *Iris pumila* (Jevremović i sar., 2011).

Pre nepunih deset godina Yamamoto i saradnici (2011) razvili su tehniku **V krio pločica**. U suštini se radi o vitrifikaciji na aluminijumskim pločicama, na kojima su napravljena udubljenja u koja se stavljaju kapljice kalcijum-alginata kojima se dodaju vrhovi izdanaka koji će biti krioprezervirani. Zahvaljujući brzom hlađenju i kasnijem otapanju, koji štite ćelije tkiva od povreda, stope oporavka biljnog tkiva su mnogo više. V krio pločice su korišćene za krioprezervaciju *Dianthus caryophyllus* (Sekizawa i sar., 2011), *Mentha spp.* (Yamamoto i sar., 2012) i *Saccharum officinarum* (Rafique i sar., 2015).

### 1.3.3. Genetičko inženjerstvo ukrasnih biljaka

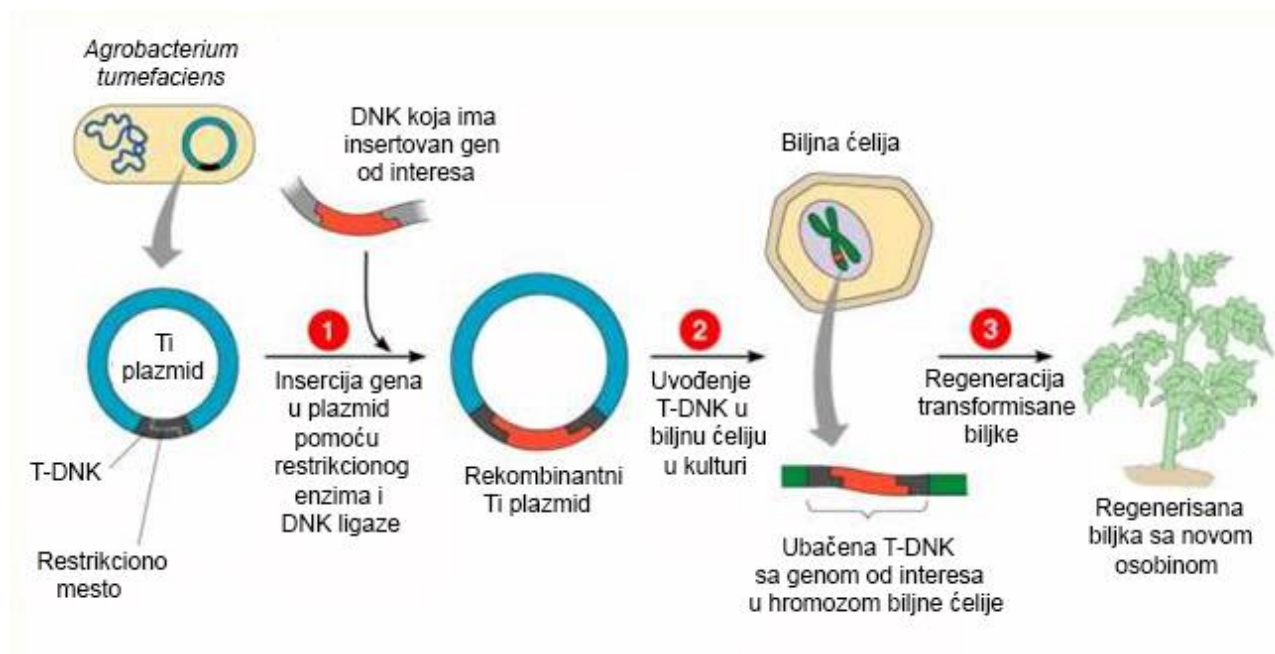
Genetička transformacija biljaka predstavlja svaki proces unosa strane DNK u ćeliju domaćina i njenu ugradnju u genom domaćina, što za posledicu ima ekspresiju stranog genetičkog materijala (Christou, 2013; Saeed i Shahzad, 2016). Oplemenjivanje biljaka klasičnim metodama je ograničeno na biljne vrste koje se razmnožavaju polnim putem i koje su međusobno kompatibilne (Ulukan, 2009). Nasuprot tome, primena metoda genetičkog inženjerstva omogućava prenos DNK sekvenci i njihovo kombinovanje sa genima koji potiču iz taksonomski udaljenih biljnih vrsta, pa čak i od organizama iz drugih carstava, kao što su bakterije, gljive i životinje.

Do danas su razvijene brojne metode za genetičku transformaciju biljaka. Postoje metode direktnog transfera DNK u ćeliju domaćina, među kojima su najzastupljenije biolistička metoda (Marchant i sar., 1998a), mikroinjektiranje (Neuhaus i Spangenberg, 1990) i elektroporacija (Shillito, 1999). Svaka od ovih metoda odlikuje se određenim prednostima, ali i nedostacima. Tako, na primer, biolističkom transformacijom dolazi do ugradnje velikog broja kopija transgena u genom domaćina pri čemu se narušava integritet njegove DNK, što može dovesti do epigenetskog utišavanja transgena u transformisanim biljkama (Ismagul i sar., 2018). Produkciju transgenih biljaka metodama mikroinjektiranja i elektroporacije ne odlikuje visoka efikasnost, jer je regeneracija biljaka iz protoplasta teška i zahteva puno vremena (van den Eede i sar., 2004; Banta i

Montenegro, 2008). Transformacija biljaka posredstvom patogena, *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*, predstavlja najkorišćeniju metodu kojom se vrši transformacija biljnog materijala. Ova metoda je relativno jednostavna, jeftina i omogućuje integraciju malog broja kopija transgena u genom domaćina, čime se smanjuje verovatnoća utišavanja transgena u transgenim biljkama (Hiei i sar., 1997).

### 1.3.3.1. Transfer gena posredovan bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je zemljišna bakterija koja ima sposobnost unošenja sopstvenog genetičkog materijala u genom biljne ćelije. Proučavanjem mehanizma ovog prirodnog horizontalnog transfera gena, pronađeni su načini za njegovu manipulaciju i unošenje željenih gena u biljnu ćeliju (Lacroix i Citovsky, 2019). *A. tumefaciens* kod viših biljaka dovodi do pojave tumora (eng. *crown gall disease*) kao posledica ugradnje i ekspresije T-DNK (eng. *Transfer-DNA*) sa Ti (eng. *Tumor-inducing*) plazmida u genom biljaka. Na Ti plazmidu se nalaze Vir geni (eng. *virulence*) koji kodiraju proteine koji omogućavaju prepoznavanje biljne ćelije od strane bakterije, zatim transfer T-DNK u biljnu ćeliju, ulazak T-DNK u jedro i njegovu integraciju u biljni genom (Subramoni i sar., 2014). Kada se radi o genetičkim transformacijama koje za cilj imaju uvođenje novih osobina kod odabrane biljne vrste, na Ti plazmidu se iseca T-DNK pomoću restrikcionih enzima, ubacuje se željena sekvenca gena i pomoću DNK ligaze se presečeni krajevi T-DNK povezuju (Slika 2, korak 1). Ovako konstruisan rekombinantni Ti plazmid koristi se za transformaciju biljne ćelije (Slika 2, korak 2). Kokultivacijom biljnog tkiva sa agrobakterijom dolazi do transformacije biljnih ćelija, odnosno ugradnje T-DNK u genom domaćina. Regeneracijom biljaka iz transformisanih ćelija dobijaju se transgene biljke sa željenim karakteristikama (Slika 2, korak 3) (Gelvin, 2003).



**Slika 2.** Šematski prikaz transfera gena prilikom genetičke transformacije pomoću *A. tumefaciens* (slika je preuzeta sa sajta [https://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Genetic\\_Engineering4D-Transformation-Plant\\_Cells.htm](https://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Genetic_Engineering4D-Transformation-Plant_Cells.htm) i modifikovana).

U vektoru za transformaciju biljaka, na T-DNK se pored gena od interesa najčešće nalaze i selektivni marker-geni, koji se koriste za razdvajanje ćelija transformisanih sa T-DNK iz bakterije od netransformisanih. Kako se prilikom inokulacije biljnog materijala mali broj ćelija transformiše,

selektivni marker-geni omogućavaju preživljavanje i oporavak transformisanih ćelija. Za selekciju transformisanog od netransformisanog biljnog tkiva uglavnom se koriste geni koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotike ili herbicide. Najčešće se koriste neomicin i higromicin-fosfotransferaze (*nptII* odnosno *hpt*) i fosfinotricin-acetiltransferaza (*ppt*) (Anami i sar., 2013). Genetička transformacija se vizuelno može pratiti tako što se u biljne ćelije unose i reporterski geni. Ovi geni kodiraju proteine koji se mogu direktno detektovati ili katalizuju specifične reakcije čiji je produkt lako uočljiv. Kao reporterski geni najčešće se koriste geni za  $\beta$ -glukuronidazu (*uidA*, odnosno GUS), luciferazu (LUC) i zeleno fluorescirajući protein (GFP) (Santi i sar., 2003).

Da bi se obezbedila ekspresija gena od interesa koji se posredstvom *A. tumefaciens* uvodi u biljni genom, potrebno je da gen bude pod kontrolom promotora. Prilikom konstrukcije vektora za genetičku transformaciju geni se vezuju za različite promotore, a u najširoj upotrebi je CaMV 35S promotor (eng. *Cauliflower Mosaic Virus*) poreklom iz mozaičnog virusa karfiola. CaMV 35S je jak konstitutivni promotor koji daje visoku ekspresiju u gotovo svim tkivima. Koristi se kada nije važno da ekspresija bude prostorno ili vremenski ograničena, ili kada je potrebno da produkt bude eksprimiran u svim delovima biljke tokom celog razvića. CaMV 35S je efikasniji kod dikotila nego kod monokotila (Somssich, 2019). Ovaj promotor ima dva domena - jedan domen predstavlja minimalni 35S promotor koji je neophodan, ali često nedovoljan za efikasnu ekspresiju, dok je drugi domen enhanser, odnosno pojačivač. Pored konstitutivnih promotora postoje i tkivno-specifični promotori koji su aktivni u određenim tkivima i organima kao što su fotosintetička tkiva, korenovi ili plodovi, i inducibilni promotori koji se aktiviraju signalima iz spoljašnje sredine, kao što su svetlost ili stres (Zheng i Baum, 2008).

### 1.3.3.2. Primena genetičkog inženjerstva u hortikulturi

Metodama genetičkog inženjerstva modifikuju se različite osobine kod ukrasnih biljaka, kao što su boja cveta, modifikacija mirisa (Zvi i sar., 2012), zatim promena oblika nekog biljnog organa (Brophy i sar., 2018) i životni vek ("vase life") cvetova (Olsen i sar., 2015). U novije vreme, istraživanja su usmerena i na proizvodnju biljaka povećane otpornosti na različite vrste biotičkog i abiotičkog stresa (Gaur i sar., 2018).

#### Modifikacija mirisa cvetova

Miris potiče od isparljivih jedinjenja koja su po strukturi terpenoidi, fenilpropanoidi i benzenoidi (Zvi i sar., 2008). Jedinjenja koja daju miris cvetovima i koja privlače oprašivače sintetišu se *de novo* u epidermalnim ćelijama kruničnih listića cvetova. Ekspresija gena koji kodiraju proteine koji učestvuju u biosintezi ovih jedinjenja regulisana je na transkripcionom nivou, u zavisnosti od razvojnog stadijuma krunice (Tanaka i sar., 2005). Metodom genetičkog inženjerstva biohemijski put sinteze isparljivih jedinjenja, ispitivan je bilo uvođenjem heterolognih strukturnih ili regulatornih gena, bilo sniženjem ekspresije postojećih gena (Dudareva i Pichersky, 2008). Prvi strukturni gen, za linalol-sintazu (LIS) izolovan je iz *Clarkia breweri* (Dudareva i sar., 1996). LIS katalizuje konverziju geranil-difosfata (GDP) u (3S)-linalol, monoterpenoidni alkohol koji cvetovima biljaka daje jak i sladak miris. Povećana ekspresija LIS pod kontrolom CaMV 35S kod *Petunia hybrida* dovela je do sinteze linalola, međutim, nije došlo do promene mirisa jer je linalol bio metabolisan od strane endogene glikozil-transferaze u neisparljivi linalil- $\beta$ -D-glikozid (Lücker i sar., 2001). Pod kontrolom istog promotora ekspresija LIS kod transgene *Dianthus caryophyllus* dovela je do sinteze linalola u listovima i cvetovima. U ekstraktima kruničnih listića transgenih cvetova karanfila detektovan je samo isparljivi *trans*-linalil oksid, što ukazuje da bi se linalol mogao skladištiti u oksidovanoj formi (Lavy i sar., 2002). Količina sintetisanog linalola pre zavisi od količine dostupnog supstrata GDP nego od ekspresije LIS gena (Lücker i sar., 2001). Enzimi koji učestvuju u biosintezi isparljivih mirisnih jedinjenja često koriste više supstrata. Zbog toga sinteza isparljivih jedinjenja u transgenim cvetovima zavisi od supstrata koji su dostupni u

ćelijama u kojima se transgen eksprimira (Pichersky i sar., 2006). Identifikacija gena koji učestvuju u sintezi i regulaciji produkcije mirisa može omogućiti promenu mirisa cvetova određene vrste biljaka (Chandler i Sanchez, 2012).

### **Modifikacija dužine trajanja cvetova**

Kvalitet ukrasnih biljaka obično se procenjuje na osnovu trajnosti njihovih cvetova. Jedan od faktora koji dovodi do starenja odnosno senescencije cvetova biljaka je etilen, gasoviti biljni hormon koji učestvuje u mnoštvu važnih procesa koji se odvijaju u samoj biljci, počev od klijanja, pa do senescencije (Netam, 2018). Etilen se sintetiše u velikoj količini u kruničnim listićima cvetova nekoliko dana po njihovom otvaranju, a njegova povećana sinteza dovodi do uvijanja kruničnih listića što vodi ka venjenju i senescenciji cvetova.

U biosintezi etilena ključnu ulogu ima 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina (ACC), koja se sintetiše posredstvom enzima ACC sintaze (ACS) i ACC oksidaze (ACO) (Kende, 1989). Snižavanjem ekspresije gena koji kodira jedan od ova dva enzima može se postići smanjena proizvodnja etilena. Rezano biljke modifikovane na ovaj način odlikuju se odloženim starenjem, ali su i dalje osetljive na egzogeni etilen (Chandler, 2007). Povećana ekspresija mutantnog gena za receptor etilena takođe odlaže starenje i produžava svežinu biljaka a cvetovi postaju neosetljivi na egzogeni etilen (Milbus i sar., 2009). Transformacija ACS i ACO genima u antisens ili sens orijentaciji dobijena je kod nekoliko ukrasnih biljaka, uključujući *Begonia* (Einset i Kopperud, 1995), *Torenia* (Aida i sar., 1998), *D. caryophyllus* (Iwazaki i sar., 2004) i *Petunia* (Huang i sar., 2007). Senescencija biljaka bila je odložena kao rezultat smanjene sinteze etilena.

### **Modifikacija morfoloških karakteristika**

Visina biljke, struktura ili arhitektura cvetova, kao i broj cvetnih drški su osobine koje se kod ukrasnih biljaka najčešće modifikuju metodama genetičkog inženjerstva. Uglavnom se manipuliše genima koji učestvuju u biosintezi biljnih regulatora rastenja ili transkripcionim faktorima koji regulišu razviće biljaka (Tanaka i sar., 2005). Ekspresija gena za izopentenil-transferazu, koja učestvuje u biosintezi citokinina, kod transgenih hrizantema dovela je do razvoja nižih biljaka, ali sa većim brojem cvetova u odnosu na netransformisane biljke. Transgeni cvetovi su bili manji i formirali su se nešto kasnije u poređenju sa kontrolnim, netransformisanim cvetovima (Khodakovskaya i sar., 2009). Smatra se da *rol* geni bakterije *Agrobacterium rhizogenes* takođe mogu modifikovati različite karakteristike kod biljaka. Kod transgene petunije, *Petunia* cv. 'Mitchell', ekspresija *rolC* gena pod kontrolom konstitutivnog promotora CaMV 35S dovela je do razvoja nižih biljaka sa promenjenom veličinom lista i cveta, povećanim grananjem kao posledica manje izražene apikalne dominacije i smanjenom fertižnošću (Winefield i sar., 1999). Ekspresija fitohrom *BI* gena iz *N. tabacum* pod kontrolom CaMV 35S promotora uticala je da transgene biljke hrizantema budu nižeg rasta u odnosu na kontrolne biljke. Pored toga, listovi transgenih hrizantema bili su tamnije zelene boje kao posledica povećane akumulacije hlorofila (Zheng i sar., 2001). Patuljaste hrizanteme dobijene su transformacijom sa *gai* genom (eng. *gibberelic acid insensitive*) iz *A. thaliana* pod kontrolom sopstvenog promotora. Transgene biljke imale su smanjeni odgovor na gibereline (Petty i sar., 2003). Primenom metoda genetičkog inženjerstva može se takođe prevazići preterana upotreba hemijskih sredstava koja se koriste sa ciljem postizanja željenih karakteristika kod ukrasnih biljaka, kao što su uniformna visina biljaka ili usporeno rasteње biljaka.

### **Otpornost biljaka na abiotički stres**

Suša, velika vlažnost, povišen salinitet, mrazevi i promene temperature, imaju negativan uticaj na rasteње i razviće biljaka (Zhao i sar., 2016). Metodama genetičkog inženjerstva otpornost na sušu može se postići uvođenjem gena čiji produkti učestvuju u različitim biohemijskim i



fiziološkim procesima i deo su odgovora biljaka na datu vrstu stresa (Lawlor, 2013). Geni koji kodiraju enzime angažovane u biosintezi jedinjenja kao što su prolin i glicin-betain, tj. osmoprotektanata, štite ćelije od osmotskog stresa i povećavaju otpornost biljaka na sušu. Nekoliko familija transkripcionih faktora (DREB1, Myb, WRKY, NAC i ERF) je takođe uključeno u odgovor biljaka na stres kao što je suša (Khan i sar., 2019). Povećanje ekspresije gena *CmWRKY1* kod *Chrysanthemum morifolium* kultivar 'Jinba' doprinelo je povećanju tolerancije transgenih biljaka na sušu. Pokazano je da *CmWRKY1* ima važnu ulogu u odgovoru na sušu posredstvom biosinteze abscisinske kiseline (ABA) (Fan i sar., 2016). Otpornost na mrazeve je dobijena kod *Rosa chinensis* uvođenjem *MtDREB1C* iz *Medicago trunculata* (Chen i sar., 2010). Povišen salinitet može dovesti do hloroze listova kod nekih kultivara hrizantema (Guan i sar., 2010). Kod kultivara 'Jinba' tolerancija na salinitet je povećana konstitutivnom ekspresijom *CcSOS1* gena koji kodira Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter ćelijske membrane (Song i sar., 2012; An i sar., 2014). Takođe, kod hrizanteme (*Dendranthema grandiflorum* cv. 'Fall Color') je integracija dva različita vektora (35S::*DREB1A* i *rd29>::DREB1A*) obezbedila otpornost na sušu i povećanu toleranciju na visok salinitet (Hong i sar., 2006).

### Otpornost biljaka na bolesti

Gljive, bakterije i virusi mogu naneti veliku štetu biljkama ne samo tokom proizvodnje, već i tokom skladištenja, a potom i distribucije do mesta njihove prodaje (Chandler i Sanchez, 2012). Biljke se najčešće tretiraju određenim hemijskim sredstvima u cilju zaštite od patogena, što pored potencijalne opasnosti po zdravlje ljudi, za proizvođače biljaka predstavlja veliki trošak. Metodama genetičkog inženjerstva proizvedene su biljke otporne na razne bolesti. Karanfili se najčešće zaražavaju gljivom *Fusarium oxysporum* koja ulazi u biljku kroz povrede na korenu i postepeno dovodi do njenog propadanja (Tanaka i sar., 2005). Genetičkom transformacijom karanfila pomoću *chiA* gena iz *Serratia marescens* dobija se sinteza hitinaze, koja razgrađuje hitin u ćelijskom zidu gljive, pri čemu se pojava simptoma bolesti odlaže (Brugliera i sar., 2000). Baštenske ruže su podložne infekcijama koje izazivaju plesni kao što su *Peronospora sparsa*, *Sphaerotheca pannosa* i *Diplocarpon rosae*. Transformacijom *R. x hybrida* cv. 'Carefree beauty' antimikrobnim genom *Ace-AMP1* povećana je otpornost ruže na *Sphaerotheca pannosa* (Li i sar., 2003). Biljke *Rosa hybrida* cv. 'Glad Tidings' koje su eksprimirale gen za sintezu hitinaze imale su znatno manji broj lezija prouzrokovanih gljivom *Diplocarpon rosae* (Marchant i sar., 1998b). Genetičkom transformacijom posredstvom *Agrobacterium tumefaciens* i integracijom gena za razgradnju hitina iz pirinča (*RCH10*) povećana je otpornost orijentalnog ljljana cv. 'Star Gazer' na gljivu *Botrytis cinerea* (De Cáceres González i sar., 2015). Bolesti prouzrokovane virusima takođe mogu naneti velike štete biljkama tako da one više nisu pogodne za prodaju. Kod gerbera se infekcija virusom bronzavosti paradajza (eng. *Tomato Spotted Wilt Virus* - TSWV) manifestuje u vidu deformacije cvetova i nekrotičnih pega po listovima. Integracijom *N-gena* posredstvom *Agrobacterium*-a povećana je otpornost gerbera na TSWV, a simptoma bolesti kod transgenih biljaka nije bilo (Korbin i sar., 2001). Transformacija genima koji učestvuju u sintezi proteina omotača virusa dovodi do rezistencije biljaka na dati virus. Povećana otpornost *Euphorbia pulcherrima* cv. 'Millenium' na *Poinsetia* mozaični virus postignuta je ekspresijom virusne sekvence za protein kapsida, odnosno omotača virusa (Clarke i sar., 2008). Otpornost transgenih linija orhideja *Phalenopsis spp.* i *Dendrobium spp.* na *Cymbidium* mozaični virus (CymMV-CS) izolovan iz *Cymbidium sinensis* dobijena je takođe integracijom virusne nukleotidne sekvence za protein kapsida (Liao i sar., 2004; Chang i sar., 2005). Pored toga, otpornost na bolesti prouzrokovane virusima može se postići transformacijom genima za specifične ribonukleaze (*pac1*) koje degraduju dvolančane RNK virusa i na taj način inhibiraju njihovu replikaciju (Toguri i sar., 2003). Ekspresija *pac1* gena u transgenim biljkama *Impatiens walleriana* obezbedila je potpunu i efikasnu zaštitu od TSWV virusa (Milošević i sar., 2013).

### **Otpornost biljaka na štetočine**

Insekti, pored toga što biljkama nanose fizička oštećenja, predstavljaju i potencijalne prenosiocce patogena. Oni mogu naneti veliku štetu ukrasnim biljkama pri čemu one više nemaju željeni atraktivni izgled koji bi privukao kupca. Za njihovu kontrolu, koriste se razna hemijska sredstva koja su skupa, a pritom i toksična, ponekad i za ljude. Kao alternativa, istraživanja su usmerena na uvođenje gena za otpornost prema različitim štetočinama. Najpoznatiji primer sticanja otpornosti na insekte je integracija *cry* gena (eng. *crystalline*) za toksične proteine izolovane iz zemljišne bakterije *Bacillus thuringiensis*. Prvi put je otpornost na insekte dobijena kod paradajza, uvođenjem *cry* gena. Transgene biljke paradajza bile su rezistentne na *Spodoptera litura* i *Heliothis virescens* (Fischhoff i sar., 1987). Integracijom modifikovanog gena za *cryIAb* iz *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 kod pet kultivara hrizantema dobijene su transgene biljke otporne takođe na noćnog moljca (*Spodoptera litura*) i kukuruznu sovicu (*Helicoverpa armigera*) (Shinoyama i Mochizuki, 2006). Kod biljaka postoje brojna toksična jedinjenja koja se sintetišu konstitutivno ili kao odgovor na napad štetočina (Jouanin i sar., 1998). Genetička transformacija genima koji kodiraju insekticidne proteine jedan je od mogućih načina za sticanje otpornosti biljaka na štetočine (Sharma i sar., 2000). Tako je, na primer, konstitutivna ekspresija inhibitora tripsina (*CpTi*), izolovanog iz *Vigna unguiculata*, u transgenim biljkama jagode omogućila rezistenciju na žiška vinove loze (*Otiorynchus salcatus*). Kod larvi i lutaka ove vrste žiška, koje su se hranile *CpTi* transgenim biljkama jagode, konstatovano je smanjeno preživljavanje (Graham i sar., 2002).

#### **1.3.4. Promena boje cveta**

Cvetovi biljaka se razlikuju po boji, obliku i strukturi. Oni privlače brojne oprašivače biljaka, a takođe mogu biti i hrana za insekte, životinje i ljude (Reverté i sar., 2016; Amasino i sar., 2017).

Postoje tri vrste pigmenata koji određuju boju cveta kod biljaka. To su antocijanini, karotenoidi i betalaini (Grotewold, 2006). U prirodi su najrasprostranjeniji antocijanini i oni cvetovima daju širok spektar boja, počev od plave, pa do žute i crvene boje. Karotenoidi cvetovima daju žutu i narandžastu boju, a u kombinaciji sa pojedinim antocijaninima koji daju različite nijanse crvene boje, mogu se dobiti bronzana i braon boja cveta koje se sreću kod hrizantema (Tanaka i sar., 2005). Betalaini su otkriveni samo kod vrsta iz reda Caryophyllales (Brockington i sar., 2015), i odgovorni su za različite nijanse ljubičaste, svetlo smeđe, žute, narandžaste i crvene boje (Forkman, 1991).

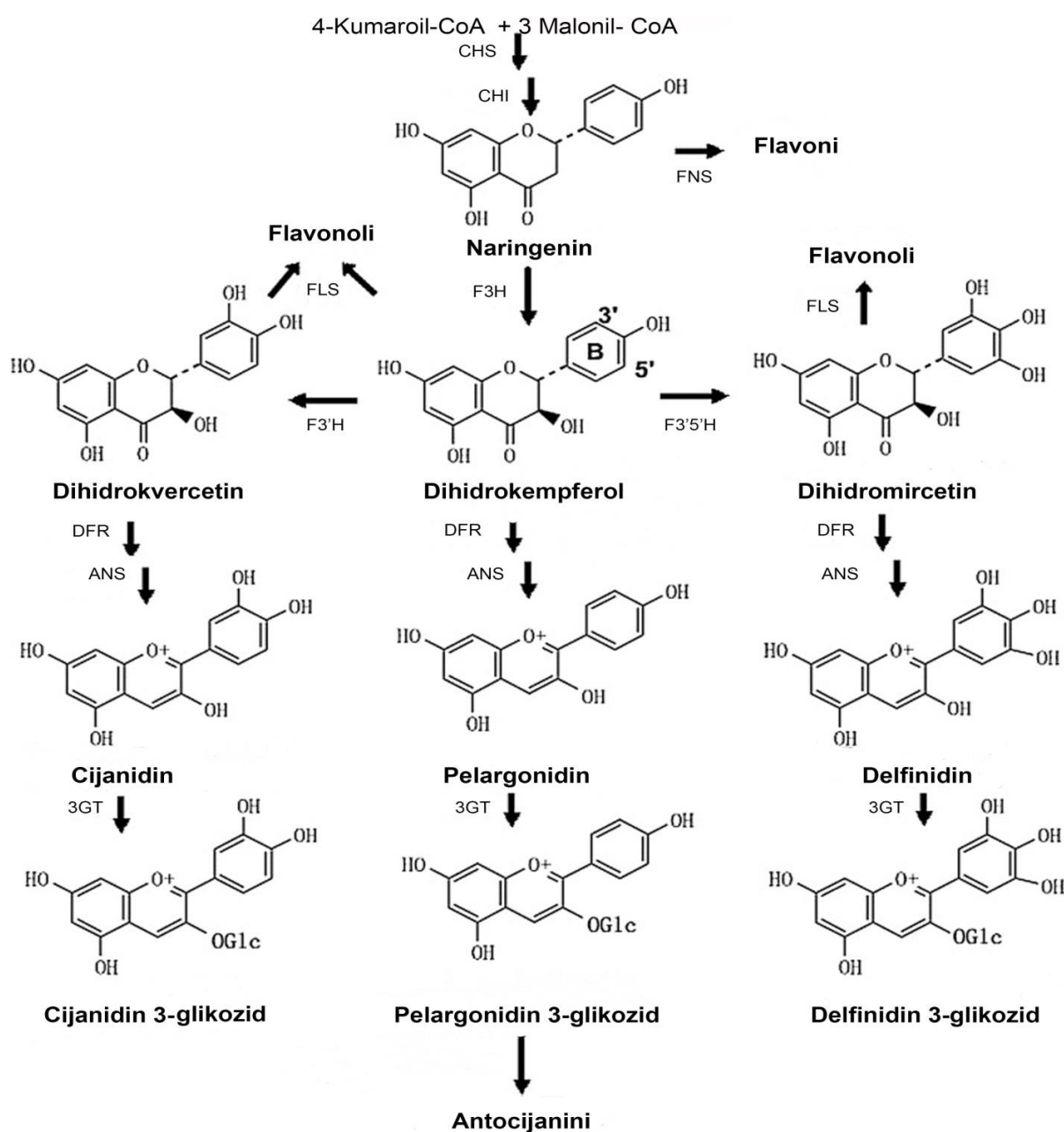
Nove boje cvetova mogu se dobiti genetičkim manipulacijama na tri načina: 1) uvođenjem gena koji kodiraju enzime angažovane u biosintetskim putevima pigmenata koji prirodno ne postoje kod date biljne vrste; 2) preusmeravanjem postojećeg biosintetskog puta ka produkciji željenog jedinjenja, povećavanjem ekspresije odgovarajućih gena, ili 3) snižavanjem ekspresije gena angažovanih u postojećim biosintetskim putevima (Chandler i Brugliera, 2011).

##### **1.3.4.1. Modifikacija biosinteze flavonoida**

Antocijanini predstavljaju klasu sekundarnih metabolita flavonoida i odgovorni su za različite boje cvetova i plodova kod biljaka. Geni koji kodiraju enzime koji učestvuju u biosintezi antocijanina su klonirani kod velikog broja biljaka (Tanaka i sar., 2005). Podaci o ovim genima se nalaze u NCBI bazi podataka (Nacionalni centar za biotehnoške informacije, eng. *National Center for Biotechnology Information*) odakle se lako mogu preuzeti i koristiti (Tanaka i sar., 2008).

Najznačajniji antocijanini koji daju boju cvetovima i plodovima biljaka su glikozilovane forme pelargonidina, cijanidina i delfinidina (Zhao i Tao, 2015) (**Slika 3**). Prvi enzim koji učestvuje u njihovoj biosintezi je halkon-sintaza (CHS). Ona katalizuje sintezu tetrahidroksihalkona iz jednog molekula kumaroil-CoA i tri molekula malonil-CoA. Potom dolazi do izomerizacije dejstvom

halkon-izomeraze (CHI) pri čemu nastaje bezbojni (2S)-naringenin. Slede reakcije hidroksilacije, u kojima se (2S)-naringenin hidroksiluje u dihidroflavonole. Pomoću flavanon-3-hidroksilaze (F3H) formira se dihidrokempferol, a pomoću flavonoid-3'-hidroksilaze (F3'H) i flavonoid-3',5'-hidroksilaze (F3'5'H), koje takođe katalizuju reakcije hidroksilacije, formira se dihidrokvercetin, odnosno dihidromircetin. Ova tri enzima (F3H, F3'H i F3'5'H) su ključni za biosintezu pelargonidina, cijanidina i delfinidina. Oni određuju strukturu antocijanina, a samim tim i boju biljnog tkiva. Dihidroflavonoli se redukuju dejstvom enzima dihidroflavonol-4-reduktaze (DFR) pri čemu nastaju različiti tipovi bezbojnih leukoantocijanidina. Antocijanidin-sintaza (ANS) je enzim koji katalizuje sintezu obojenih antocijanidina koji se dejstvom flavonoid-3-O-glukoziltransferaze (3GT) mogu glikozilovati dodavanjem šećera ili acilovati dodavanjem aromatičnih acil grupa dejstvom acetiltransferaze (Tanaka i sar., 2008; Zhao i Tao, 2015).



**Slika 3.** Biosinteza antocijanina (preuzeto iz Yuan i sar., 2014 i modifikovano). Skraćenice: CHS - halkon-sintaza; CHI - halkon-izomeraze; F3H - flavanon-3-hidroksilaze; F3'H - flavonoid-3'-hidroksilaze; F3'5'H - flavonoid-3',5'-hidroksilaze; DFR - dihidroflavonol-4-reduktaze; ANS - antocijanidin-sintaza; 3GT - flavonoid-3-O-glukoziltransferaze.

Promena boje cvetova modifikacijom biosinteze antocijanina metodama genetičkog inženjerstva se može postići na različite načine: uvođenjem novih gena u genom biljke ili promenom ekspresije postojećih gena (**Tabela 2**). Ekspresija svih gena koji kodiraju enzime koji učestvuju u biosintetskom putu se može modifikovati i za posledicu imati drugačiju boju cveta. Snižavanje ekspresije strukturnih gena koji kodiraju enzime biosintetskog puta flavonoida može se postići putem antisens RNK i kosupresijom gena. Korišćenjem antisens gena za CHS uspešno je transformisana *Gentiana triflora* čiji su cvetovi promenili plavu boju u boje koje su varirale od bele do svetlo plave (Nishihara i sar., 2003). RNK interferencija predstavlja još jedan način na koji se može sniziti ekspresija ciljne sekvence (Wang i Waterhouse, 2001). Kod *Torenia hybrida* je putem RNK interferencije utišan gen za CHS čime je boja cveta promenjena iz plave u belu boju (Fukusaki i sar., 2004).

Snižena ekspresija *chi* gena kod karanfila, ciklame i duvana može dovesti do povećane akumulacije halkona u krničnim listićima cvetova pri čemu oni dobijaju žutu boju (Nishihara i sar., 2005). U transgenim cvetovima petunije ekspresija *chs1* iz frezije dovela je do promene boje iz bele u ružičastu (Sun i sar., 2015). Kod duvana, ekspresija *chs1* poreklom iz jabuke povećala je količinu akumuliranih antocijanina, pa su transgeni cvetovi bili tamnije crvene boje u odnosu na netransformisane cvetove (Tai i sar., 2014).

**Tabela 2.** Biljne vrste sa promenjenom bojom cveta, dobijene putem metaboličke modifikacije biosinteze flavonoida.

Vrsta	Boja cveta	Referenca
<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	ružičasta, ljubičasta › njihove svetlije i tamnije nijanse	He i sar., 2013
<i>Cyclamen persicum</i>	ljubičasta › crvena/ružičasta	Boase i sar., 2010
<i>Dianthus caryophyllus</i>	bela › bež, tamno ljubičasta	Lu i sar., 2003
<i>Eustoma grandiflorum</i>	narandžasta › bež	Zuker i sar., 2002
	ljubičasta › ružičasta	Nielsen i sar., 2002
<i>Gentian triflora</i>	plava › svetlo plava, bela	Nishihara i sar., 2003
	plava › bela	Nakatsuka i sar., 2010
		Nakatsuka i sar., 2011
<i>Phalaenopsis spp.</i>	ružičasta › svetlije ružičasta	Chen i sar., 2011
<i>Petunia hybrida</i>	bela › ružičasta	Davies i sar., 2003
	crvena › tamno crvena	Mori i sar., 2004
	ljubičasta › bela, crvena	Tsuda i sar., 2004
	crvena › narandžasta	
	tamno ljubičasta › svetlo ljubičasta	
	kombinacije boja	Chu i sar., 2016
<i>Rosa x hybrida</i>	crvena › ljubičasta	Katsumoto i sar., 2007
	roze › crvena, ljubičasta	Nakamura i sar., 2015
<i>Tricyrtis spp.</i>	crvena › bela	Kamiishi i sar., 2011
<i>Torenia fourieri</i>	tamno ljubičasta › ljubičasta	Aida i sar., 2000
<i>Torenia hybrida</i>	plava › plava/bela, bela	Suzuki i sar., 2000
	plava/tamno ljubičasta › ružičasta	Nakamura i sar., 2010

Neke ukrasne biljke kao što su ruže, hrizanteme i karanfili, ne sintetišu delfinidin jer ne poseduju *f3'5'h* gen. Samim tim one ne mogu imati cvetove ljubičasto-plave boje. Kod *Petunia hybrida* i *Cymbidium hybrida* DFR ne može da koristi dihidrokempferol kao supstrat, pa cvetovi ovih biljaka ne mogu biti narandžaste i crvene boje (Tanaka i sar., 2008). Prva cvetnica kod koje je promenjena boja cveta bila je petunija (*Petunia hybrida*), sredinom 80-ih godina XX veka (Horsch i

sar., 1985). Modifikacijom biosinteze flavonoida uspešno je promenjena boja cveta u narandžastu boju kao rezultat akumulacije antocijanina pelargonidina (Meyer i sar., 1987). Gen koji kodira flavonoid-3',5'-hidroksilazu (F3'5'H) i koji omogućava sintezu plavog pigmenta delfinidina, izolovan je 1993. godine (Holton i sar., 1993). Integracija *f3'5'h* iz vrsta rodova *Petunia*, *Eustoma* i *Campanula* u genom *Nicotiana*, pokazala je da postoji razlika u efikasnosti enzimske aktivnosti F3'5'H koju kodiraju različiti geni poreklom iz vrsta pomenutih rodova. Kod biljaka duvana kod kojih je integrisan *f3'5'h* iz *Campanula medium*, akumuliranog delfinidina bilo je neuporedivo više nego kod biljaka duvana u koje je integrisan *f3'5'h* iz *Petunia* ili *Eustoma* (Okinaka i sar., 2003). Hrizanteme takođe nemaju F3'5'H enzim za sintezu delfinidina, pa samim tim ni tamno ljubičastu/plavu boju cvetova. Međutim, uvođenjem *f3'5'h* gena iz *Viola sp.* pod kontrolom promotora za CHS iz ruže, dobijeni su transgeni cvetovi hrizantema tamnije plave boje u odnosu na netransformisane cvetove. Od ukupne količine antocijanina 40% činio je delfinidin (Brugliera i sar., 2013). Nakon toga su utišavanjem postojećeg *f3'h* gena dobijene još tamnije nijanse plave boje cveta hrizantema na račun povećane akumulacije delfinidina, koje se procesom hibridizacije nisu mogle dobiti (Brugliera i sar., 2013). Ruže i karanfili isto tako nemaju gen za sintezu plavog pigmenta delfinidina, pa klasičnim metodama ukršanja nije bilo moguće dobiti cvetove plave i ljubičaste boje. Bilo je potrebno izolovati gen za sintezu plavog pigmenta iz vrsta koje imaju plave cvetove i uvesti ga metodom genetičke transformacije u genom ove dve vrste. Karanfili prirodno akumuliraju derivate cijanidina i pelargonidina, ali ne i derivate delfinidina koji daju plavu boju. Na samom početku istraživanja, povećana ekspresija *f3'5'h* gena poreklom iz petunije, koji je bio pod kontrolom konstitutivnog promotora, kod karanfila (koji su prirodno sintetisali pelargonidin) rezultirala je akumulacijom 70% delfinidina u cvetovima transgenih karanfila (Holton i Tanaka, 1994). Da bi se povećao sadržaj delfinidina u cvetovima karanfila, snižena je ekspresija postojećeg gena za dihidroflavonol-4-reduktazu (*dfr*), a u njegov genom su inkorporirana dva transgena: *f3'5'h* iz *Petunia*, pod kontrolom promotorskog regiona *chs* gena iz *Antirrhinum*, i gen za DFR iz *Petunia* pod kontrolom konstitutivnog promotora (Holton, 1996). Plave ruže su nastale tako što je snižena ekspresija postojećeg *dfr* gena, a u njen genom je integrisan *f3'5'h* iz ljubičice (*Viola x wittrockiana*) zajedno sa *dfr* genom poreklom iz *Iris x hollandica* čija je ekspresija povećana (Katsumoto i sar., 2007). Ove genetički modifikovane ruže i karanfili danas su komercijalno dostupne ukrasne biljne vrste.

Antocijanini pre nego što se deponuju u vakuolama biljnih ćelija podležu procesima glikozilacije, acilacije i metilacije, vezivanjem šećera, acil grupa alifatičnih i aromatičnih kiselina, i metil grupa, što može uticati na promenu boje cveta (Yoshida i sar., 2006; Zhao i Tao, 2015). Intenzitet boje cveta zavisi i od drugih faktora, kao što su: pH vakuole, kopigmentacija antocijanina sa polifenolima, međusobno vezivanje antocijanina, formiranje kompleksa između antocijanina i metalnih jona, količina antocijanina, pa čak i sam oblik i veličina biljne ćelije (Tanaka i sar., 1998). Vrednost pH vakuole određuje boju cveta. Vakuolu odlikuje slabo kisela sredina, a povećanjem pH ka neutralnoj vrednosti (pH=7) antocijanini postaju manje stabilni što se prevazilazi vezivanjem glikozil i acil grupa. pH vrednost vakuole u ćelijama kruničnih listića *Ipomoea nil* regulisana je aktivnošću  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera (Fukada-Tanaka i sar., 2000). Pojačanom ekspresijom strukturnog gena koji kodira dati antiporter, u momentu pre nego što se cvet otvori, pH se podiže sa 6,5 na 7,5 što dovodi do promene boje cveta iz ljubičaste u plavu boju. Što je pH vakuole viši i boja cveta se više menja ka plavoj boji.

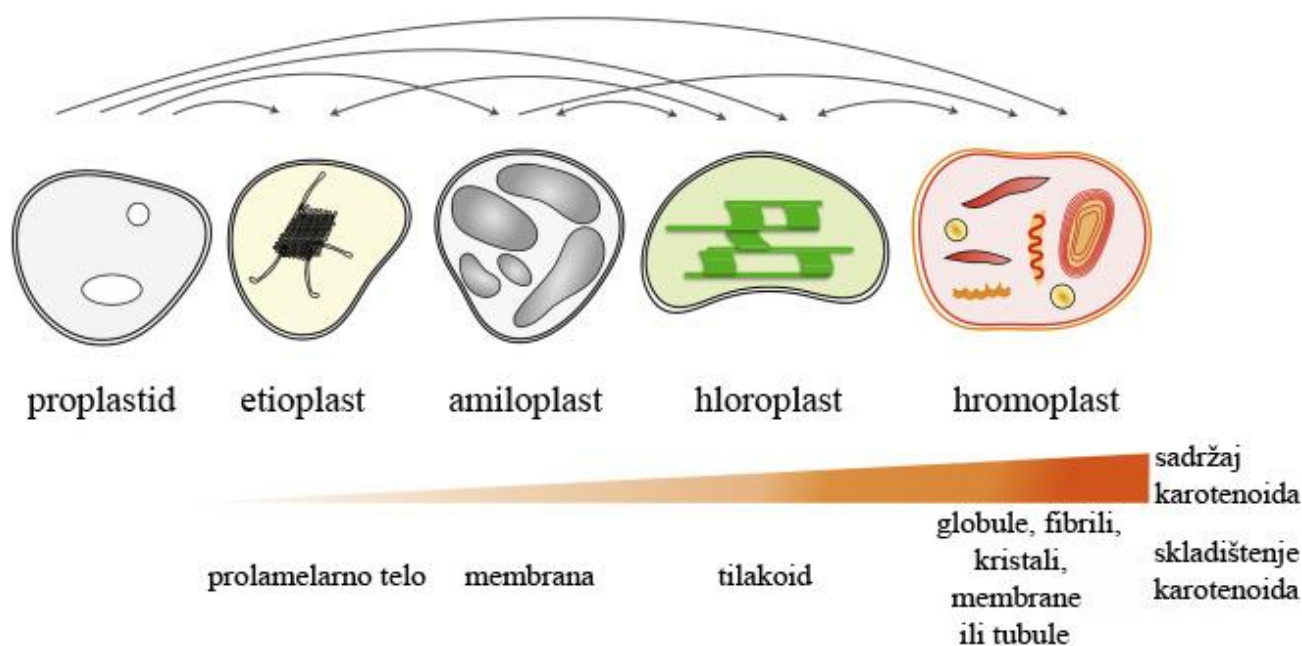
#### 1.3.4.2. Modifikacije biosinteze karotenoida

Do danas je identifikovano više od 750 prirodnih karotenoida, prisutnih kod biljaka, algi, gljiva i nekih bakterija (Britton i sar., 2004). Biljni karotenoidi su po strukturi lipofilni  $\text{C}_{40}$  izoprenoidi sa polienskim lancima koji sadrže konjugovane dvostruke veze i prstenove na svojim krajevima. Zahvaljujući tim dvostrukim vezama karotenoidi apsorbuju vidljivu svetlost, pa plodovima i cvetovima biljaka daju žutu, narandžastu i crvenu boju (Yuan i sar., 2015).

U biljkama, karotenoidi su prisutni i u fotosintetičkim i u nefotosintetičkim tkivima. U listovima biljaka sastav i sadržaj karotenoida su relativno stalni, dok u drugim tkivima oni mogu varirati čak i unutar iste vrste (Tanaka i sar., 2008). U biljkama postoje višestruki regulatorni mehanizmi koji kontrolišu metabolizam i akumulaciju karotenoida (Yuan i sar., 2015). U fotosintetičkim tkivima odnosno listovima biljaka, karotenoidi se nalaze u hloroplastima gde obezbeđuju brojne funkcije neophodne za proces fotosinteze kao što su izgradnja fotosistema, apsorpcija svetlosti i zaštita fotosintetičkog aparata od fotooksidacije (Domonkos i sar., 2013). U nefotosintetičkim tkivima, sočnim plodovima, a naročito u cvetovima biljaka, karotenoidi se akumuliraju u hromoplastima i njihova uloga je prvenstveno da obezbede obojenost koja privlači oprašivače i životinje koje se hrane plodovima, čime potpomažu širenje semena, a sve u cilju reprodukcije biljaka (Hirschberg, 2001; Zhu i sar., 2010).

Karotenoidi služe i kao prekursori za sintezu dve grupe fitohormona, ABA i strigolaktona, koje imaju ključnu ulogu u razviću biljke i njenom odgovoru na stres (Gomez-Roldan i sar., 2008; Walter i Strack, 2011). Karotenoidi u ljudskoj ishrani obezbeđuju prekursore za biosintezu vitamina A. Imaju antioksidativnu aktivnost pa se zbog toga koriste u cilju zaštite od raznih hroničnih oboljenja kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti i bolesti oka (Fraser i Bramley, 2004; Fiedor i Burda, 2014).

U biljnim ćelijama karotenoidi se sintetišu *de novo* i skladište u plastidima. Tip i veličina plastida značajno utiču na akumulaciju i stabilnost karotenoida (Li i Yuan, 2013). Proplastidi su mali, nediferencirani plastidi koji se nalaze u meristemskim tkivima i od kojih nastaju svi plastidi (Li i Yuan, 2013). Tokom razvića biljnih organa formiraju se odgovarajući tipovi plastida - etioplasti, amiloplasti, hloroplasti i hromoplasti - i svi oni imaju određeni kapacitet za sintezu i skladištenje karotenoida (**Slika 4**) (Shumskaya i Wurtzel, 2013). Etioplasti su plastidi koji se nalaze kod biljaka koje rastu u mraku. Karakterišu se prisustvom prolamelarnih tela koja se pod uticajem svetlosti mogu diferencirati u tilakoide hloroplasta. U njima se nalazi izuzetno mala količina karotenoida, najčešće luteina i violaksantina, koji predstavljaju sastavni deo fotosintetičkog kompleksa (Plösch i sar., 2011). Amiloplasti predstavljaju vrstu leukoplasta u kojoj se akumulira skrob. Amiloplasti sadrže relativno malu količinu karotenoida, uglavnom su to lutein, zeaksantin i violaksantin. Karakteristični su za semena pšenice, pirinča, ječma, kukuruza i krtole krompira (Bai i sar., 2016; Mortimer i sar., 2016). Hloroplasti su plastidi zelenih, fotosintetičkih tkiva u kojima se karotenoidi nalaze u membranama tilakoida gde učestvuju u procesima fotosinteze i zaštiti od fotooksidacije. Najzastupljeniji su lutein,  $\beta$ -karoten, violaksantin i neoksantin, ali su oni maskirani zelenim hlorofilima pa njihova boja ne dolazi do izražaja (Ruiz-Sola i Rodríguez-Concepción, 2012). Hromoplasti su fotosintetički neaktivni plastidi u kojima se sintetišu i akumuliraju karotenoidi. Oni se nalaze u cvetovima i plodovima biljaka (Waters i Pyke, 2005). U hromoplastima se karotenoidi akumuliraju u lipoproteinskim partikulama, takozvanim plastoglobulama, ali i u strukturama koje su označene kao fibrili, membrane, kristali i tubule. Smatra se da se tokom sazrevanja plodova, kao i razvića cvetova hromoplasti mogu diferencirati od bilo kog tipa plastida, nefotosintetičkih ili fotosintetičkih, u zavisnosti od tkiva u kojima se nalaze. U pojedinim delovima cveta hromoplasti nastaju od amiloplasta, kao na primer kod šafrana gde se amiloplasti nalaze u bazalnom delu tučka i parenhimu ovarijuma. Prelazne forme plastida od amiloplasta ka hromoplastima bile su uočene u žutim delovima stubića i žiga tučka dok su se u crvenom delu žiga tučka cvetnih pupoljaka nalazili hromoplasti retikulo-tubularnog tipa (Grilli Caiola i Canini, 2007). U cvetnim nektarijama duvana hromoplasti nastaju direktno od amiloplasta, pri čemu je konverzija plastida praćena razgradnjom skroba i proizvodnjom šećernog nektara (Horner i sar., 2007).



**Slika 4.** Tipovi plastida i strukture u kojima se akumuliraju karotenoidi (preuzeto iz Sun i sar., 2018 i modifikovano).

Prilikom diferencijacije hromoplasta od hloroplasta dolazi do potpune degradacije hlorofila, dezintegracije tilakoida i promena u strukturi membranskog sistema plastida, pri čemu se formiraju strukture u kojima će se akumulirati karotenoidi (Bian i sar., 2011). Najpoznatiji primer prevođenja hloroplasta u hromoplaste jeste sazrevanje plodova paradajza (Egea i sar., 2011). Kod plodova nekih biljaka, kao što su paradajz i paprika, proces formiranja hromoplasta je ireverzibilan dok je kod bundeve taj proces reverzibilan i hromoplasti se mogu ponovo diferencirati u hloroplaste (Waters i Pyke, 2005).

Diferencijacija hromoplasta je kompleksan proces koji još uvek nije dovoljno razjašnjen (Li i sar., 2016). Do sada je identifikovano nekoliko gena i proteina koji su povezani sa nastankom hromoplasta, međutim i dalje nisu poznati geni koji kontrolišu biogenezu hromoplasta (Sun i sar., 2018). Gen koji funkcioniše kao okidač za početak diferencijacije hromoplasta je *Or* gen (eng. *Orange*), otkriven kod karfiola (Lu i sar., 2006) i narandžaste dinje (Chayut i sar., 2017). Biohemijske i genetičke studije sprovedene prilikom ispitivanja *Or* gena kod dinje pokazale su da on ima ulogu u stabilizaciji i sprečavanju transporta  $\beta$ -karotena (Chayut i sar., 2017). Zhou i saradnici (2015) su pokazali da OR protein direktno interaguje sa fitoen-sintazom (PSY), enzimom koji inicira biosintezu karotenoida, i pozitivno reguliše njenu aktivnost.

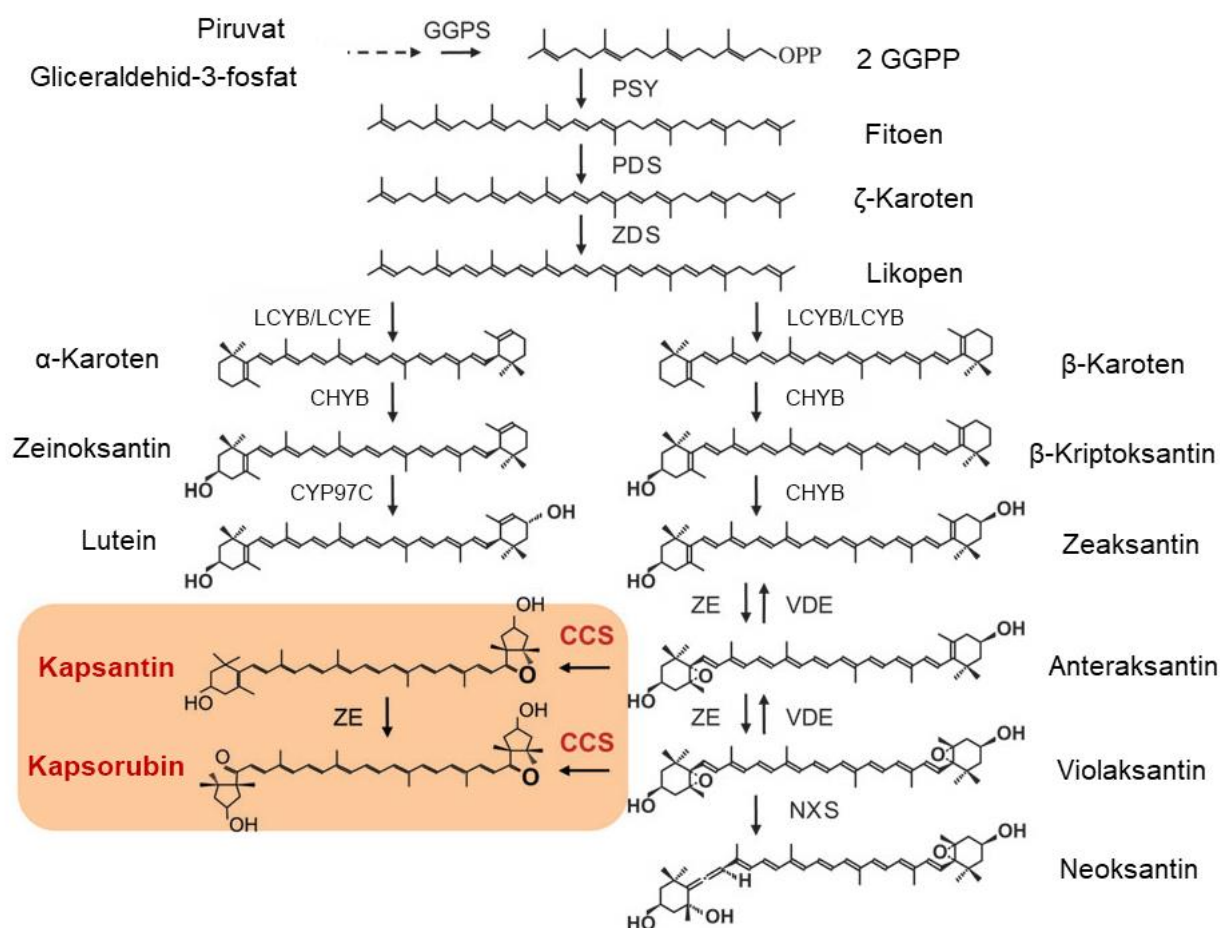
### **Biosinteza karotenoida**

Karotenoidi koji se nalaze u cvetovima biljaka imaju drugačiju ulogu od karotenoida koji se nalaze u listovima. Zbog toga i put biosinteze karotenoida u ovim organima može biti različito kontrolisan. Širok spektar karotenoida u cvetovima može ukazati na postojanje različitih mehanizama regulacije akumulacije karotenoida među vrstama. U poslednje dve decenije svi geni glavnog biosintetskog puta karotenoida su identifikovani, klonirani i funkcionalno okarakterisani (Cunningham i Gantt, 1998; Fraser i Bramley, 2004; Tanaka i sar., 2008; Jeknić i sar., 2012; Ohmiya, 2013).

Zbog svojih hemijskih svojstava karotenoidi su neophodne komponente svih fotosintetičkih organizama. Kod viših biljaka, karotenoidi se sintetišu u plastidima *de novo* pomoću enzima koje kodiraju geni jedarnog genoma (Zhu i sar., 2010). Biosinteza karotenoida (**Slika 5**) započinje kondenzacijom dva molekula geranilgeranil-difosfata (GGPP) pomoću enzima fitoen-sintaze (PSY) pri čemu nastaje bezbojni 15-*cis*-fitoen ( $C_{40}$ ). Slede reakcije desaturacije u kojima se uvode *cis*



dvostruke veze pomoću enzima fitoen-desaturaze (PDS) i ζ-karoten-desaturaze (ZDS), kao i reakcije izomerizacije kako bi se *cis* konfiguracija vratila u *trans* konfiguraciju pomoću enzima ζ-karoten-izomeraze (Z-ISO) i karotenoid-izomeraze (CRTISO). Dolazi do formiranja crvenog *all-trans* likopena, prvog obojenog karotenoida (Isaacson i sar., 2004). U biosintetskom putu karotenoida likopen predstavlja tačku grananja i supstrat za dva kompetitivna enzima, likopen-β-ciklazu (LCYB) i likopen-ε-ciklazu (LCYE). Oba enzima katalizuju ciklizaciju linearnog molekula likopena na jednom ili oba njegova kraja pri čemu se formiraju cikloheksanski prstenovi različiti po strukturi. Dodavanjem jednog ε-prstena molekulu likopena na jednom njegovom kraju pomoću LCYE nastaje δ-karoten. U narednom koraku ciklizacije, pošto LCYE ne može da koristi monociklične karotenoide kao supstrat, dodavanje drugog, β-prstena vrši se pomoću LCYB i tada nastaje narandžasti pigment α-karoten (Cunningham i Gantt, 2001). Ukoliko je likopen supstrat za LCYB, prvo dolazi do dodavanja jednog β-prstena i nastaje γ-karoten, a potom dejstvom istog enzima dolazi do dodavanja i drugog β-prstena pri čemu nastaje narandžasti pigment β-karoten (Zhu i sar., 2010), odnosno provitamin A koji je prisutan kod šargarepe, slatkog krompira i dinje (Yuan i sar., 2015). Kod paradajza su pronađena dva *lcyb* gena: *lcyb1* (*lcy-b*) se nalazi u vegetativnim tkivima, a *lcyb2* (*cyc-b*) u plodovima i cvetovima biljaka (Ronen i sar., 2000). Svi karotenoidi koji se sastoje samo od ugljovodoničnog niza, uključujući i α- i β-karoten nazivaju se karotenima.



**Slika 5.** Biosinteza karotenoida (preuzeto iz Ha i sar., 2007 i modifikovano). Skraćenice: GGPS – geranilgeranil-pirofosfat-sintaza; PSY – fitoen-sintaza; PDS – fitoen-desaturaza, ZDS - ζ-karoten-desaturaza; LCYB - likopen-β-ciklaza; LCYE - likopen-ε-ciklaza; CHYB - β-karoten-hidroksilaza; CYP97C - citohrom P450 monooksigenaza 97C; VDE – violaksantin-de-epoksidaza; ZE – zeaksantin-epoksidaza; CCS - kapsantin-kapsorubin-sintaza; NXS - neoksantin-sintaza.



U narednim koracima biosinteze karotenoida dolazi do dodavanja kiseonika cikličnim karotenima u vidu hidroksilnih grupa, dejstvom hidroksilaza, i epoksidnih prstenova, dejstvom epoksidaza, pri čemu nastaju ksantofili. Postoje dva različita tipa hidroksilaza:  $\beta$ -karoten-hidroksilaza (CHYB), koja hidroksiluje  $\beta$ -prsten cikličnog karotena, i citohrom P450 monooksigenaza 97C (CYP97C) koja hidroksiluje  $\beta$ - odnosno  $\epsilon$ -prstenove karotena. Hidroksilacijom  $\alpha$ -karotena dobija se žuti pigment lutein prisutan kod cvetova nevena i narcisa, kao i u tamno zelenim listovima (Nisar i sar., 2015). Lutein predstavlja finalni produkt  $\beta, \epsilon$ -grananja u biosintetskom putu karotenoida. Sa druge strane, narandžasti pigment  $\beta$ -karoten podleže hidroksilaciji pomoću CHYB pri čemu nastaje žuti zeaksantin koji dejstvom enzima zeaksantin-epoksidaze (ZE) prelazi u anteraksantin i violaksantin. Violaksantin se može konvertovati nazad u zeaksantin dejstvom violaksantin-de-epoksidaze (VDE). Ove reakcije epoksidacije i de-epoksidacije, kao i zeaksantin, anteraksantin i violaksantin, koji u njima učestvuju, sastavni su deo ciklusa ksantofila (Yuan i sar., 2015). Kod ploda paprike i cveta tigrastog ljiljana, anteraksantin i violaksantin, aktivnošću enzima kapsantin-kapsorubin-sintaze (CCS), mogu biti konvertovani u kapsantin i kapsorubin, glavne karotenoide koji daju karakterističnu narandžastu i crvenu boju (Guzman i sar., 2010; Jeknić i sar., 2012). CCS pripada familiji enzima likopen-ciklaze i ima visok procenat homologije sa sekvencom *lcyb* gena (Jeknić i sar., 2012). Kod paradajza je otkriveno da *lcyb* ima *ccs* aktivnost (Ronen i sar., 2000). Poslednji korak u biosintezi karotenoida jeste konverzija violaksantina u neoksantin pomoću neoksantin-sintaze (NXS).

U cvetovima biljaka zastupljeni su različiti karotenoidni profili. Kod mnogih vrsta biljaka različite nijanse žute i narandžaste boje kruničnih listića cvetova nastaju kao posledica akumulacije karotenoida iz grupe ksantofila. Sastav pigmenata i njihova količina određuju boju cvetova i zavise od biljne vrste, ali i od kultivara. Žutu boju cvetovima daju najčešće  $\beta, \epsilon$ -ksantofili od kojih su najprisutniji lutein i njegovi derivati. Oni se nalaze u cvetovima *Gentiana lutea* (Zhu i sar., 2003), *Dendranthema grandiflorum* (Kishimoto i sar., 2004), *Eustoma* (Nakayama i sar., 2006), *Ipomoea obscura* (Yamamizo i sar., 2010) i *Tagetes* (Park i sar., 2017). Žutu boju daju i  $\beta, \beta$ -ksantofili, pa se tako u cvetovima *Oncidium* (Hieber i sar., 2006) i *Ipomoea sp.* (Yamamizo i sar., 2010) u najvećoj količini akumulira violaksantin. Osim žute, u prirodi se mogu naći i cvetovi narandžaste boje koji kod *Osmanthus fragrance* Lour. nastaju akumulacijom  $\beta$ - i  $\alpha$ -karotena (Baldermann i sar., 2010). Kod *Calednula officinalis* cv. 'Alice yellow' cvetovi su žuti zbog akumulacije luteina i anteraksantina, dok su kod *C. officinalis* cv. 'Alice orange' cvetovi narandžasti usled akumulacije  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -karotena (Kishimoto i sar., 2005).

Kod nekih biljaka se akumuliraju jedinstveni karotenoidi, koji se retko nalaze u cvetovima drugih biljaka. Roze cvetovi *Hybiscus syriacus* nastaju akumulacijom lutein-5,6-epoksida, auroksantina i hrizantemaksantina (Hanny i sar., 1972). Kod *Adonis aestivalis* i *A. annua*, kao posledica akumulacije velike količine astaksantina, cvetovi su izrazito crvene boje (Cunnungham i Gantt, 2005). U pojedinim cvetovima biljaka se akumuliraju apokarotenoidi narandžaste ili crvene boje. U kruničnim listićima kalifornijskog maka (*Eschscholzia californica* Cham.) (Wakelin i sar., 2003) i šafrana (*Crocus sativus*) (Frusciante i sar., 2014) dominantno se akumulira krocetin, dok se u žigu tučka šafrana akumuliraju glikozidi krocetina i pirokrocina koji im daju crvenu boju (Ohmiya i sar., 2019). Istu boju daje i biksin iz *Bixa orellana* (Cazzonelli, 2011).

Karotenoidi se osim u cvetovima nalaze i u plodovima biljaka, kao što su plodovi paradajza (*Solanum lycopersicum*) koji imaju crvenu boju zahvaljujući likopenu koji čini 85% ukupnih karotenoida (Tadmor i sar., 2005). Pored toga, karotenoidi su prisutni i u korenovima šargarepe (*Daucus carota*) i slatkog krompira (*Ipomoea batatas*), čija je boja rezultat akumulacije velike količine  $\beta$ -karotena (Burri, 2011). Kapsantin i kapsorubin predstavljaju najzastupljenije ksantofile u plodovima crvene paprike (*Capsicum annuum*) (Kim i sar., 2016). Međutim, otkriveno je da njihovi prekursori, anteraksantin i violaksantin cvetovima *Lilium* spp. cv. 'Conneticut King' daju žutu boju, a da se u cvetovima *Lilium* spp. cv. 'Saija' pored anteraksantina akumulira i kapsantin koji cvetovima daje crvenu boju (Yamagishi i sar., 2010). Oba pigmenta, kapsantin i kapsorubin,

detektovana su u crvenim cvetovima *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night' (Marki-Fisher i Eugster, 1985).

### **Regulacija biosinteze i degradacije karotenoida**

Akumulacija karotenoida u cvetovima biljaka proporcionalna je nivou transkripcije gena biosintetskog puta karotenoida (Ohmiya, 2013; Shilpa i sar., 2017). Snižavanje ekspresije nizvodnih gena na bilo koji način, dovodi do akumulacije uzvodnih produkata biosinteze karotenoida u hromoplastima (Galpaz i sar., 2013). Ključni enzim u biosintezi karotenoida je fitoen-sintaza. Ona određuje kojom brzinom će se sintetisati karotenoidi i u kojoj količini (Sun i sar., 2018). Kod *Tagetes erecta* akumulacija pigmenta luteina određena je nivoom ekspresije *psy* i *dxs* (1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat) gena. U žutim cvetovima *T. erecta* nivo ekspresije ova dva gena je niži nego u narandžastim cvetovima (Moehs i sar., 2001). Nivo ekspresije *psy* i *zds* gena kod *Gentiana lutea* najmanji je u mladim cvetnim pupoljcima, dok je kod potpuno otvorenih cvetova njihov nivo ekspresije najveći. Kao posledica povećanja ekspresije ova dva gena tokom sazrevanja cvetova dolazi do sve veće akumulacije karotenoida (Zhu i sar., 2002). Kod *Osmanthus fragrans* velika količina  $\beta$ -karotena u cvetovima rezultat je nižeg nivoa transkripcije *chyb* i *ze* gena (Han i sar., 2014). U plodovima paradajza, prilikom njihovog sazrevanja i promene boje iz zelene u crvenu, povećana sinteza likopena nastaje zahvaljujući povećanoj transkripciji uzvodnih gena za biosintezu likopena, kao što su *psy*, *pds* i *crtsio*, i sniženoj transkripciji nizvodnih gena kao što su *lcyb*, *lcy* i *chyb* (Yuan i sar., 2015). Posttranskripcionom regulacijom takođe se može modulirati biosinteza karotenoida, i to promenom aminokiselinskih sekvenci, formiranjem protein-protein interakcija, kao i formiranjem enzimskih kompleksa (Sun i sar., 2018). Karotenoid-izomeraza (CRTISO) u nefotosintetičkim tkivima prevodi tetra-*cis* likopen u all-*trans* likopen dok u fotosintetičkim, odnosno zelenim tkivima pod uticajem svetlosti njena uloga može biti jednim delom zamenjena procesom fotoizomerizacije. Gubitak aktivnosti CRTISO dovodi do delimične inhibicije sinteze luteina i hloroze mladih listova paradajza i pirinča (Chai i sar., 2011). U biosintezi karotenoida ključni korak je ciklizacija likopena pomoću enzima ciklaza. Kod *Arabidopsis*-a i pirinča postoji samo jedna kopija *lcyb* gena, dok su kod paradajza, lubenice i citrusa prisutna dva tipa ciklaza: ciklaze specifične za hloroplast koje se ekspimiraju u listovima i zelenim tkivima plodova i ciklaze specifične za hromoplast koje se ekspimiraju u cvetovima i plodovima (Shilpa i sar., 2017). Razlika u aktivnosti LCYB i LCYE utiče na balans između  $\beta,\beta$ - i  $\beta,\epsilon$ -karotenoida (Harjes i sar., 2008). U kruničnim listićima *Oncidium* visok procenat  $\beta,\beta$ -karotenoida povezan je sa većom ekspresijom *lcyb* u odnosu na *lcy* (Chiou i sar., 2010), dok je u kruničnim listićima hrizanteme veća ekspresija *lcy* u odnosu na *lcyb* uzrok visokog procenta  $\beta,\epsilon$ -karotenoida (Kishimoto i Ohmiya, 2006). Kod ploda paprike žuta i narandžasta boja su rezultat odsustva, odnosno snižene ekspresije *ccs* gena (Rodriguez-Urbe i sar., 2012).

Karotenoid-dioksigenaza (CCD) ima katalitičku aktivnost, reguliše akumulaciju karotenoida i ima ulogu u smanjenju količine karotenoida u hromoplastima. Ona raskida dvostruke veze u molekulima karotenoida, pri čemu nastaju apokarotenoidi koji kontrolišu sintezu karotenoida i doprinose boji i mirisu cvetova i plodova, a takođe omogućava produkciju ABA i strigolaktona (Ibdah i sar., 2006). Kod *Arabidopsis*-a CCD familija gena se sastoji od 9 članova i podeljena je u dve grupe: 4 CCD (*CCD1*, 4, 7, 8) i 5 NCED (*NCED2*, 3, 5, 6, 9) gena. Sedam enzima učestvuje u sintezi prekursora biljnih hormona (ABA – *NCED2*, *NCED3*, *NCED5*, *NCED5*, *NCED9* i strigolaktona – *CCD7* i *CCD8*) (Alder i sar., 2012), dok *CCD1* i *CCD4* imaju ulogu u degradaciji karotenoida u cvetovima i plodovima. CCD i NCED prepoznaju različite supstrate i raskidaju veze u karotenoidima na različitim mestima (Walter i Strack, 2011). Prema najnovijim istraživanjima, boja cvetova može biti određena ne samo sintezom karotenoida, već i njihovom degradacijom. Kod hrizantema *CCD4* se ekspimirira samo u belim cvetovima, dok njegova supresija dovodi do povećanja količine karotenoida u kruničnim listićima pri čemu se formiraju cvetovi žute boje (Ohmiya i sar., 2006). Karotenoidi se sintetisu u kruničnim listićima cvetova, ali dejstvom *CCD4* oni mogu biti degradovani, što dovodi do nastanka cvetova bele boje. Kod *Lilium bownii* var.

*colchesteri*, nakon cvjetanja se za jedan dan boja promeni iz žute u belu, kao rezultat povećane ekspresije *CCD4* koja dovodi do smanjenja količine karotenoida u cvetovima (Hai i sar., 2012). Aktivnost *CCD4* je zabeležena i kod krokusa (Rubio-Moraga i sar., 2013), cvetova krompira (Campbell, 2010), vrsta roda *Brassica* (Zhang i sar., 2015) i hrizantema (Jo i sar., 2016). *CCD1* ima ulogu u sintezi isparljivih jedinjenja koja daju miris cvetovima petunije i *Osmanthus fragrans* (Simkin i sar., 2004; Baldermann i sar., 2010). Korelacija između ekspresije *CCD1* i akumulacije karotenoida kod *Ipomoea nil* i petunija nije uočena. Pretpostavlja se da se *CCD1* nalazi u citoplazmi i da ima ograničen pristup karotenoidima u hromoplastima (Ohmiya, 2019). Integracija transgena (gena za enzime GGPS, PSY, LCYB i CHYB) iz *I. obscura* var. *lutea* sa žutim cvetovima i prisustvo novosintetisanih pigmenata zeaksantina i neoksantina, u cvetovima transgenih biljaka *I. nil* nisu doveli do promene boje cveta iz bele u žutu boju (Watanabe i sar., 2017). Tek sa utišavanjem *CCD4* gena cvetovi su dobili žutu boju (Watanabe i sar., 2018).

Prema najnovijim istaživanjima, metabolizam karotenoida može biti kontrolisan i pomoću transkripcionih faktora. To su proteini koji se vezuju za specifične promotorske sekvence i regulišu ekspresiju ciljnog gena (Franco-Zorrilla i sar., 2014). Kod *Mimulus lewisii* je otkriven transkripcioni faktor RCP1 (eng. *Reduced Carotenoid Pigmentation 1*) koji je specifičan za cvet. RCP1 funkcioniše kao pozitivni regulator u biosintezi karotenoida, ali još nije jasno da li on ima direktan uticaj na ekspresiju gena biosintetskog puta. Pored toga, RCP1 ograničava biosintezu antocijanina i samim tim reguliše sadržaj karotenoida i antocijanina u cvetovima *M. lewisii* (Sagawa i sar., 2016). U cvetovima *Osmanthus fragrans* otkriveno je da promotor *CCD4* gena sadrži palindromske sekvence koje predstavljaju vezujuća mesta za transkripcioni faktor WRKY, koji reguliše ekspresiju *OfCCD4* i tako kontroliše sintezu pigmenata (Han i sar., 2016).

Ekspresija gena biosintetskog puta karotenoida može biti regulisana i pomoću sredinskih faktora (Shilpa i sar., 2017). *Psy* gen može biti ekspimiran u odgovoru na različite činioce, kao što su razviće, abscisinska kiselina, jak intenzitet svetlosti ili temperatura (Cazzonelli i Pogson, 2010). Biosinteza karotenoida indukovana svetlošću karakteriše se povećanom ekspresijom *psy* i povećanom enzimskom aktivnošću PSY (Welsch i sar., 2000). Intenzitet svetlosti, fotoperiod i spektralna svojstva svetlosti utiču na sastav i sadržaj karotenoida tokom razvića cvetova i sazrevanja plodova (Jahns i Holzwarth, 2012; Shilpa i sar., 2017).

#### 1.3.4.2.1. Promena boje cveta genetičkom modifikacijom biosinteze karotenoida

U poslednje dve decenije objavljeni su radovi o promeni boje cveta putem modifikacije biosinteze karotenoida metodama genetičkog inženjerstva posredstvom *Agrobacterium* kod nekoliko biljnih vrsta (**Tabela 3**). U genom duvana (*Nicotiana tabacum*) integrisan je gen za  $\beta$ -karoten-ketolazu (*crtO*) iz zelene alge *Hematococcus pluvialis* pod kontrolom promotora gena za PDS poreklom iz paradajza (Mann i sar., 2000). Kao rezultat ove metaboličke modifikacije sintetisan je astaksantin (3,3'-dihidroksi- $\beta$ , $\beta$ -karoten-4,4'-diona), a njegova akumulacija je dovela do promene boje nektarija iz žute u crvenu. Par godina kasnije, Ralley i saradnici (2004) su kod *Nicotiana* i paradajza postigli sintezu astaksantina uvođenjem dva gena iz morske bakterije *Paracoccus*, 3,3'- $\beta$ -hidroksilazu (*crtZ*) i 4,4'- $\beta$ -oksigenazu (*crtW*). Transgeni listovi duvana akumulirali su 50 puta veću količinu ketokarotenoida u odnosu na transgene listove paradajza. Nektarije transgenog duvana bile su u različitim nijansama ružičaste boje za razliku od žutih nektarija kontrolnih biljaka (Ralley i sar., 2004). Kod petunije je integrisan *crtW* gen poreklom iz *Agrobacterium aurantiacum*. U transgenim biljkama sintetisan je astaksantin, a u zavisnosti od količine akumuliranog astaksantina, boja cvetova petunije kretala se od tamno žute pa sve do narandžaste (Umemoto i sar., 2006). Isti gen upotrebljen je i za pomenu boje cveta *Lotus japonicus*. U transgenim cvetovima je sintetisan astaksantin, a kao posledica njegove akumulacije dobijeni su cvetovi u različitim nijansama narandžaste boje (Suzuki i sar., 2007).

**Tabela 3.** Biljne vrste sa promenjenom bojom cveta, dobijene modifikacijom biosinteze karotenoida metodom genetičke transformacije posredstvom *Agrobacterium*.

Vrsta	Boja cveta	Referenca
<i>Fortunella hindsii</i> Swingle	bela › narandžasta	Cao i sar., 2015
<i>Ipomoea nil</i>	bela › žuta	Watanabe i sar., 2017
<i>Iris germnaica</i> cv. 'Fire Bride'	žuta › narandžasta i roze	Jeknić i sar., 2014
<i>Lotus japonicus</i>	žuta › narandžasta	Suzuki i sar., 2007
<i>Oncidium</i>	svetlo žuta › belo-žuta	Wang i sar., 2016
<i>Petunia sp.</i>	bledo žuta › tamno žuta, narandžasta	Umemoto i sar., 2006
<i>Nicotiana glauca</i>	žuta › crvena	Mortimer i sar., 2017
<i>Nicotiana tabacum</i>	žuta › crvena	Mann i sar., 2000
<i>Nicotiana tabacum</i>	žuta › crvena	Ralley i sar., 2004
<i>Solanum lycopersicum</i>	žuta › različite nijanse narandžaste	Jeknić, 2015

Genetička transformacija embriogenog kalusa *Fortunella hindsii* Swingle *crtB* genom za fitoen-sintazu poreklom iz *Pantoea agglomerans* dovela je do povećane ekspresije *crtB*, koja je za posledicu imala promenu boje cveta iz bele u narandžastu, kao i promenu boje korenova i opalih listova. Povećana akumulacija karotenoida u tkivima uzrokovala je razgradnju skroba u plastidima i negativno je uticala na akumulaciju antocijanina (Cao i sar., 2015). Promena boje cveta *Oncidium* uspešno je dobijena putem RNK interferencije, snižavanjem ekspresije gena za  $\beta$ -karoten hidroksilazu (BCH) (Wang i sar., 2016). Moritmer i saradnici (2017) su transformisali *Nicotiana glauca* genima za *crtW* i *crtZ* iz *Brevundimonas sp.* SD-212 sa ciljem konverzije endogenih karotenoida kao što su  $\beta$ -karoten i zeaksantin, u keto-hidroksilne karotenoide, kao što su ehinenon i njegovi derivati, kantaksantin, 4-ketozeaksantin i astaksantin. Osim promene boje cveta iz žute u crvenu, došlo je i do promene boje listova, iz zelene u tamno braon-zelenu, a kod jedne transgene linije listovi u fazi senescencije su bili crvene boje. Modifikacija biosinteze karotenoida pokušana je i kod drvenaste vrste, jabuke (*Malus domestica* cv. 'Brookfield Gala') u cilju povećanja otpornosti na fotooksidaciju (Jia i sar., 2019). Posredstvom *A. tumefaciens* uvedeni su *bkt* i *crtR-B* geni iz *Haematococcus pluvialis* u genom jabuke. Kao rezultat ekspresije ova dva gena došlo je do sinteze astaksantina u transgenim tkivima. Kalus je promenio boju iz zelene u crvenu, a kasnije su i listovi transgenih biljaka dobili crvenu boju.

Kod različitih kultivara roda *Iris* uspešno je promenjena boja cveta metaboličkom modifikacijom biosinteze karotenoida. Genetičkom transformacijom bakterijskim *crtB* genom poreklom iz *Pantoea agglomerans*, pod kontrolom promotorskog regiona gena za kapsantin-kapsorubin-sintazu iz *L. lancifolium* (PLlccs) transformisana je *Iris germanica* cv. 'Fire Bride'. Transgeni kalus je promenio boju iz žute u roze-narandžastu i crvenu, kao rezultat povećane akumulacije likopena. U transgenim biljkama *I. germanica* cv. 'Fire Bride' regenerisanim iz kalusa, ekspresija *crtB* gena dovela je do promene boje plodnika i cvetne drške iz zelene u narandžastu, kao i prašnika i bazanog dela segmenta listova iz bele u roze (Jeknić i sar., 2014). Gen za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*ccs*) pod kontrolom konstitutivnog promotora (CaMV 35S) korišćen je za transformaciju *I. germanica* cv. 'Hot Property'. Transformisani kalus je promenio boju iz žute u različite nijanse narandžasto-crvene, na račun novosintetisanih pigmenata kapsantina i kapsorubina (Jeknić i sar., 2012). Istim genom (*ccs*) ali pod kontrolom himernog promotora (E35S-PchsA) transformisan je *Solanum lycopersicum* cv. 'Moneymaker'. Transformisani cvetovi paradajza bili su u različitim nijansama narandžaste boje za razliku od žutih cvetova netransformisanih biljaka. Kapsantin i kapsantinu sličan pigment detektovani su ne samo u cvetovima već i u listovima transgenih biljaka (Jeknić, 2015).

#### 1.4. Status i perspektive gajenja biljaka sa promenjenom bojom cveta

Metode genetičkog inženjerstva omogućile su razmenu gena među brojnim biljnim vrstama, čak i onim inkompatibilnim. Istraživanja u cilju promene boje cveta genetičkim manipulacijama traju više od tri decenije pri čemu je transformisan veliki broj biljnih vrsta. Međutim, do sada su zvanično samo transgeni karanfili (*Dianthus caryophyllus*) i ruže (*Rosa x hybrida*), kod kojih je modifikovan put biosinteze antocijanina, postali komercijalno dostupni. Genetički modifikovani karanfili iz serije 'Moon' pušteni su u prodaju 1997. godine u Japanu. Danas na tržištu postoji 11 varijeteta sa cvetovima različitih nijansi, a prodaju se u USA, Kanadi, Japanu, Australiji, Rusiji, Evropskoj Uniji, Ujedinjenim Arapskim Emiratima, a od 2012. godine i u Maleziji, dok se proizvodnja odvija u Kolumbiji i Ekvadoru. Genetički transformisane plave ruže (*Rosa x hybrida* 'Applause') u komercijalnoj prodaji su od 2009. godine na teritoriji Japana, a od 2011. godine i na teritoriji Severne Amerike. Ohtsubo (2011) smatra da je ciklama (*Cyclamen spp.*) sledeća transgena biljna vrsta koja se može naći u komercijalnoj prodaji u bliskoj budućnosti. Na tom putu postoji nekoliko prepreka koje usporavaju i otežavaju prodaju ukrasnih transgenih biljaka u marketima. Genetički modifikovane vrste moraju proći sve molekularne analize i mora se imati u vidu širenje polena i semena takvih vrsta.

Takođe, u poslednje vreme uočene su i druge transformisane ukrasne biljke sa promenjenom bojom cveta koje se nalaze na tržištu. Bashandy i Teeri (2017) su na osnovu molekularne analize pokazali da petunije sa narandžastim cvetovima, koje su pronađene u Finskoj u slobodnoj prodaji, predstavljaju genetički modifikovane biljke. U cvetovima ovih petunija dominantno se nalazio pigment pelargonidin, dok je u biljkama bio ekspimiran *Al* gen poreklom iz kukuruza, kao i selektivni marker-gen za neomicin-fosfotransferazu (*nptII*).

Kada je u pitanju komercijalizacija genetički modifikovanih ukrasnih biljaka, može se očekivati da će se u budućnosti još ukrasnih vrsta naći na tržištu. Potrebno je proceniti rizik stavljanja takvih vrsta u promet, naročito kada se radi o očuvanju životne sredine i zdravlju ljudi. Neophodno je ispuniti zakonske regulative koje zahteva svaka država i dobiti odobrenja za gajenje transgenih biljaka izvan laboratorijskih uslova. Svakako, očekuje se da njihova komercijalizacija bude veća u odnosu na biljne vrste koje se koriste u ishrani.

## 2. CILJ RADA

Osnovni naučni cilj ove doktorske disertacije je razvoj novih biotehnoloških metoda za oplemenjivanje sitnocvetne ljubičice *Viola cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens' u cilju promene boje cveta metaboličkom modifikacijom biosinteze karotenoida genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu.

Realizacija postavljenog cilja obuhvatala je nekoliko zadataka:

1. Uspostavljanje protokola za *in vitro* regeneraciju izdanaka *V. cornuta* putem organogeneze *de novo* iz različitih eksplantata izolovanih iz klijanaca i *in vitro* gajenih biljaka.
2. Razvoj protokola za genetičku transformaciju *V. cornuta* genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*) poreklom iz ljiljana (*Lilium lancifolium*) posredstvom *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Dokazivanje prisustva *Llccs* gena i njegove ekspresije u transformisanim biljkama molekularnim metodama.
4. Analiza akumulacije nosintetisanog pigmenta u cvetovima transformisanih biljaka.
5. Praćenje fenotipskih karakteristika transformisanih biljaka.
6. Razvoj protokola za dugotrajno čuvanje netransformisanih i transformisanih linija metodama krioprezervacije.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Za uspostavljanje *in vitro* kulture, kao polazni materijal korišćena su semena *Viola cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens' (B & T World Seeds sarl, Panguignan, Francuska - kataloški broj 24421 i Jelitto Staudensamen, Schwarmstedt, Nemačka - kataloški broj VA206).

##### 3.1.1. Sterilizacija semena

Semena kultivara *V. cornuta* L. 'Lutea Splendens' površinski su sterilisana ispiranjem 60 minuta u tekućoj vodi u koju je dodato dve kapi komercijalnog deterdženta, a zatim su inkubirana 20 minuta u 20% vodenom rastvoru komercijalnog sredstva za izbeljivanje (Snežnik, Panonija, Pančevo, Srbija) koje sadrži 4% aktivnog hlora. Semena su u rastvoru za izbeljivanje bila izložena konstantnom mešanju na horizontalnoj rotacionoj mešalici (90 rpm). Nakon 20 minuta sredstvo za izbeljivanje sa aktivnim hlorom je uklonjeno i dodat je 96% etanol, u kome su semena bila 1 minut. Semena su zatim tri puta isprana sterilnom dejonizovanom vodom, ocedena na sterilnom filter-papiru i postavljena u sterilne Petri-kutije (Spektar, Čačak, Srbija) sa hranljivom podlogom za isključavanje ili na sterilni navlaženi filter-papir.

#### 3.2. Sastav hranljivih podloga

Za gajenje *V. cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens' u uslovima *in vitro* korišćeni su mineralni rastvor i rastvor vitamina po Murashige i Skoog-u (1962). Sastav mineralnih soli, kompleksa gvožđa i vitamina MS hranljive podloge prikazan je u **Tabeli 4**.

**Tabela 4.** Sastav i koncentracija mineralnih soli, kompleksa gvožđa i vitamina u MS hranljivoj podlozi (Murashige i Skoog, 1962).

Makroelementi	mg/l podloge
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Mikroelementi	mg/l podloge
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KJ	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
Kompleks gvožđa	mg/l podloge
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,2
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
Kompleks vitamina	mg/l podloge
Vitamin B <sub>1</sub>	0,1
Vitamin B <sub>6</sub>	0,5
Nikotinska kiselina	0,5
Glicin	2,0

Kao osnovna hranljiva podloga korišćena je modifikovana MS podloga koja je sadržala upola razblažen rastvor mineralnih soli, dok su kompleksi gvožđa i vitamina bili u punim koncentracijama ( $\frac{1}{2}$ MS). Pored mineralnih soli  $\frac{1}{2}$ MS hranljiva podloga sadržala je 20 g/l saharoze, 7 g/l agara (Institut za virusologiju, Torlak, Beograd, Srbija), 100 mg/l mio-inozitola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 80 mg/l adenin hemisulfata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 100 mg/l L-tirozina (Reanal, Mađarska). Vrednost pH hranljive podloge podešavana je na 5,8 pomoću 1N NaOH i/ili 1 N HCl pre sterilizacije u autoklavu (Raypa® AE75, Barselona, Španija), na temperaturi od 114 °C i pritisku od 80 kPa, u trajanju od 25 minuta.

Klijanje semena *V. cornuta* u uslovima *in vitro* ispitivano je na 4 hranljive podloge. Pored MS hranljive podloge, korišćene su podloge sa dva ( $\frac{1}{2}$ MS) i četiri ( $\frac{1}{4}$ MS) puta manjom koncentracijom mineralnih soli, dok su kompleksi gvožđa i vitamini u svim podlogama bili u punim koncentracijama. Takođe je korišćena MS hranljiva podloga sa dodatkom 0,1 mg/l giberelne kiseline (MS + GA<sub>3</sub>).

Za indukciju formiranja izdanaka iz eksplantata uzetih iz klijanaca – odsecci listova, lisnih drški i hipokotila, korišćena je  $\frac{1}{2}$ MS hranljiva podloga bez regulatora rasteanja koja je predstavljala kontrolnu podlogu i dve  $\frac{1}{2}$ MS hranljive podloge sa dodatim regulatorima rasteanja. Hranljive podloge za indukciju izdanaka iz eksplantata uzetih sa klijanaca navedene su u **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Sastav hranljivih podloga za indukciju izdanaka iz odsečaka lisnih drški, listova i hipokotila klijanaca *V. cornuta*.

Hranljiva podloga	Koncentracija regulatora rasteanja (mg/l)
$\frac{1}{2}$ MS	-
$\frac{1}{2}$ MS + 2,4-D + BAP	0,1 + 2,0
$\frac{1}{2}$ MS + TDZ	1,0

Za indukciju organogeneze izdanaka iz eksplantata uzetih sa *in vitro* gajenih biljaka – odsecci lisnih drški i listova, korišćeno je 29 hranljivih podloga. Osnovna podloga ( $\frac{1}{2}$ MS) bila je obogaćena sa regulatorima rasteanja IAA, NAA, BAP, KIN, TDZ i CPPU (N-fenil-N'-(2-hloro-4-piridil) urea)) a njihove kombinacije i koncentracije u podlozi navedene su u **Tabeli 6**.

**Tabela 6.** Regulatori rasteanja i njihove kombinacije i koncentracije u hranljivim podlogama za indukciju izdanaka iz odsečaka lisnih drški i listova *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta*.

Regulatori rasteanja (mg/l)					
Auksini		Citokinini			
IAA	NAA	BAP	KIN	TDZ	CPPU
-	-	-	-	-	-
-	-	0,1	-	-	-
-	-	0,5	-	-	-
-	-	1,0	-	-	-
0,1	-	1,0	-	-	-
0,5	-	1,0	-	-	-
-	0,1	1,0	-	-	-
-	0,5	1,0	-	-	-
-	-	-	0,1	-	-
-	-	-	0,5	-	-



Tabela 6. nastavak

-	-	-	1,0	-	-
0,1	-	-	1,0	-	-
0,5	-	-	1,0	-	-
-	0,1	-	1,0	-	-
-	0,5	-	1,0	-	-
-	-	-	-	0,1	-
-	-	-	-	0,5	-
-	-	-	-	1,0	-
0,1	-	-	-	1,0	-
0,5	-	-	-	1,0	-
-	0,1	-	-	1,0	-
-	0,5	-	-	1,0	-
-	-	-	-	-	0,1
-	-	-	-	-	0,5
-	-	-	-	-	1,0
0,1	-	-	-	-	1,0
0,5	-	-	-	-	1,0
-	0,1	-	-	-	1,0
-	0,5	-	-	-	1,0

U **Tabeli 7** prikazan je sastav svih hranljivih podloga koje su korišćene za umnožavanje izdanaka.

Tabela 7. Sastav svih hranljivih podloga korišćenih za umnožavanje izdanaka *V. cornuta*.

Hranljiva podloga	Koncentracija regulatora rastenja (mg/l)
$\frac{1}{2}$ MS	-
$\frac{1}{2}$ MS + NAA + BAP	0,1 + 1,0
$\frac{1}{2}$ MS + NAA + BAP	0,5 + 1,0
$\frac{1}{2}$ MS + TDZ	0,1
$\frac{1}{2}$ MS + CPPU	0,5

Za ožiljavanje izdanaka *V. cornuta* korišćena je podloga bez regulatora rastenja kao i podloge sa različitim auksinima. Sve podloge za ožiljavanje izdanaka prikazane su u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Sastav hranljivih podloga za ožiljavanje izdanaka *V. cornuta*.

Hranljiva podloga	Koncentracija regulatora rastenja (mg/l)
$\frac{1}{2}$ MS	-
$\frac{1}{2}$ MS + IAA	0,1
$\frac{1}{2}$ MS + IBA	0,1
$\frac{1}{2}$ MS + NAA	0,1

### 3.3. Uslovi gajenja u kulturi *in vitro*

*In vitro* kulture gajene su u klimatizovanoj prostoriji za gajenje, na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C. Kulture su gajene u uslovima dugog dana (16h svetlost/8h mrak) ili u konstantnom mraku. Kao izvor bele svetlosti korišćene su fluorescentne lampe (Tesla, Pančevo, Srbija, 65 W, gustina svetlosnog fluksa od  $47 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ ).

### 3.4. Klijanje semena u kulturi *in vitro*

Sterilisana semena postavljana su u Petri-kutije na hranljive podloge navedene u **Tabeli 9**. Petri-kutije su bile umotane u aluminijumsku foliju kako bi se obezbedili uslovi konstantnog mraka. Klijanje semena je praćeno na tri temperature: 23 °C (u sobi za gajenje biljaka), 10 °C (u frižideru) i 4 °C (u hladnoj sobi). Procenat klijanja semena utvrđivan je nakon 4, 8 i 12 nedelja od početka eksperimenta. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 4 Petri-kutije sa po 20 semena (n=80). Eksperiment je ponovljen tri puta. Pored toga, sterilisana semena su gajena na sterilnom vlažnom filter-papiru na temperaturi od 23 °C.

**Tabela 9.** Sastav hranjivih podloga i uslovi klijanja semena *V. cornuta*.

Hranljiva podloga	Temperatura (°C)
¼MS	23
¼MS	10
¼MS	4
½MS	23
½MS	10
½MS	4
MS	23
MS	10
MS	4
MS + 0,1 GA <sub>3</sub>	23
MS + 0,1 GA <sub>3</sub>	10
MS + 0,1 GA <sub>3</sub>	4

### 3.5. Regeneracija izdanaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro*

*De novo* organogeneza izdanaka ispitivana je kod eksplantata poreklom od klijanaca - odsecci listova, lisnih drški i hipokotila, kao i eksplantata poreklom od *in vitro* gajenih biljaka - odsecci lisnih drški i listova.

#### 3.5.1. Regeneracija izdanaka iz odsećaka klijanaca

Kao polazni materijal za dobijanje izdanaka u kulturi *in vitro* korišćeni su eksplantati klijanaca (odsecci listova, lisnih drški i hipokotila) koji su dobijeni isključivanjem semena tokom 12 nedelja na MS hranljivoj podlozi na 4 °C. Eksplantati su postavljani na ½MS hranljivu podlogu sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP, odnosno 1,0 mg/l TDZ, kao i na ½MS hranljivu podlogu bez regulatora rastanja koja je predstavljala kontrolu (**Tabela 5**). Odsecci listova (5 x 5 mm), lisnih drški (5 mm) i hipokotila (10 mm) su gajeni u Petri-kutijama sa 25 ml podloge. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 3 Petri-kutije sa po 10 eksplantata (n=30) i ceo eksperiment je ponovljen dva puta. Kulture su gajene u uslovima konstantnog mraka. Posle 4 nedelje određivan je procenat eksplantata kod kojih je formiran kalus kao i procenat eksplantata kod kojih su indukovani izdanci.

##### 3.5.1.1. Uticaj svetlosti na regeneraciju izdanaka

Za ispitivanje uticaja svetlosti na formiranje izdanaka *in vitro* kao početni eksplantati korišćeni su odsecci hipokotila klijanaca koji su dobijeni isključivanjem semena tokom 12 nedelja na ½MS hranljivoj podlozi na 10 °C. Odsecci hipokotila dužine 10 mm gajeni su na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP. Polovina od ukupnog broja eksplantata gajena je u

uslovima dugog dana, dok je druga polovina gajena u konstantnom mraku. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 4 Petri-kutije sa po 30 eksplantata ( $n=120$ ). Posle 4 nedelje određivan je procenat eksplantata kod kojih je formiran kalus, procenat eksplantata kod kojih su formirani adventivni izdanci kao i broj izdanaka po eksplantatu. Eksperiment je ponovljen dva puta.

### **3.5.1.2. Uticaj pozicije odsečka hipokotila na regeneraciju izdanaka**

Regenerativni potencijal različitih odsečaka hipokotila klijanca *V. cornuta* ispitivan je tako što je gornja polovina hipokotila klijanca podeljena na 3 odsečka dužine 5 mm. Odsečak hipokotila koji je najbliži epikotilu klijanca označen je kao  $h_1$  (gornji), sledeći kao  $h_2$  (srednji) i odsečak koji je najbliži korenu klijanca kao  $h_3$  (donji). Eksplantati hipokotila su razdvojeni po pozicijama, postavljeni u Petri-kutije na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivu podlogu za indukciju izdanaka sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP, i gajeni u uslovima dugog dana na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C. Subkultivacija eksplantata hipokotila vršena je u intervalu od 4 nedelje. Na kraju svake subkulture određivan je procenat eksplantata kod kojih su se formirali izdanci kao i broj izdanaka po odsečku hipokotila. Svaka eksperimentalna grupa eksplantata hipokotila ( $h_1$ - $h_3$ ) sastojala se od 4 Petri-kutije sa po 15 eksplantata ( $n=60$ ), a eksperiment je ponovljen tri puta.

### **3.5.1.3. Histoatomska analiza organogeneze izdanaka**

Histoatomska analiza organogeneze izdanaka formiranih na odsečcima hipokotila urađena je po metodi Jensen (1962). Eksplantati hipokotila su fiksirani nakon 0, 10, 15, 20, 25 i 30 dana gajenja na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP.

Uzorci su fiksirani u FAA (85% etanol:10% formaldehid:5% glacijalna sirćetna kiselina) i čuvani u frižideru na 4 °C. Nakon fiksacije, uzorci su isprani tekućom vodom, a zatim je vršena postepena dehidracija biljnog materijala u gradijentu vodenih rastvora etanola (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%). Zatim je tkivo tretirano smešom apsolutnog etanola i ksilola (1:1, v:v), ksilolom, kao i smešom ksilola i parafina (1:1, v:v) na 60 °C. U smeši ksilola i parafina biljni materijal je stajao u termostatu 24h, a nakon toga je smeša zamenjena čistim rastopljenim parafinom (Histowax, Histolab, Švedska) u kojem je materijal bio naredna 72h na 60 °C.

Nakon kalupljenja biljnog materijala parafinski blokovi su sečeni na Reichert-ovom rotacionom mikrotomu (Beč, Austrija), a preseći (debljine 7  $\mu$ m) su postavljeni na predmetne pločice. Pre bojenja, tkivo je oslobođeno parafina držanjem pločica sa presećima u ksilolu, dva puta po 15 minuta. Rehidracija preseka je vršena kroz seriju vodenih rastvora etanola (100%, 96%, 70%) u trajanju od po 10 minuta.

Preparati su bojeni u rastvoru hematoksilina u trajanju od 15 minuta. Iz hematoksilina, preparati su prenešeni u vodu i dobro isprani, a potom i dehidrirani u seriji vodenih rastvora etanola (70%, 96%, 100%). Prosvetljavanje preparata postignuto je držanjem preparata u ksilolu I i ksilolu II po 5 minuta. Preko preparata izvađenog iz ksilola naneta je kap Kanada balzama i preseći su pokriveni pokrovnim staklom. Dobijeni trajni preparati su fotografisani na svetlosnom mikroskopu Nikon Eclipse E100 pomoću kamere MikroCam SP 5.1 Bresser i softvera MikroCamLabII.

### **3.5.2. Regeneracija izdanaka na eksplantatima poreklom od *in vitro* gajenih izdanaka *V. cornuta***

Lisne drške i listovi biljaka gajenih u kulturi *in vitro*, isečeni su na delove (dužine 5 mm i širine 4-6 mm) i gajeni na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa dodatim citokininima pojedinačno (BAP, KIN, TDZ ili CPPU) u koncentracijama 0,1, 0,5 i 1,0 mg/l, ili u kombinaciji sa auksinima (IAA ili NAA) u koncentracijama 0,1 i 0,5 mg/l (**Tabela 6**). Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 4 Petri-kutije sa po 10 odsečaka lisnih drški ili listova ( $n=40$ ). Posle četiri nedelje gajenja na  $23 \pm 2$

°C u uslovima dugog dana određivan je procenat eksplantata na kojima se formirao kalus, procenat eksplantata sa regenerisanim izdancima i prosečan broj izdanaka po eksplantatu. Eksperiment je ponovljen dva puta.

### **3.6. Umnožavanje izdanaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro***

Umnožavanje izdanaka regenerisanih u kulturi *in vitro* praćeno je odvojeno kod izdanaka koji su dobijeni od eksplantata klijanaca kao i eksplantata poreklom od *in vitro* gajenih biljaka (Tabela 7).

Dobro razvijeni izdanci, regenerisani na različitim eksplantatima klijanaca (odsećcima listova, lisnih drški i hipokotila), izdvojeni su i dalje gajeni u erlenmajerima sa 40 ml čvrste ½MS hranljive podloge sa 0,1 ili 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 4 erlenmajera sa po 10 izdanaka (n=40). Posle 4 nedelje određivan je broj novoformiranih aksilarnih izdanaka, odnosno indeks multiplikacije. Kontinualna kultura izdanaka održavana je subkultivacijom na svake 4 nedelje, na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP.

Pored toga, praćeno je umnožavanje izdanaka (dužine 2 cm), regenerisanih na odsećcima lisnih drški i listova izdanaka gajenih *in vitro*. Adventivni izdanci gajeni su u erlenmajerima sa 40 ml ½MS hranljive podloge sa dodatkom 0,1 mg/l TDZ ili 0,5 mg/l CPPU ili 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP. Za svaku eksperimentalnu grupu postavljena su po 4 erlenmajera sa po 10 izdanaka (n=40). Nakon 6 nedelja gajenja određivani su prosečan broj izdanaka po eksplantatu i prosečna dužina izdanka.

### **3.7. Ožiljavanje izdanaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro***

Vrhovi izdanaka regenerisani na različitim eksplantatima klijanaca koji su umnožavani na hranljivim podlogama za umnožavanje sa NAA i BAP dužine oko 2 cm, su izolovani i dalje gajeni na ½MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja ili na podlogama sa niskom koncentracijom (0,1 mg/l) različitih auksina - IAA, IBA i NAA (Tabela 8) radi ožiljavanja. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 5 tegli sa po 10 izdanaka (n=50), a eksperiment je ponovljen dva puta. Posle 8 nedelja određivani su procenat ožiljavanja, broj korenova po biljci i dužina najdužeg korena. Pored toga, određivani su i parametri koji opisuju morfologiju ožiljenih biljaka: broj bočnih grana po biljci, broj nodusa po biljci i prosečna visina biljke.

Izdanci regenerisani na eksplantatima *in vitro* gajenih biljaka, dužine 2 cm, koji su dobijeni umnožavanjem na hranljivim podlogama sa TDZ, CPPU ili NAA i BAP dalje su gajeni na ½MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Izdanci su gajeni u staklenim teglama sa 100 ml čvrste hranljive podloge. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 5 tegli sa po 10 izdanaka (n=50). Posle 4 nedelje gajenja određivan je broj korenova po biljci i dužina najdužeg korena, kao i morfološki parametri kao što su broj bočnih grana po biljci i prosečna visina biljke.

### **3.8. Aklimatizacija biljaka *V. cornuta* iz kulture *in vitro***

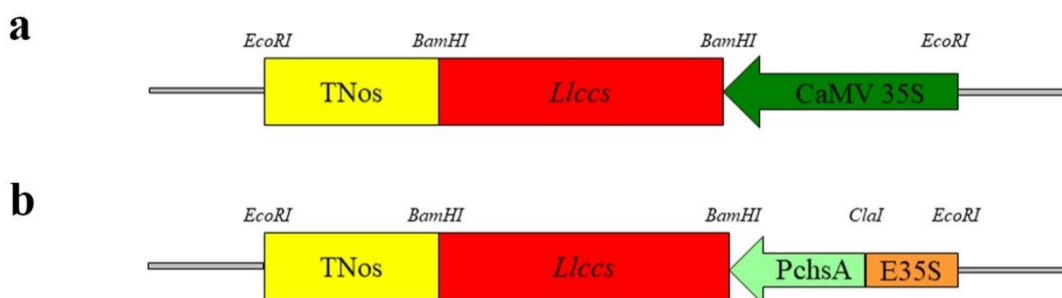
Ožiljene biljke su izvađene iz posuda za gajenje u uslovima *in vitro*, oprane pod česmenskom vodom radi uklanjanja ostataka hranljive podloge i zasađene u žardinjere sa supstratom (Floradur® B Pot Medium-Coarse, Floragard Vertriebs-GmbH, Oldenburg, Nemačka). Biljke su gajene u stakleniku na temperaturi od  $21 \pm 4$  °C.

### 3.9. Genetička transformacija *V. cornuta*

Genetička transformacija *V. cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens' izvršena je pomoću *A. tumefaciens* soj LBA4404, genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*ccs*). U ovom radu korićen je *ccs* gen izolovan i kloniran iz tigrastog ljiljana (*Lilium lancifolium*), odnosno perijanta njegovih narandžastih cvetnih pupoljaka i označen je kao *Llccs* (Jeknić i sar., 2012). Za inokulaciju sa *A. tumefaciens* korišćeni su odsecci hipokotila klijanaca *V. cornuta* iz kulture *in vitro*.

#### 3.9.1. Vektori korišćeni za genetičku transformaciju

Transformacija je izvršena sa tri različita vektora: 1. pWBVec10a/CaMV35S::*Llccs*::TNos, 2. pWBVec10a/E35S-PchsA::*Llccs*::TNos, 3. pWBVec10a. U prvom transformacionom vektoru *Llccs* je pod kontrolom konstitutivnog promotora, CaMV 35S, i Nos terminatora (Slika 6a), dok je u drugom transformacionom vektoru *Llccs* pod kontrolom E35S-PchsA himernog promotora (promotora gena za halkon-sintazu iz petunije - PchsA, fuzionisanog za enhenser sekvencu - E35S, konstitutivnog promotora mozaičnog virusa karfiola) i Nos terminatora (Slika 6b). Ekspresione kasete *Llccs* gena ubačene su unutar binarnog plazmidnog vektora pWBVec10a, koji nosi *hpt* gen za rezistenciju na higromicin (CaMV 35S::*hpt*::T35S) i *uidA* marker gen (CaMV 35S::*uidA*::TNos). Oba gena su prekinuta intronom kako ne bi došlo do njihove ekspresije u bakterijskim ćelijama. Treći vektor ("prazan vektor") je predstavljao kontrolu transformacije i nosio je samo selektivni marker-gen i reporterski gen.



**Slika 6.** Deo mape T-DNK regiona transformacionog vektora koja predstavlja ekspresionu kasetu gena za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*) pod kontrolom različitih promotora i Nos terminatora. **a** - transformacioni vektor pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos (Jeknić i sar., 2012); **b** - transformacioni vektor pWBVec10a/E35S-PchsA::*Llccs*::TNos (Jeknić, 2015).

#### 3.9.2. Sastav hranljive podloge za rast bakterija

*A. tumefaciens* LBA4404, korišćen u eksperimentima genetičke transformacije, gajen je na YEP (eng. *Yeast Extract Pepton*) hranljivoj podlozi (An i sar., 1988) čiji je sastav prikazan u **Tabeli 10**.

**Tabela 10.** Sastav YEP hranljive podloge za rast bakterija.

Komponenta	Koncentracija (g/l)
Ekstrakt kvasca	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar	15
pH 7,2	

Čvrsta hranljiva podloga za rast bakterija je nakon sterilizacije hladena do oko 40 °C, kada su u laminarnoj komori neposredno pre razlivanja u Petri-kutije dodavani antibiotici spektinomycin (100 mg/l) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemačka) i kanamicin (50 mg/l) (Sigma-Adrich, Steinheim, Nemačka). Bakterijske kulture, zasejane ezom na čvrstu hranljivu podlogu u Petri-kutijama, inkubirane su u mraku na temperaturi od  $26 \pm 2$  °C u trajanju od 48-72h (do pojave bakterijskih kolonija), a potom čuvane na +4 °C. Svakog meseca vršeno je presejavanje bakterijskih kultura na svežu YEP hranljivu podlogu. Na duži vremenski period bakterije su čuvane kao glicerolske kulture (1:1 (v:v) smeša sterilnog glicerola i prekonocne bakterijske suspenzije), na -70 °C.

Za inokulaciju biljnog materijala korišćene su bakterijske suspenzije dobijene zasejavanjem jedne bakterijske kolonije sa čvrste YEP hranljive podloge u 10 ml tečne YEP podloge, kojoj su prethodno dodati antibiotici spektinomycin (100 mg/l) i kanamicin (50 mg/l). Nakon 24h inkubacije na horizontalnoj rotacionoj mešalici na 90 rpm u mraku i na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C, dobijena bakterijska suspenzija je korišćena za inokulaciju eksplantata hipokotila *V. cornuta* u cilju genetičke transformacije.

### **3.9.3. Određivanje selektivne koncentracije higromicina**

Za određivanje koncentracije antibiotika koja će se koristiti prilikom selekcije transformisanog od netransformisanog biljnog materijala, urađen je test osetljivosti biljaka *V. cornuta* prema higromicinu (Duchefa Biochemie, Haarlem, Holandija). Eksplantati hipokotila dužine 5-6 mm su posle 2, odnosno 7 dana gajenja na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP za indukciju oragnogeneze izdanaka subkultivisani na hranljivu podlogu istog sastava u koju je dodat higromicin u koncentracijama 0, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10 mg/l. Za svaki tretman u 3 Petri-kutije postavljeno je po 30 eksplantata (n=90). Eksplantati hipokotila su na podlogama sa higromicinom gajeni 4 nedelje u uslovima dugog dana, nakon čega je određen procenat eksplantata koji je formirao kalus, procenat eksplantata koji je regenerisao adventivne izdanke, kao i broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu. Na osnovu dobijenih rezultata, za selekciju transformisanog od netransformisanog biljnog tkiva, u zavisnosti od dužine trajanja predtretmana, izabrana je najniža koncentracija higromicina na kojoj je regeneracija izdanaka inhibirana.

### **3.9.4. Genetička transformacija eksplantata hipokotila *V. cornuta* pomoću *A. tumefaciens***

Kao početni biljni materijal za genetičku transformaciju korišćeni su eksplantati hipokotila klijanaca, starih oko dva meseca i prosečne dužine 7-8 cm. Odsecci hipokotila, dužine ~5 mm, vodili su poreklo od gornje polovine hipokotila klijanca, sa regiona najbližeg apikalnom meristemu. Pre inokulacije, odsecci hipokotila su 2, odnosno 7 dana gajeni na hranljivoj podlozi, za indukciju izdanaka ( $\frac{1}{2}$ MS sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP; **Tabela 11**). Nakon predtretmana, eksplantati su potapani u prethodno pripremljenu bakterijsku suspenziju kojoj je dodat 100  $\mu$ M acetosiringon (AS) (Sigma). Optička gustina suspenzije, izmerena na spektrofotometru (Agilent 8453, Santa Clara, CA, SAD) na talasnoj dužini od 600 nm, iznosila je od 0,3 – 0,7. Inokulacija eksplantata hipokotila sa *A. tumefaciens* je trajala od 10 – 15 min, a odvijala se u mraku, na horizontalnoj rotacionoj mešalici (50 rpm), na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C. Kontrolni odsecci hipokotila potapani su u tečnu YEP podlogu koja nije sadržala bakterije. Potom su svi eksplantati ocedeni na sterilnom filter-papiru i postavljeni u Petri-kutije na hranljivu podlogu za kokultivaciju.

**Tabela 11.** Sastav hranljivih podloga za genetičku transformaciju hipokotila *V. cornuta* pomoću *A. tumefaciens*.

Protokol	Hranljive podloge
Predtretman	½MS, 20 g/l saharoza, 7 g/l agar, 100 mg/l mio-inozitol, 100 mg/l tirozin, 80 mg/l adenin hemisulfat, 0,1 mg/l 2,4-D, 2,0 mg/l BAP, pH 5,8
Inokulacija	YEP hranljiva podloga, 100 µM acetosiringon
Kokultivacija	½MS, 20 g/l saharoza, 7 g/l agar, 100 mg/l mio-inozitol, 100 mg/l tirozin, 80 mg/l adenin hemisulfat, 0,1 mg/l 2,4-D, 2,0 mg/l BAP, 100 µM acetosiringon, pH 5,2
Selekcija	½MS, 20 g/l saharoza, 7 g/l agar, 100 mg/l mio-inozitol, 100 mg/l tirozin, 80 mg/l adenin hemisulfat, 0,1 mg/l 2,4-D, 2,0 mg/l BAP, 500 mg/l cefotaksim, 1 mg/l higromicin, pH 5,8

Hranljiva podloga za kokultivaciju odsečaka hipokotila bila je istog sastava kao hranljiva podloga za indukciju izdanaka, sa dodatkom AS u koncentraciji istoj kao i prilikom inokulacije (100 µM), ali niže pH vrednosti (pH 5,2). Svi odsečki su kokultivisani 2 dana, u mraku i na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C. Nakon kokultivacionog perioda višak bakterija sa eksplantata je uklonjen ispiranjem u vodenom rastvoru cefotaksima (1 g/l) (Tolycar<sup>®</sup>, Jugoremedija AD, Zrenjanin, Srbija), a hipokotili su ocedeni na sterilnom filter-papiru i postavljeni na selektivnu hranljivu podlogu koja je pored cefotaksima (500 mg/l) sadržala i higromicin (1 mg/l). Kontrolni odsečki hipokotila su podvrgnuti istoj proceduri, nakon čega je jedan deo kontrolnih (neinokulisanih) odsečaka hipokotila sve vreme gajen na hranljivoj podlozi za indukciju izdanaka bez dodatka antibiotika, a drugi na selektivnoj hranljivoj podlozi.

Procedura za dobijanje transformisanih biljaka *V. cornuta* pomoću "praznog vektora" i vektora kod koga je *Llccs* gen pod kontrolom konstitutivnog promotora, CaMV 35S, dodatno je optimizovana variranjem gustine bakterijske suspenzije i vremena inokulacije eksplantata hipokotila (Slika 7).

Selekcija potencijalno transformisanog biljnog tkiva je započeta na hranljivoj podlozi sa niskom koncentracijom higromicina (1 mg/l), na kojoj su odsečki gajeni 4 nedelje. Zatim je u naredna dva intervala od po 4 nedelje koncentracija cefotaksima postepeno snižavana dok je koncentracija higromicina povećavana, sve do one koncentracije higromicina koja je utvrđena testom osetljivosti netransformisanih eksplantata hipokotila prema higromicinu (2,5 mg/l, odnosno 7,5 mg/l).



**Slika 7.** Procedura za dobijanje transformisanih biljaka *V. cornuta*.

Odsecci hipokotila na kojima se formirao kalus i kod kojih je indukovana regeneracija izdanaka su izdvojeni i gajeni još 4 nedelje na hranljivoj podlozi za indukciju izdanaka sa antibioticima u cilju potpune eliminacije *A. tumefaciens* i selekcije transformisanih izdanaka. Kontrolni i potencijalno transformisani izdanci su izdvojeni, označeni kao zasebne linije i umnoženi na hranljivoj podlozi za multiplikaciju izdanaka bez antibiotika. Odabrane linije su subkultivisane na svežu hranljivu podlogu svake 4 nedelje i gajene u uslovima dugog dana, na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C.



### 3.10. Potvrda uspešnosti genetičke transformacije *V. cornuta*

Uspešnost genetičke transformacije *V. cornuta* najpre je potvrđena histoheimijskim GUS testom (odjeljak 3.10.1.) koji je predstavljao prvi, preliminarni dokaz o transformaciji eksplantata hipokotila. Zatim je PCR metodom (odjeljak 3.10.2.) potvrđeno prisustvo heterolognih gena u genomu *V. cornuta*.

#### 3.10.1. Histoheimijski GUS test

Ekspresija *gus* gena (*uidA*) kod potencijalno transformisanih kalusa i listova mladih izdanaka nakon genetičke transformacije, kao i kod listova transformisanih izdanaka nakon krioprezervacije određivana je histoheimijski, po metodi Jefferson i saradnici (1987). Gen *uidA* kodira enzim  $\beta$ -glukuronidazu, a produkt enzimske reakcije sa komercijalnim supstratom X-Gluc (5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronid) je jedinjenje intenzivno plave boje (ClBr-indigo) koje precipitira odmah po formiranju, što omogućava vizuelno utvrđivanje mesta delovanja enzima.

Komadići kalusa (3x3 mm) i listovi izdanaka (4x5 mm) najpre su 20 min ispirani 90% rastvorom hladnog acetona u bunarićima mikrotitar ploče, a potom su isprani dva puta puferom (0,5 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0,5 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$ , 10 mM  $Na_2EDTA$ , 50 mM  $NaH_2PO_4$ ) bez X-Gluc-a. Nakon toga, u svaki bunarić mikrotitar ploče sa biljnim materijalom dodato je po 200  $\mu$ l reakcionog pufera koji je sadržao X-Gluc (2 mM) i mikrotitar ploča je ostavljena u termostatu na 37 °C 24h.

X-Gluc je u rastvoru nestabilan pa je njegovo rastvaranje u DMSO i dodavanje puferu izvršeno neposredno pred korišćenje. Kako su u pitanju tkiva bogata hlorofilom, izvršeno je i njihovo obezbojavanje ispiranjem u seriji rastućih koncentracija etanola (30%, 70%, 96%).

#### 3.10.2. PCR analiza

Prisustvo heterolognih gena (*Llccs*, *hpt* i *uidA*) u genomu *V. cornuta* potvrđeno je PCR analizom genomske DNK. DNK je izolovana iz kalusa i listova netransformisanih i potencijalno transformisanih biljaka gajenih *in vitro*.

#### Izolacija ukupne genomske DNK

Ukupna genomska DNK izolovana je po metodi Haymes (1996). Oko 25 mg biljnog materijala odabranih linija samleveno je u Ependorf tubici od 1,5 ml pomoću tečnog azota. U digestoru je dodato 400  $\mu$ l ekstrakcionog pufera (2% heksa-decil-3-metil-amonijum-bromid (CTAB) (m/v), 20 mM NaEDTA, 100 mM TRIS-HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 1% PVP (m/v)) kome je neposredno pre upotrebe dodato 0,5%  $\beta$ -merkaptetanola (v:v). Uzorci su vorteksovani 10 sekundi, a potom su inkubirani u vodenom kupatilu 60 minuta na 60 °C. Nakon toga, svakom uzorku je dodato po 400  $\mu$ l smeše hloroform:izoamil alkohola (24:1, v:v) i uzorci su vorteksovani 30 sekundi kako bi se formirala emulzija. Usledilo je centrifugiranje uzoraka 5 minuta na 13 000 rpm, na sobnoj temperaturi. Gornja tečna faza (250-300  $\mu$ l) prebačena je u novu sterilnu Ependorf tubicu zapremine 1,5 ml, a talog je odbačen. Svakom uzorku je dodato po 600  $\mu$ l hladnog apsolutnog etanola. Uzorci su okretani nekoliko puta i ostavljeni 30 minuta na -20 °C. Nakon centrifugiranja uzoraka 10 minuta na 13 000 g na 4 °C, supernatant je odliven vodeći računa da u dnu Ependorf tubice ostane DNK u vidu belog taloga. Svakom uzorku je dodato po 500  $\mu$ l 70% etanola i uzorci su još jednom centrifugirani, 5 minuta na 13 000 g na 4 °C. Ponovo je odliven supernatant i tubice su u laminarnoj komori ostavljene u horizontalnom položaju oko 20 minuta kako bi alkohol koji je preostao ispario. Nakon toga, uzorcima je dodato po 60  $\mu$ l TE pufera (20  $\mu$ l 0,5 M etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) (v/v), 100  $\mu$ l 1 M TRIS (v/v) i 9880  $\mu$ l  $H_2O$  na 10 ml TE pufera) i oni su ostavljeni u frižideru preko noći na +4 °C kako bi se talog rastvorio. Sutradan je svakom uzorku dodat po 1  $\mu$ l RNK-aze (10 mg/ml) i tubice su inkubirane u vodenom kupatilu 1h na 37 °C.

Kvalitet izolovane DNK je proveren elektroforezom na agaroznom gelu, dok je kvantitet određen na spektrofotometru (UV-1800 Shimadzu UV Spektrophotometer), na talasnim dužinama od 260 nm i 280 nm.

Ukupna količina DNK izračunata je prema formuli:

$$[\text{DNK}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 100$$

$A_{260}$  – apsorbanca izmerena na 260 nm

50  $\mu\text{g/ml}$  – koncentracija dvolančane DNK kada je  $A_{260}=1$

100 – faktor razblaženja

### ***Izolacija bakterijske DNK***

U cilju potvrde prisustva gena za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llcs*), higromicin-fosfotransferazu (*hpt*) i  $\beta$ -glukuronidazu (*uidA*), urađena je izolacija bakterijske DNK iz bakterijskih ćelija koje nose različite ekspresione vektore koji su korišćeni za transformaciju, koja će poslužiti kao pozitivna kontrola prilikom PCR analize. U sterilnu Ependorf tubicu od 1,5 ml sipano je 50  $\mu\text{l}$  sterilne dejonizovane  $\text{H}_2\text{O}$  i dodata je jedna bakterijska kolonija zahvaćena ezom sa čvrste YEP hranljive podloge. Tubice su kratko vroteksovane kako bi se bakterije resuspendovale, a potom su kuvane u vodenom kupatilu 15 minuta na 100 °C. Nakon hlađenja na ledu, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 13 000 rpm. Dobijeni supernatant koji je sadržao bakterijsku DNK prebačen je u nove sterilne Ependorf tubice i čuvan na -20 °C do dalje upotrebe.

### ***PCR amplifikacija***

PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) predstavlja reakciju lančanog umnožavanja DNK pri čemu se željena sekvenca umnožava u velikom broju kopija.

Ovoj reakciji podvrgnuti su uzorci genomske DNK netransformisanih i potencijalno transformisanih linija *V. cornuta* regenerisanih u kulturi *in vitro*, kod kojih je prethodno histohemijskim bojenjem potvrđena ekspresija *uidA* gena. Svaka pojedinačna PCR reakcija se odvijala u smeši zapremine 25  $\mu\text{l}$  koja je sadržala komponente prikazane u **Tabeli 12**.

**Tabela 12.** Sastav reakcione smeše za jednu PCR reakciju.

Komponenta	Količina ( $\mu\text{l}$ )
$\text{H}_2\text{O}$	15,50
10 x PCR pufer	2,50
dNTP (10 mM)	1,50
Prajmer F (5 $\mu\text{M}$ )	1,25
Prajmer R (5 $\mu\text{M}$ )	1,25
Taq DNK polimeraza (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,50
DNK (100 ng/ $\mu\text{l}$ )	2,50
Ukupno	25,00

Svi prajmeri su na osnovu pristupnog broja iz NCBI baze podataka dizajnirani u programu Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)), a potom i testirani u istom programu, dok je njihova analiza urađena u programu Net Primer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Korišćeni parovi prajmera u PCR reakcijama prikazani su u **Tabeli 13**.

**Tabela 13.** Prajmeri koji su korišćeni za amplifikaciju segmenata *Llccs*, *hpt* i *uidA* gena.

Gen	GenBank <sup>TM</sup> pristupni broj	Sekvence prajmera	Amplikon (bp)
<i>Llccs</i>	JF304153.1	F: 5' GTCAGATTCCACCCCTCCAA 3' R: 5' AACACTTCTCCTCCTCCAGC 3'	463
<i>hpt</i>	FJ457012.1	F: 5' GATGTTGGCGACCTCGTATT 3' R: 5' GATTGCTGATCCCCATGTGT 3'	238
<i>uidA</i>	A00196.1	F: 5' GTGACAAAAACCACCCAAGC 3' R: 5' CAGCCATGCACACTGATAGT 3'	395

*Llccs* – kapsantin-kapsorubin-sintaza, *hpt* – higromicin-fosfottransferaza, *uidA* –  $\beta$ -glukuronidaza; F – eng. *forward*, R – eng. *reverse*.

#### Uslovi PCR reakcije (*Llccs*, *hpt* i *uidA* gen):

1. Početna denaturacija - 95 °C, 5 min
2. 36 ciklusa:
  - a) Denaturacija - 95 °C, 1 min
  - b) Vezivanje prajmera - 58 °C, 1 min
  - c) Sinteza - 72 °C, 2 min
3. Finalna sinteza - 72 °C, 10 min

Negativnu kontrolu je predstavljala DNK netransformisane biljke *V. cornuta* dok je pozitivnu kontrolu predstavljala bakterijska DNK transformacionog vektora kojim je vršena genetička transformacija. Sve PCR reakcije odvijale su se u peqSTAR 96 Universal Gradient PCR mašini (Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Nemačka) i ponovljene su po tri puta.

### 3.11. Umnožavanje i ožiljavanje transformisanih izdanaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro*

Umnožavanje i ožiljavanje biljaka praćeni su kod netransformisanih biljaka (K), biljaka transformisanih sa "praznim vektorom" - pWBVec10a (*Llccs*-) i biljaka transformisanih sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom (35S-*Llccs*).

Adventivni izdanci regenerisani na netransformisanim i transformisanim eksplantatima hipokotila umnožavani su na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP. Posle 4 nedelje gajenja u uslovima dugog dana, određivani su prosečan broj formiranih aksilarnih izdanaka po biljci, broj nodusa po biljci i prosečna visina biljke. Subkultivacija vrhova izdanaka vršena je svake 4 nedelje.

Netransformisane i transformisane biljke su ožiljavane na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l NAA, u trajanju od 7 nedelja, u uslovima dugog dana. Tada su određivani sledeći parametri: procenat ožiljenih izdanaka, prosečan broj korenova po biljci, dužina najdužeg korena, prosečan broj nodusa po biljci i prosečna visina biljke.

### 3.12. Aklimatizacija transformisanih biljaka *V. cornuta*

Netransformisane i *Llccs*- transformisane biljke *V. cornuta* aklimatizovane su kao što je opisano u odeljku 3.8. 35S-*Llccs* transformisane biljke bile su većinom bez formiranog korenovog sistema, pa je baza stabla bila presecana i uvaljana u smešu talka i NAA (10:1), i tek nakon toga biljke su bile posadene u kontejnere za rasad sa supstratom (Floradur<sup>®</sup> B Pot Medium-Coarse, Floragard Vertriebs-GmbH, Oldenburg, Nemačka). Kada su se biljke aklimatizovale i kada je

korenov sistem bio dobro razvijen, presađivane su u saksije. Aklimatizacija netransformisanih i transformisanih (*Llccs*- i *35S-Llccs*) biljaka vršena je u stakleniku, u periodu od novembra do marta.

### 3.13. Analiza genske ekspresije

Ekspresija *Llccs* gena analizirana je RT-PCR i qPCR metodama. Za ove analize RNK je izolovana iz netransformisanih i transformisanih uzoraka listova i kruničnih listića cvetova aklimatizovanih biljaka *V. cornuta*.

#### 3.13.1. Izolacija RNK

Za izolaciju RNK korišćeni su "*RNase free*" Eppendorf tubice i nastavci (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Svi rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom koja je prethodno tretirana 0,1% dietilpirokarbonatom (DEPC), inhibitorom ribonukleaza. Tučkovi i avani u kojima je vršeno mlevenje biljnog materijala, kao i kadice za elektroforezu, tretirani su 30 minuta 3% vodonik-peroksidom ( $H_2O_2$ ). Avani i tučkovi, kao i svi finalni rastvori sterilisani su u autoklavu na 114 °C u trajanju od 25 minuta.

Iz listova (140-180 mg) netransformisanih i transformisanih biljaka aklimatizovanih u stakleniku izolovana je RNK po modifikovanoj metodi Gašić i saradnika (2004). Uzorci listova su samleveni u avanima pomoću tečnog azota, u laminaru. Svakom uzorku je dodato po 650 µl ekstrakcionog pufera (2% CTAB (m/v), 2% PVP K-30 (m/v), 100 mM TRIS-HCl pH 8, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,5 g/l spermidina). Sadržaj je prebačen u tubice od 1,5 ml i držan na ledu. U digestoru je, u svaku tubicu dodato po 14 µl 2% β-merkaptioetanol za uklanjanje proteina. Sadržaj u tubicama je mešan na vorteksu dvadesetak sekundi, a potom inkubiran 15 minuta u vodenom kupatilu zagrejanom na 60 °C. Uzorcima je dodato po 650 µl smeše hloroform:izoamil alkohola (24:1; v:v), sadržaj je opet mešan na vorteksu dvadesetak sekundi, a zatim centrifugiran 10 minuta na 10 000 x g na 4 °C. Dobijeni supernatant prebačen je u nove tubice od 1,5 ml. Ekstrakcija je ponovljena dodavanjem 600 µl smeše hloroform:izoamil alkohola, mešanjem sadržaja na vorteksu i centrifugiranjem 10 minuta na 10 000 x g na 4 °C. Oko 500 µl supernatanta je prebačeno u novi set tubica od 1,5 ml. Svakom uzorku je dodato po 166 µl 7,5 M LiCl, sadržaj u tubicama je promešan i ostavljen u frižideru preko noći na +4 °C. Sutradan su uzorci centrifugirani 45 minuta na 12 000 x g na 4 °C, nakon čega je supernatant pažljivo odliven vodeći računa da talog ne sklizne. Preostali supernatant je na kratko oboren u centrifugi i izvučen pipetom. U svaku tubicu dodat je po 1 ml 70% DEPC etanola. Tubice su centrifugirane 10 minuta na 12 000 x g na 4 °C, supernatant je odliven, a talog u tubicama je ostavljen da se osuši 5 minuta u laminarnoj komori. Talog je potom resuspendovan u 100 µl DEPC vode i posle dodavanja po 10 µl (1/10 V) DEPC Na-acetata pH 5,5 i 275 µl (2,5 V) 70% DEPC etanola uzorci su ostavljeni 1h na -80 °C, u cilju precipitacije RNK. Nakon toga, tubice su centrifugirane 45 minuta na 12 000 x g na 4 °C, supernatant je odliven, a preostali supernatant oboren u centrifugi je izvučen pipetom. Ponovo je svakom uzorku dodat po 1 ml 70% DEPC etanola i sadržaj je centrifugiran 10 minuta na 12 000 x g na 4 °C. Supernatant je odliven, a ostatak etanola izvučen pipetom i tubice su ostavljene da se suše u laminarnoj komori 10 minuta. Svaki uzorak RNK je rastvoren u 50 µl DEPC vode. Kako bi se RNK u potpunosti rastvorila, uzorci su držani 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim čuvani na -80 °C do dalje upotrebe.

Iz kruničnih listića cvetova (140-200 mg) netransformisanih i transformisanih biljaka *V. cornuta* aklimatizovanih u stakleniku, RNK je izolovana pomoću *Trizol* reagensa napravljenog po recepturi proizvođača (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Zamrznuti uzorci svežeg tkiva cvetova samleveni su u avanu pomoću tečnog azota i dodato im je po 1 ml *Trizol* reagensa (0,8 M guanidintiocijanat, 0,4 M amonijum-tiocijanat, 0,1 M Na-acetat pH 5, 5% glicerol, 38% fenol u TRIS-HCl pH 8 u DEPC  $H_2O$ ). Sadržaj je pipetom prebačen u Eppendorf tubice od 1,5 ml, a potom inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do disocijacije nukleoproteinskog kompleksa. Svakom uzorku je dodato po 200 µl smeše hloroform:izoamil alkohola (24:1), sadržaj je vorteksovan 15

sekundi i ostavljen 3 minuta na sobnoj temperaturi. Tubice su potom centrifugirane 10 minuta na 12 000 x g na 23 °C. Za to vreme je u novi set Ependorf tubica od 1,5 ml dodato po 250 µl izopropil-alkohola i po 250 µl RNAPS (eng. *RNA Precipitation Solution*) (0,4 M NaCl, 0,8 M Na<sub>3</sub>-citrat x 2H<sub>2</sub>O, 0,8 M konc. HCl u DEPC H<sub>2</sub>O). Nakon centrifugiranja, gornja faza supernatanta koja sadrži RNK prebačena je u novi set tubica, dok je donja faza gde su DNK i proteini odbačena. Sadržaj tubica je vorteksovan 5 sekundi, a zatim inkubiran na -20 °C u trajanju od 30 minuta. Tubice su nakon toga centrifugirane 10 minuta na 12 000 x g na 23 °C. Supernatant je odliven rukom vodeći računa da talog ne sklizne, dok je preostali supernatant nakon kratkog centrifugiranja pokupljen pipetom. Svakom uzorku je dodato po 1 ml 75% DEPC etanola i oni su ostavljeni u zamrzivaču na -20 °C preko noći. Sutradan su tubice centrifugirane 5 minuta na 7 500 x g na 4 °C, supernatant je odliven, a RNK je rastvorena u 20 µl vode za injekcije. Uzorci su čuvani na -80 °C do dalje upotrebe.

Koncentracija RNK iz listova i kruničnih listića cvetova netransformisanih i transformisanih biljaka određena je na spektrofotometru NanoDrop (NanoPhotometer<sup>®</sup> N60, IMPLEN, Minhen, Nemačka). U NanoDrop je stavljano po 2 µl uzorka, a kao blank korišćena je voda u kojoj je RNK rastvorena. Apsorbanca je merena na 260 nm i kvantifikovana u jedinicama µg/µl. Odnos 260/280 nm je služio kao parametar čistoće izolovane RNK, koji za RNK treba da iznosi oko 2. Kvalitet izolovane RNK dodatno je verifikovan i elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu u 1xTBE puferu sa 0,5 µg/µl Et-Br, pri konstantnom naponu od 80 V (odeljak 3.13.2.4.).

### 3.13.2. RT-PCR

Za RT-PCR analizu uzorci RNK su najpre bili podvrgnuti tretmanu DNazom, a potom i reakciji reverzne transkripcije. PCR analiza je urađena pomoću specifičnih prajmera za *Llccs* čija je ekspresija vizuelizovana na agaroznom gelu putem elektroforeze.

#### *Tretman DNazom*

Da bi se eliminisala eventualno zaostala genomska DNK iz uzoraka RNK, urađen je tretman DNazom. On je vršen u reakcionoj smeši zapremine 9 µl (**Tabela 14**) koja je inkubirana 30 minuta na 37 °C, a nakon toga svakom uzorku je dodat po 1 µl 25 mM EDTA kako bi se inaktivirala DNaza. Inkubacije su obavljene u PCR mašini (Applied Biosystems).

**Tabela 14.** Sastav reakcione smeše za uklanjanje genomske DNK iz uzoraka RNK.

Komponenta	Količina (µl)
RNK (1 µg) + voda	6,75
10 x reakcioni pufer za DNKazu I (Fermentas)	1,00
DNK-aza I (1U/µl)	1,00
Inhibitor RNK-aza (20 U/µl) (Applied biosystems)	0,25
Ukupno	9,00

#### *Reverzna transkripcija (RT)*

Za reverznu transkripciju RNK u jednolančanu DNK (cDNK) korišćen je GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems). Za jednu reakciju korišćeno je 0,5 µg RNK, a sastav reakcione smeše prikazan je u **Tabeli 15**.

Reakcija reverzne transkripcije (RT) se odvijala u PCR mašini (Applied Biosystems) pod sledećim uslovima:

1. 25 °C, 10 min
2. 37 °C, 30 min
3. 95 °C, 5 min

**Tabela 15.** Sastav reakcione smeše za jednu reakciju reverzne transkripcije.

Komponenta	Količina (μl)
RNK iz prethodnog koraka (0,5 μg/5 μl)	5,0
10 x PCR pufer II	1,0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,0
10 mM dNTPs	1,0
Inhibitor RNK-aza (20 U/μl)	0,5
MuLV Reverzna transkriptaza (50 U/μl)	0,5
Random heksameri (50 μM)	0,5
Ukupno	10,5

### *PCR amplifikacija*

PCR reakcijom umnožena je cDNK koja je dobijena reverznom transkripcijom. Reakcione smeše su bile zapremine 25 μl, a njihov sastav predstavljen je u **Tabeli 16**. Par prajmera koji je korišćen u ovoj PCR reakciji predstavljen je u **Tabeli 17**.

**Tabela 16.** Sastav reakcione smeše za amplifikaciju cDNK dobijenu procesom RT.

Komponenta	Količina (μl)
H <sub>2</sub> O	16,00
10 x PCR pufer	2,50
dNTP (10 mM)	1,50
Prajmer F (5 μM)	1,25
Prajmer R (5 μM)	1,25
Taq DNK polimeraza (5 U/μl)	0,50
cDNK (100 ng/μl)	2,00
Ukupno	25,00

### *Vizuelizacija putem elektroforeze na agaroznom gelu*

Elektroforeza DNK, RNK i PCR produkata vršena je prema proceduri Sambrook i saradnici (1989) u 1,5% agaroznom gelu i u 1xTBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA; pH 8) sa 0,5 μg/ml etidijum-bromida (Et-Br), pri naponu od 85-90 V (aparatus za horizontalnu elektroforezu Blue Marine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Gelovi su fotografisani pod UV svetlom na transiluminatoru (UltraLumInc, Gel Explorer, Exton, PA).

### 3.13.3. Kvantitativni PCR (qPCR)

Da bi se odredio nivo ekspresije gena za kapsantin-kapsorubin-sintazu u transformisanim uzorcima (35S-*Llccs*) kruničnih listića cvetova *V. cornuta* pomoću metode kvantitativnog PCR (qPCR), ekstrahovna je amplifikovana cDNK iz agaroznog gela i napravljeni su standardi za apsolutnu kvantifikaciju *Llccs* gena.

#### Ekstrakcija produkta PCR amplifikacije iz agaroznog gela

Amplifikovani fragmenti cDNK ekstrahovani su iz agaroznog gela pomoću GeneJET Gel Extraction Kit-a (Thermo Scientific) po uputstvu proizvođača. Trake na agaroznom gelu koje su bile vidljive pod UV svetlom, izolovane su sa gela pomoću sterilnog skalpela i prebačene u Ependorf tubicu od 1,5 ml poznate mase. U Ependorf tubicu je dodat vezujući pufer (eng. *Binding Buffer*) u odnosu 1:1 (v:m), nakon čega je usledilo inkubiranje u vodenom kupatilu na 60 °C u trajanju od 10 minuta, sve dok se gel u potpunosti nije rastvorio. Zatim je u tubicu dodat 100% izopropanol, u zapremini koja odgovara masi gela (v:m). Tubica je par puta okretana kako bi se sadržaj izmešao, a potom je 800 µl rastvorenog gela prebačeno u kolonu za filtraciju PCR produkta amplifikacije (*Gene JET purification column*). Kolona je centrifugirana 1 minut na 12 000 x g na sobnoj temperaturi, a dobijeni filtrat odstranjen. U kolonu je zatim dodato 700 µl pufera za ispiranje (eng. *Wash Buffer*), ona je centrifugirana 1 minut na 12 000 x g, a filtrat je odstranjen. Prazna kolona je centrifugirana još jednom 1 minut na 12 000 x g kako bi se u potpunosti uklonio pufer za ispiranje u prečišćenoj DNK, jer etanol može da inhibira enzimske reakcije. Kolona je potom prebačena u novu sterilnu Ependorf tubicu od 1,5 ml i na centar membrane kolone je sipano 50 µl elucionog pufera (eng. *Elution Buffer*). Kolona je centrifugirana 1 minut na 12 000 x g i odbačena, a u tubici je ostala prečišćena DNK.

Na spektrofotometru (NanoDrop N60) je određena koncentracija DNK (ng/µl) na talasnoj dužini od 260 nm. Uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe. Broj kopija DNK molekula po µl izračunat je u programu <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php> i napravljena je serija razblaženja cDNK ( $10^9 - 10^2$  kopija/µl). Za qPCR reakciju uzimano je po 1 µl standarda.

#### Standardi za apsolutnu kvantifikaciju ekspresije *Llccs* gena

Za pripremu standarda odabrana je cDNK 3 uzorka transformisanih biljaka, koja je dobijena u reakciji reverzne transkripcije. Komplementarna DNK je amplifikovana PCR metodom uz korišćenje specifičnih prajmera prikazanih u **Tabeli 17**.

**Tabela 17.** Prajmeri korišćeni za qPCR analizu.

Gen	GenBank <sup>TM</sup> pristupni broj	Sekvence prajmera	Amplikon (bp)
<i>Llccs</i>	JF304153.1	F: 5' GTACGACAGACCGAGAAACC 3' R: 5' TTGGAATAGCAGCGTTGTGA 3'	164

*Llccs* – kapsantin-kapsorubin-sintaza; F – eng. *forward*, R – eng. *reverse*.

U **Tabeli 18** prikazan je sastav pojedinačne PCR reakcione smeše.

**Tabela 18.** Sastav reakcione smeše za jednu PCR reakciju.

Komponenta	Količina (μl)
Red Taq Master Mix	10,0
cDNK (100 ng/μl)	1,0
H <sub>2</sub> O	8,0
Prajmeri F+R (7,5 μM svaki)	1,0
Ukupno	20,0

PCR reakcija se odvijala u PCR mašini (Applied Biosystems).

Uslovi PCR reakcije (*Llccs*):

1. Početna denaturacija - 95 °C, 10 min
2. 40 ciklusa:
  - a) Denaturacija - 95 °C, 30 sec
  - b) Vezivanje prajmera - 56 °C, 30 sec
  - c) Sinteza - 72 °C, 30 sec
3. Finalna sinteza - 72 °C, 10 min

Razdvajanje amplifikovanih fragmenata putem elektroforeze izvršeno je prema opisanom protokolu „*Vizuelizacija putem elektroforeze na agaroznom gelu*” u odeljku 3.13.2.

### qPCR reakcija

Nivo ekspresije *Llccs* gena u kruničnim listićima cvetova i listovima transformisanih biljaka određen je metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR). cDNK dobijena reverznom transkripcijom korišćena je u qPCR reakciji zapremne 10 μl, čiji je sastav prikazan u **Tabeli 19**. Za qPCR reakciju korišćen je isti par prajmera kao i za reakciju RT-PCR (**Tabela 17**). Korišćen je EvaGreen 5x master mix koji u svom sastavu ima sve potrebne komponente za qPCR reakciju osim ROX-a kao internog standarda.

**Tabela 19.** Sastav reakcione smeše za jednu qPCR reakciju.

Komponenta	Količina (μl)
EvaGreen 5x	2,0
Prajmeri F+R (7,5 μM svaki)	0,4
H <sub>2</sub> O	6,6
cDNK/Standard (50 ng/μl)	1,0
Ukupno	10,0

Svi uzorci su nanošeni u triplikatu na ploču, a reakcije qPCR-a su se odvijale u mašini QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



Uslovi qPCR reakcije:

1. Početna denaturacija - 95 °C, 10 min
2. 40 ciklusa:
  - a) Denaturacija - 95 °C, 30 sec
  - b) Vezivanje prajmera - 56 °C, 30 sec
  - c) Sinteza - 72 °C, 30 sec
3. Finalna sinteza - 72 °C, 10 min

Ct vrednost (*threshold cycle*) predstavlja broj ciklusa u kojima je fluorescencija uzoraka dostizala prag detekcije (*threshold*), iznad "fluorescentnog šuma" koji je poticao od nespecifične fluorescencije. Ct vrednost je određivana kompjuterski, a po potrebi podešavana manuelno. Standardna kriva pokazuje zavisnost Ct vrednosti od logaritamskog broja kopija matrice u standardnim razblaženjima i u qPCR reakciji je korišćena za izračunavanje broja kopija transkripata u analiziranim uzorcima. Kao referentni gen korišćen je gen za 18S rRNK, amplifikovan specifičnim prajmerima: „*forward*” 5'-TGACGGAGAATTAGGGTTCG-3' i „*reverse*” 5'-CAATGGATCCTCGTTAAGGG -3' (GenBank pristupni broj X67238.1). Svi uzorci su nanošeni na ploču po tri puta. Rađena je apsolutna kvantifikacija.

### **3.14. Analiza akumulacije karotenoida u biljnom tkivu *V. cornuta***

Nakon potvrđene integracije *Llccs* gena u genomu *V. cornuta* i njegove ekspresije u kruničnim listićima cvetova, pravljenjem "squash" preparata vizuelizovana je akumulacija novosintetisanog pigmenta u ćelijama kalusnog tkiva i epidermalnim ćelijama kruničnih listića cvetova (odjeljak 3.14.1.). Pomoću kolorimetra su određene vrednosti boje kruničnih listića cvetova netransformisanih i transformisanih biljaka i izražene u koordinatnom sistemu boja (odjeljak 3.14.2.), dok je HPLC metodom identifikovan i kvantifikovan novosintetisani crveni pigment (odjeljak 3.14.3.).

#### **3.14.1. Detekcija novosintetisanog pigmenta**

Akumulacija pigmenata u hromoplastima biljnih ćelija, praćena je u netransformisanim i transformisanim ćelijama kalusnog tkiva tokom gajenja u kulturi *in vitro*, kao i u ćelijama kruničnih listića cvetova netransformisanih i transformisanih aklimatizovanih biljaka.

Mikroskopski preparati su pravljani "squash" tehnikom sa svežim biljnim materijalom, tako što je na predmetno staklo u kap glicerola stavljen komadić biljnog tkiva. Pomoću žileta pravljani su poprečni i uzdužni preseki stabla, listova i kruničnih listića cvetova kao i preseki kalusa. Lepljivom trakom su odavajane površinske ćelije kruničnih listića a svi preparati su zatim prekriveni pokrovnim staklom uz blago pritiskanje. Svi preparati su analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa Nikon Eclipse E100 i fotografisani kamerom MikroCam SP 5.1 Bresser.

#### **3.14.2. Određivanje promene hromatičnosti pomoću CIE L\*a\*b\* koordinatnog sistema**

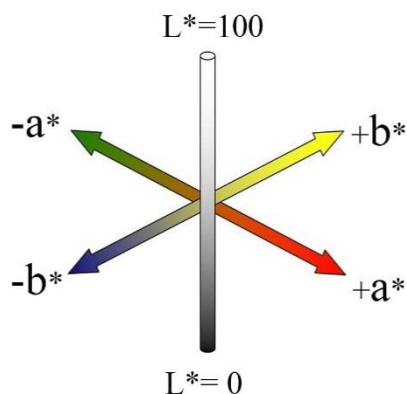
Boja kruničnih listića cvetova, netransformisanih i transformisanih aklimatizovanih biljaka merena je pomoću kolorimetra (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta Co. Ltd. Japan). Merenje je izvršeno na uzorku od 9-13 biljaka i ponovljeno je dva puta. Boja je izražena numerički, direktnim očitavanjem vrednosti u koordinatnom sistemu boja CIE L\*a\*b\* (**Slika 8**).

Osa L\* (eng. *lightness*) - 100 = bela boja, 0 = crna boja

Osa a\* - negativne vrednosti = zelena boja, pozitivne vrednosti = crvena boja

Osa b\* - negativne vrednosti = plava boja, pozitivne vrednosti = žuta boja

Na osnovu ovih parametara pomoću x,y dijagrama hromatičnosti određeni su hromatičnost, tj. čistoća boje (eng. *chroma* - C\*) i nijansa boje (eng. *hue* - h\*) latica, odnosno kruničnih listića cvetova.



**Slika 8.** CIE L\*a\*b\* koordinatni sistem (preuzeto iz Liew i sar., 2008 i modifikovano).

### 3.14.3. HPLC analiza karotenoidnih pigmenata

Identifikacija i kvantifikacija karotenoidnih pigmenata urađena je metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC). Karotenoidi su ekstrahovani iz 1 g svežih cvetova (kruničnih listića) netransformisanih i transformisanih aklimatizovanih biljaka po modifikovanoj metodi Lee i saradnici (2001). Uzorci su pomoću tečnog azota mehanički samleveni u avanu, a zatim prebačeni u flakon od 50 ml sa 20 ml ekstrakcionog pufera koji je predstavljao smešu heksana, acetona i 96% etanola (50:25:25, v:v:v). Uzorci su okretani više puta tokom inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi, a potom je svakom uzorku dodato po 10 ml 50 mM TRIS-HCl pH 8 sa 1 M NaCl nakon čega su uzorci ponovo okretani više puta u narednih 15 minuta. Gornja faza je pokupljena i prebačena u novu staklenu epruvetu, a donja faza je reekstrahovana dodavanjem 15 ml rastvora heksan:aceton:96% etanol. Dobijeni ekstrakt svakog uzorka (heksanska faza) je podeljen na dva jednaka dela. Polovina ekstrakta karotenoida je odmah bila uparena pod pritiskom komprimovanog azota (Messer, Messer Tehnogas AD), dok je drugoj polovini dodato 2 ml dietil-etra i 2 ml 10% KOH u MeOH rastvoru i ona je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi u cilju saponifikacije uzoraka. Sutradan je saponifikovanim uzorcima dodato po 2 ml dietil-etra i 5 ml dejonizovane H<sub>2</sub>O, a formirani gornji sloj je pokupljen, prebačen u novu staklenu epruvetu i uparen pod pritiskom azota do suvog. Svim uzorcima, nesaponifikovanim i saponifikovanim, dodato je po 2 ml apsolutnog etanola, a kako bi se talog karotenoida što bolje rastvorio u etanolu, uzorci su inkubirani 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu (Sonorex, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Nemačka). Ceo proces ekstrakcije karotenoida odvijao se u prostoriji slabije osvetljenosti, a flakoni i epruvete sa rastvorima karotenoida su bili dodatno zaštićeni uvijanjem u aluminijumsku foliju kako ne bi došlo do izomerizacije karotenoida pod uticajem svetlosti. Rastvori karotenoida su profiltrirani kroz 0,45 μm politetrafluoroetilenski (PTFE) filter i injektovani u HPLC vajele od 1,5 ml pre stavljanja u UHPLC (Dionex, UltiMate 3000, RS Diode Array Detector).

Za razdvajanje pigmenata je korišćena C18 kolona. Mobilnu fazu su činili voda sa 0,1% mravljom kiselinom (HCOOH) (A) i acetonitril (CH<sub>3</sub>CN) (B). Injekciona zapremina uzorka je bila 10 μl dok je za dobijanje odgovarajućeg gradijenta korišćena sledeća metoda: 0 min 60% B, 7,5 min 80% B, 9 min 100% B, 12 min 80% B i 15 min 60% B. UV apsorpcija je praćena na 480 nm.

Pomoću standarda kapsantina (Extrasynthese, Lyon, Francuska) napravljena je serija razblaženja za standardnu krivu i na osnovu dobijenih pikova na hromatogramima urađena je kvantifikacija uzoraka.

### 3.15. Analiza fenotipskih karakteristika transformisanih biljaka *V. cornuta*

Kako bi se utvrdilo da li između netransformisanih i transformisanih biljaka postoje morfološke i fenotipske razlike, praćeni su sledeći parametri:

- ❖ Dužina stabla
- ❖ Broj nodusa na glavnom izdanku
- ❖ Prečnik stabla
- ❖ Broj novoformiranih bočnih izdanaka
- ❖ Dužina lista
- ❖ Širina lista
- ❖ Broj potpuno otvorenih cvetova po biljci
- ❖ Broj cvetnih pupoljaka po biljci
- ❖ Širina cveta
- ❖ Dužina cveta

Prečnik stabla i parametri veličine listova mereni su u visini 5. nodusa, počev od vrha biljke. Karakteristike su praćene na uzorku od 10 biljaka aklimatizovanih u stakleniku, a merenje je izvršeno u proleće, kada su sve biljke bile u fazi cvetanja.

### 3.16. Krioprezervacija vrhova izdanaka *V. cornuta*

Za krioprezervaciju su korišćeni vrhovi izdanaka netransformisanih (K) i transformisanih biljaka (*Llccs*- 7 linija i 35S-*Llccs* 5 linija) *V. cornuta*.

Kao početni materijal su korišćeni nodalni segmenti stabla koji su gajeni 3 nedelje na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP kako bi se formirali aksilarni pupoljci. Formirani aksilarni pupoljci (2 cm) su dalje gajeni 2 nedelje u standardnim uslovima (24 °C) ili na 4 °C kao prekultura pre krioprezervacije. Krioprezervacija vrhova izdanaka obavljena je metodom vitrifikacije pomoću PVS2 (30% glicerol, 15% etilen glikol, 15% DMSO i 0,4 M saharoza u MS mineralnom rastvoru) i PVS3 rastvora (50% saharoza, 50% glicerol) kao i vitrifikacije pomoću krio pločica.

Ispitano je nekoliko parametara da bi se postigao efikasan protokol za krioprezervaciju vrhova netransformisanih i transformisanih izdanaka *V. cornuta*:

- \* Citotoksičnost PVS2 i PVS3 rastvora na vrhove izdanaka netransformisanih i *Llccs*-transformisanih linija.
- \* Uticaj hladnog pretretmana na preživljavanje i oporavak netransformisanih linija.
- \* Uticaj dužine izlaganja PVS3 rastvoru na preživljavanje i oporavak *Llccs*-transformisanih linija.
- \* Uticaj koncentracije saharoze u pripremnom rastvoru (0-1,6 M) na preživljavanje i oporavak *Llccs*- transformisanih linija.
- \* Upoređena je efikasnost metode vitrifikacije sa PVS3 rastvorom sa i bez krio pločica na krioprezervaciju vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih linija *V. cornuta*, *Llccs*- i 35S-*Llccs*.

Vrhovi izdanaka (2-3 mm) gajeni su jedan dan na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,3 M saharozom pre izlaganja osmoprotektantima. Zatim su potapani u 1 ml pripremnog rastvora (0,4 M saharoza i 2 M glicerol) sipanog u kriovajle u trajanju od 30 min. Posle 30 minuta, pripremi rastvor zamenjen je sa 1,8 ml PVS2 ili PVS3 rastvora. Osmotska dehidracija tkiva je rađena pomoću PVS2 rastvora u trajanju od 25 minuta ili PVS3 u trajanju od 30, 45 i 60 minuta. Zatim su kriovajle zatvarane i potapane u tečni azot u trajanju od jednog sata do 6 meseci.

Za tehniku vitrifikacije sa aluminijumskim pločicama (*V cryo plate*) vrhovi izdanaka su prvo ispirani u tečnoj MS podlozi bez  $\text{CaCl}_2$ , a zatim postavljeni na pločice gde je ostavljena kap 3% Na-alginata (10 vrhova po pločici), a zatim su svi vrhovi preliveni Na-alginatom. Pločice sa vrhovima prelivane su sa tečnom MS podlogom koja je sadržala 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . Posle 15 min krio pločice su potapane u PVS3 rastvor u trajanju od 45 min. Posle ovog perioda kriopločice sa vrhovima izdanaka su postavljane u kriovajle napunjene tečnim azotom, zatvarane i potapane u tečni azot.

Otapanje iz tečnog azota je vršeno u vodenom kupatilu na 42 °C (vitrifikacija) ili na sobnoj temperaturi (vitrifikacija sa krio pločicama), u zavisnosti od metode. Posle otapanja kod metode vitrifikacije, prvo je izvučen PVS2 ili PVS3 rastvor iz kriovajle, a zatim su svi vrhovi izdanaka tretirani ½MS rastvorom sa 1,2 M saharozom pre postavljanja na hranljivu podlogu za oporavak. Hranljiva podloga za oporavak je sadržala modifikovanu ½MS podlogu obogaćenu sa 0,1 mg/l BAP. Preživljavanje je određivano posle 7 dana gajenja i predstavljalo je procenat zelenih vrhova izdanaka, a potpuni oporavak je utvrđivan posle 4 nedelje od odmrzavanja iz tečnog azota, kao procenat potpuno razvijenih izdanaka.

### **3.17. Analiza ploidnosti regenerisanih biljaka *V. cornuta***

Za procenu ploidnosti biljaka *in vitro V. cornuta* utvrđivan je broj hromozoma. Za analizu su korišćeni vrhovi korenova dužine 10 mm sakupljeni sa klijanaca i ožiljenih biljaka regenerisanih u kulturi *in vitro* (netransformisanih, transformisanih, kao i transformisanih posle krioprezervacije). Vrhovi korenova su pretretirani sa 2 mM hidrosikinolinom na sobnoj temperaturi u trajanju od 4-5h, a zatim fiksirani u Carnoy rastvoru (etanol:glacijalna sirćetna kiselina, 3:1, v:v) 24h na 4 °C i ostavljeni u 70% etanolu. Dehidratirani korenovi su hidrolizovani u 1 N HCl 15 minuta na 60 °C, a potom držani 10 minuta u 1% aceto-orceinu kako bi se obojili radi lakše vizuelizacije hromozoma. Obojeni vrhovi korenova (1-2 mm) su postavljeni na staklene pločice sa kapljicom 45% sirćetne kiseline i pokriveni pokrovnim staklom. Broj hromozoma je određivan pregledom ćelija sa metafaznim/interfaznim hromozomima pomoću svetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss AxioVision microscope, Zeiss, Nemačka) pri uvećanju od 20x.

### **3.18. Statistička obrada podataka**

Svi podaci su statistički obrađeni u programu STATISTICA 8.0 i prikazani su kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Statistička obrada podataka podrazumevala je jednofaktorijalnu i dvofaktorijalnu analizu varijanse (ANOVA) i poređenje srednjih vrednosti Fišerovim LSD testom (eng. *Least Significant Difference*) na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ . Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je u računarskom programu Microsoft Office Excel.

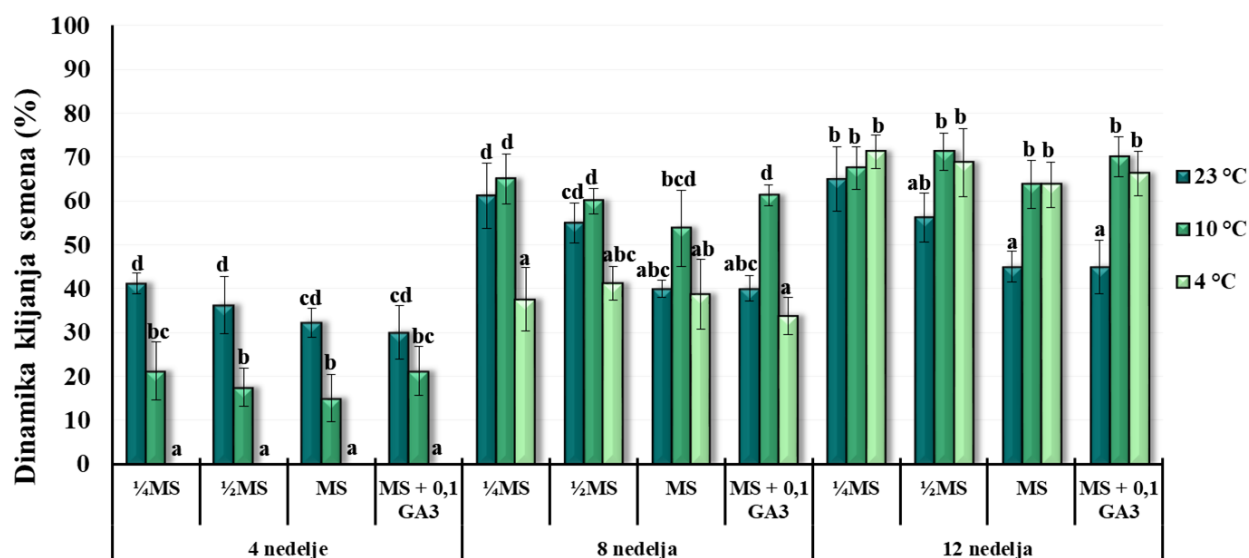
## 4. REZULTATI

### 4.1. Klijanje semena i regeneracija biljaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro*

Ispitivano je klijanje semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' u uslovima *in vitro* (odjeljak 4.1.1.). Regeneracija biljaka putem organogeneze ispitivana je na različitim eksplantatima klijanaca (odjeljak 4.2.), i eksplantatima *in vitro* gajenih biljaka (odjeljak 4.3.).

#### 4.1.1. Klijanje semena

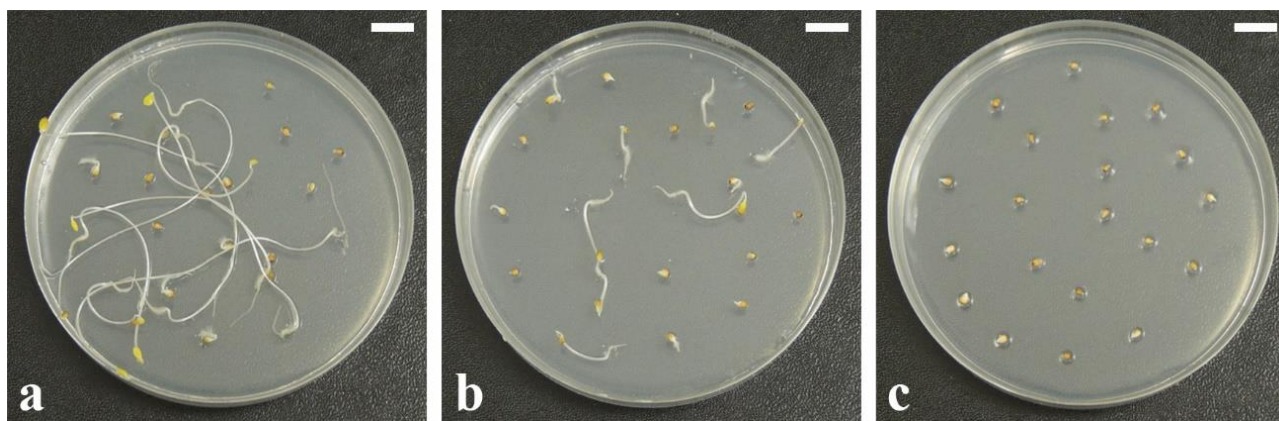
Procenat klijalih semena *V. cornuta* bio je nizak (10%) kada su ona gajena samo na vlažnom filter-papiru. Zbog toga je ispitana dinamika klijanja semena na četiri čvrste MS hranjive podloge ( $\frac{1}{4}$ MS,  $\frac{1}{2}$ MS, MS i MS + 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>) i tri temperature (23, 10 i 4 °C) tokom perioda od 12 nedelja. U intervalu od 4 nedelje zabeležen je broj proklijalih semena (**Histogram 1**).



**Histogram 1.** Klijanje semena *V. cornuta* u kulturi *in vitro*. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova u okviru intervala od 4 nedelje, ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Posle 4 nedelje gajenja na hranljivim podlogama, najviše semena je klijalo pri temperaturi od 23 °C (**Slika 9a**). Procenat iskljalih semena kretao se od 30% do 41,25% u zavisnosti od hranjive podloge i temperature, a bio je značajno veći na višoj temperaturi (23 °C) u odnosu na semena gajena pri nižoj temperaturi – 10 °C (**Slika 9b**). Semena *V. cornuta* gajena 4 nedelje na 4 °C nisu klijala ni na jednoj podlozi (**Slika 9c**).

Posle 8 nedelja gajenja došlo je do povećanja broja proklijalih semena *V. cornuta* na svim podlogama na kojima su gajena i svim temperaturama na kojima su semena gajena. Klijala su i semena koja su gajena na najnižoj temperaturi (4 °C), u procentu od 33,75% do 41,25%. Najveći procenat proklijalih semena ( $\geq 60\%$ ) zabeležen je na podlogama sa razblaženim mineralnim rastvorima ( $\frac{1}{2}$ MS i  $\frac{1}{4}$ MS), kao i na podlozi sa kompletnim MS mineralnim rastvorom uz dodatak GA<sub>3</sub>.



**Slika 9.** Kljanje semena *V. cornuta* na  $\frac{1}{4}$  MS hranljivoj podlozi posle 4 nedelje gajenja. **a** - na 23 °C; **b** - na 10 °C; **c** - na 4 °C. Bar = 10 mm.

Posle 12 nedelja gajenja postignut je najveći procenat klijanja semena koji je iznosio 71,25%. Dvofaktorijalnom analizom ANOVA (uticaj sastava hranljive podloge i temperature), utvrđeno je da temperatura ima značajan uticaj na finalni procenat klijanja posle 12 nedelja gajenja. Samo je kod semena koja su klijala na MS podlozi na 23 °C uočeno sniženje procenta klijalih semena u odnosu na niže temperature. Dinamika klijanja semena *V. cornuta* u kulturi *in vitro* zavisi od temperature.

#### 4.2. Indukcija organogeneze izdanaka na eksplantatima klijanaca *V. cornuta*

Morfogenetski potencijal *V. cornuta* ispitan je korišćenjem tri tipa eksplantata klijanaca (odsečki lista, lisne drške i hipokotila) gajenih na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama sa i bez biljnih regulatora rastenja.

Na eksplantatima klijanaca gajenim na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja nije došlo do formiranja kalusa i izdanaka, već su oni nekrozirali. Prisustvo biljnih regulatora rastenja u podlozi bilo je neophodno za formiranje kalusa i indukciju adventivnih izdanaka (**Tabela 20**).

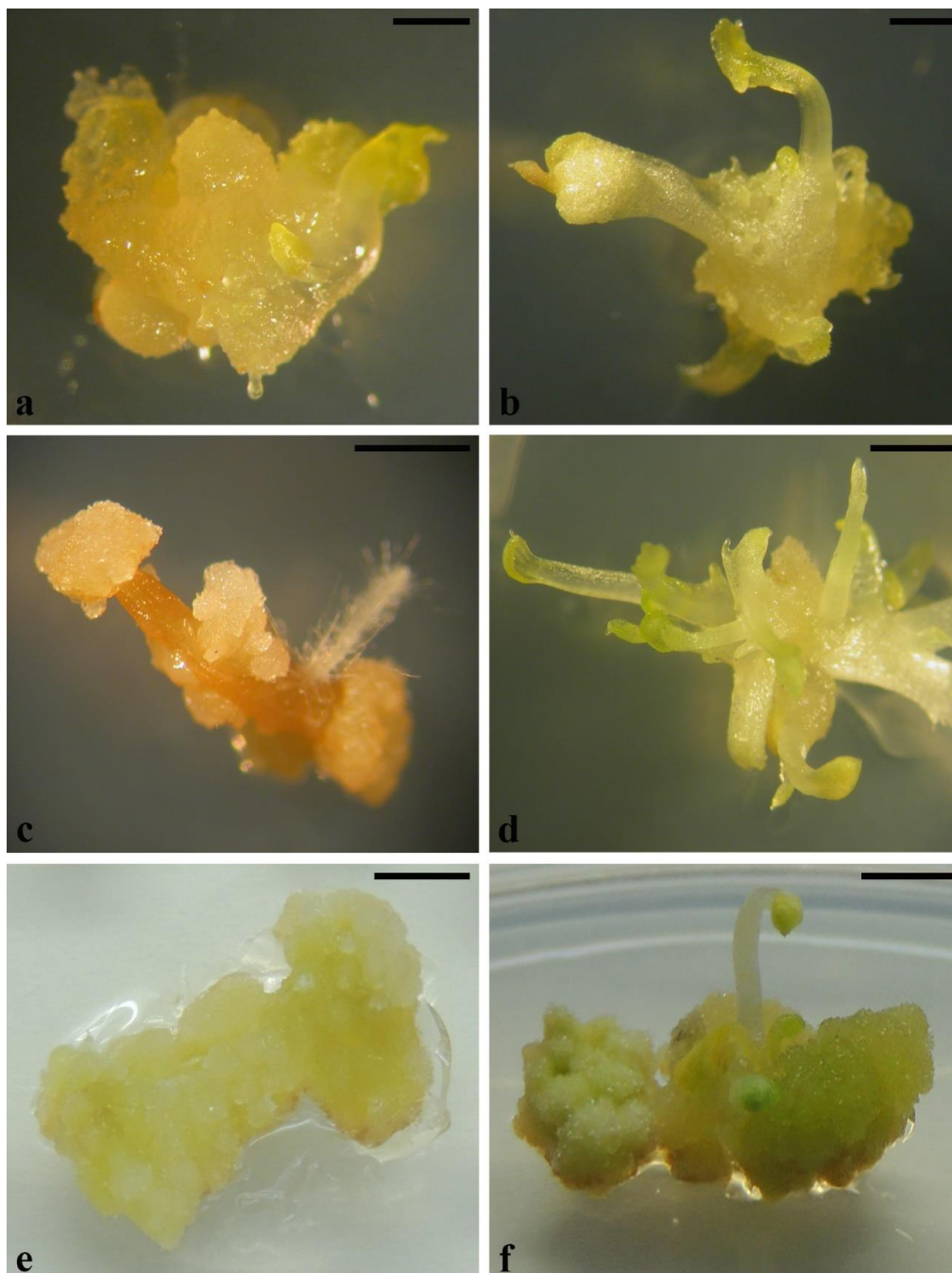
**Tabela 20.** Uticaj hranljive podloge i tipa eksplantata na formiranje kalusa i regeneraciju izdanaka *V. cornuta* nakon 4 nedelje gajenja u mraku, na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C.

Hranljiva podloga*	Tip eksplantata	Eksplantati sa formiranim kalusom (%)	Eksplantati sa izdancima (%)
$\frac{1}{2}$ MS	odsečak lista	$0,00 \pm 0,00^{a**}$	$0,00 \pm 0,00^a$
	odsečak lisne drške	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,00 \pm 0,00^a$
	odsečak hipokotila	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,00 \pm 0,00^a$
$\frac{1}{2}$ MS + 0,1 2,4-D + 2,0 BAP	odsečak lista	$64,25 \pm 1,90^e$	$0,00 \pm 0,00^a$
	odsečak lisne drške	$35,24 \pm 1,14^c$	$12,85 \pm 5,16^b$
	odsečak hipokotila	$97,87 \pm 1,98^f$	$2,01 \pm 1,93^a$
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 TDZ	odsečak lista	$59,17 \pm 1,32^{de}$	$19,32 \pm 0,22^b$
	odsečak lisne drške	$42,97 \pm 1,34^{cd}$	$0,00 \pm 0,00^a$
	odsečak hipokotila	$13,30 \pm 0,12^b$	$0,00 \pm 0,00^a$

\*Koncentracije 2,4-D, BAP i TDZ su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).



Kod sva tri tipa eksplantata, gajenih u mraku na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња, došlo je do formiranja kalusnog tkiva (**Slika 10a, 10c i 10e**). Dvofaktorijalna analiza (ANOVA) je pokazala da su za formiranje kalusa u kulturi *in vitro* *V. cornuta* značajni i sastav hranljive podloge i tip eksplantata, kao i njihova interakcija, dok je za indukciju izdanaka važan samo sastav hranljive podloge. Najveći procenat indukcije izdanaka (19,32%) dobijen je kod eksplantata listova gajenih na podlozi sa TDZ (**Slika 10b**) i kod eksplantata lisnih drški (12,85%) gajenih na podlozi sa 2,4-D i BAP (**Slika 10d**). Kod eksplantata hipokotila gajenih na podlozi sa 2,4-D i BAP gotovo svi eksplantati su formirali kaluse (97,87%), ali je samo sporadično (2,01%) došlo do indukcije izdanaka (**Slika 10f**) iz kalusa.



**Slika 10.** Formiranje kalusa i izdanaka na eksplantatima poreklom od klijanaca *V. cornuta* nakon 4 nedelje gajenja u mraku. **a, b** - formiranje kalusa i izdanaka na odsečcima listova gajenih na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 1,0 mg/l TDZ; **c** - formiranje kalusa na krajevima i središnjem delu odsečka lisne drške gajene na podlozi sa 1,0 mg/l TDZ; **d** - indukcija izdanaka iz odsečka lisne drške na podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP; **e, f** - formiranje kalusa i izdanaka na odsečcima hipokotila gajenim na podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP. Bar = 3 mm.

#### 4.2.1. Uticaj svetlosti na indukciju organogeneze izdanaka na odsečcima hipokotila

Uticaj svetlosti na indukciju organogeneze izdanaka ispitan je na odsečcima hipokotila gajenim na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP, u uslovima dugog dana (16h svetlost/8h mrak) i u konstantnom mraku (**Tabela 21**).

**Tabela 21.** Uticaj svetlosti na formiranje kalusa i indukciju izdanaka *V. cornuta* na odsečcima hipokotila *in vitro* nakon 4 nedelje gajenja.

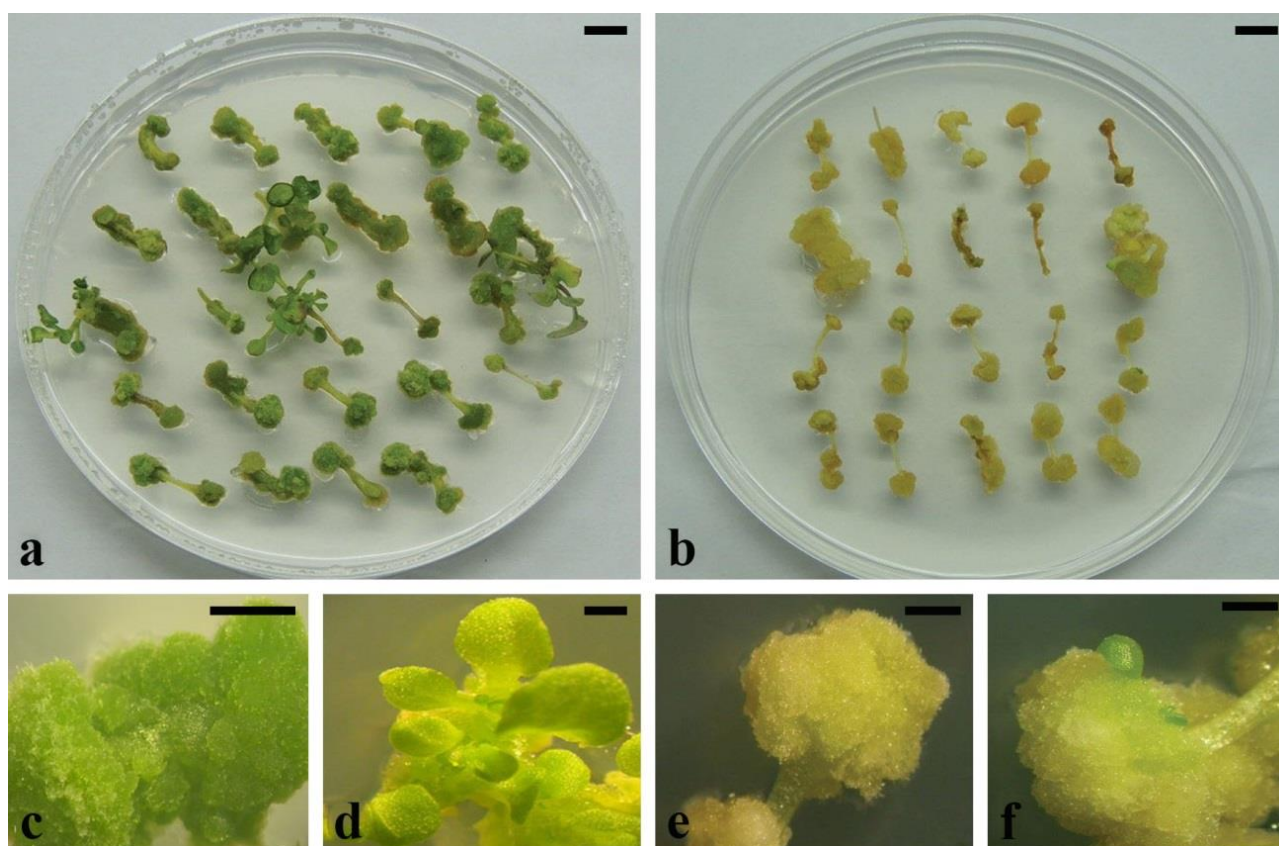
Svetlosni uslovi	Eksplantati sa formiranim kalusom (%)	Eksplantati sa izdancima (%)	Broj izdanaka po eksplantatu
16h svetlost/8h mrak	100 <sup>a</sup>	32,50 ± 3,43 <sup>b*</sup>	4,02 ± 0,50 <sup>b</sup>
24h mrak	100 <sup>a</sup>	10,83 ± 4,79 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,19 <sup>a</sup>

Eksplantati hipokotila su gajeni na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP na temperature od 23 ± 2 °C. \*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Posle 4 nedelje gajenja odsečaka hipokotila u uslovima dugog dana (**Slika 11 a**) i u konstantnom mraku (**Slika 11b**) došlo je do formiranja kalusa kod svih eksplantata (100%). Kalus je bio po tipu kompaktan, ali se razlikovao po boji, u zavisnosti od svetlosnih uslova u kojima su eksplantati gajeni. Najčešće je indukovano na krajevima eksplantata, na mestima povrede tkiva, ali se kod nekih eksplantata formirao i celom dužinom eksplantata hipokotila. U uslovima dugog dana kalus je bio jarko zelene boje (**Slika 11c**) i došlo je do razvoja izdanaka uglavnom na krajevima eksplantata (**Slika 11d**). Kalus formiran na eksplantatima gajenim u uslovima konstantnog mraka bio je svetlo žute boje (**Slika 11e**), a razvoj izdanaka je indukovano na krajevima eksplantata (**Slika 11f**).

Statističkom analizom je pokazano da svetlost ima značajan uticaj na indukciju organogeneze adventivnih izdanaka na odsečcima hipokotila *V. cornuta*. U uslovima dugog dana došlo je do indukcije organogeneze izdanaka kod 32,50% eksplantata (**Slika 11a**), dok je na eksplantatima hipokotila gajenim u uslovima mraka, u istom vremenskom periodu dobijeno tri puta manje (10,83%) formiranih izdanaka (**Slika 11b**). Takođe, prosečan broj izdanaka po eksplantatu hipokotila bio je veći kod eksplantata koji su gajeni u uslovima dugog dana (4,02) u odnosu na eksplantate koji su gajeni sve vreme u mraku (2,69).





**Slika 11.** Uticaj svetlosti na indukciju formiranja kalusa i izdanaka na odsećima hipokotila *V. cornuta* posle 4 nedelje gajenja na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP. **a** - odsećci hipokotila gajeni u uslovima dugog dana; **b** - odsećci hipokotila gajeni 24h u mraku; **c** - kalus formiran na odsečku hipokotila u uslovima dugog dana; **d** - adventivni izdanci formirani u uslovima dugog dana; **e** - formirani kalus na odsečku hipokotila gajenom u mraku; **f** - adventivni izdanci formirani na eksplantatu hipokotila gajenom u mraku. Bar = 5 mm (a, b); bar = 2 mm (c-f).

#### 4.2.2. Uticaj pozicije odsečaka hipokotila na indukciju formiranja izdanaka

Ispitan je uticaj pozicije odsečaka hipokotila na indukciju formiranja izdanaka. Odsećci hipokotila ( $h_1$ -gornji,  $h_2$ -srednji,  $h_3$ -donji) gajeni su na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP. Tokom 8 nedelja u uslovima dugog dana odsećci hipokotila pokazali su različit potencijal za regeneraciju izdanaka (**Tabela 22**).

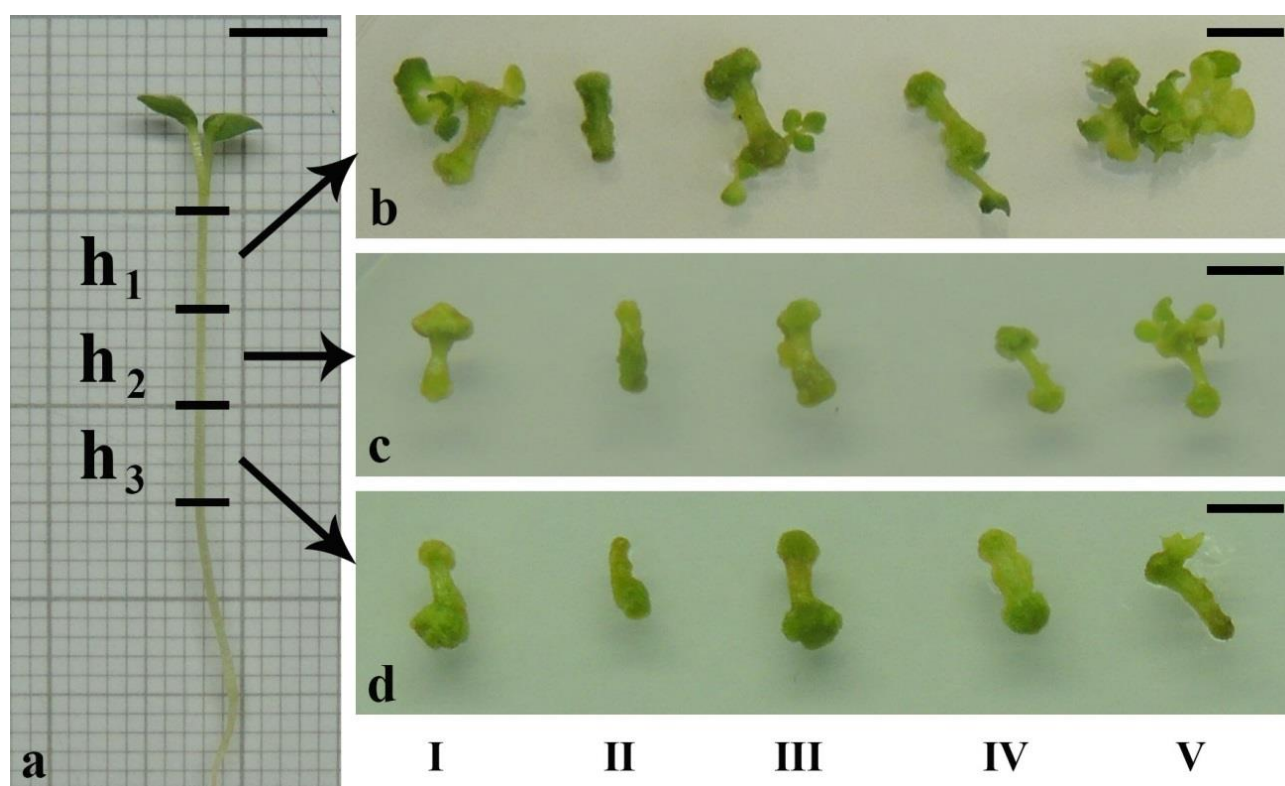
**Tabela 22.** Uticaj pozicije odsečaka hipokotila na regeneraciju izdanaka *V. cornuta*.

Pozicija odsečka na hipokotilu	Eksplantati sa izdancima (%)		Broj izdanaka po eksplantatu	
	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja
$h_1^*$	$45,00 \pm 6,31^{b**}$	$50,00 \pm 6,94^b$	$4,22 \pm 0,49^b$	$6,07 \pm 0,66^b$
$h_2$	$11,67 \pm 3,19^a$	$25,00 \pm 9,95^{ab}$	$2,86 \pm 0,19^a$	$2,93 \pm 0,32^a$
$h_3$	$8,33 \pm 6,31^a$	$8,33 \pm 6,31^a$	$2,00 \pm 0,17^a$	$3,10 \pm 0,27^a$

\*Odsećci hipokotila:  $h_1$ -gornji,  $h_2$ -srednji,  $h_3$ -donji. Eksplantati hipokotila su gajeni na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Gornji odsečak hipokotila ( $h_1$ ) pokazao je značajno veći potencijal za regeneraciju izdanaka u odnosu na srednji ( $h_2$ ) i donji ( $h_3$ ) odsečak hipokotila (**Slika 12a**). Kod gornjeg odsečka, koji je najbliži epikotilu klijanca, kod 45% eksplantata došlo je do formiranja izdanaka posle 4 nedelje gajenja (**Slika 12b**). Srednji (**Slika 12c**) i donji (**Slika 12d**) odsečak hipokotila imali su za 3,85 do 5,40 puta manji potencijal za indukciju organogeneze izdanaka (11,67% odnosno 8,33%) od gornjeg. Takođe, prosečan broj adventivnih izdanaka po eksplantatu kod gornjeg odsečka bio je značajno veći (4,22) u poređenju sa srednjim (2,86) i donjim (2,00) odsečkom hipokotila.

Posle 8 nedelja gajenja kod polovine (50%) gornjih odsečaka hipokotila ( $h_1$ ) došlo je do indukcije adventivnih izdanaka. Kod srednjih odsečaka hipokotila ( $h_2$ ) 25% eksplantata je pokazalo sposobnost za indukciju izdanaka. Kod eksplantata hipokotila koji su najdalji od epikotila ( $h_3$ ) nije došlo do povećanja indukcije izdanaka (8,33%) produženim gajenjem na istoj hranljivoj podlozi. Kada se posmatra prosečan broj formiranih izdanaka po eksplantatu uočava se isti trend. Najveći broj izdanaka po eksplantatu (6,07) formiran je kod gornjeg odsečka hipokotila, dok je taj broj kod srednjeg i donjeg odsečka (2,93 odnosno 3,10) bio značajno manji.



**Slika 12.** Uticaj pozicije odsečka hipokotila na indukciju organogeneze izdanaka *V. cornuta*, na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP. **a** - hipokotil klijanca podeljen na odsečke; **b** - gornji odsečak hipokotila ( $h_1$ ); **c** - srednji odsečak hipokotila ( $h_2$ ); **d** - donji odsečak hipokotila ( $h_3$ ). Rimski brojevi I – V predstavljaju odsečke pet različitih klijanaca. Bar = 5 mm.

Proučavan je i morfogogenetski potencijal različitih delova hipokotila poreklom sa istog klijanca. Gajenjem odsečaka hipokotila različitih klijanaca na podlozi za indukciju izdanaka utvrđeno je da klijanca imaju nejednaki potencijal za regeneraciju izdanaka (**Slika 12**). Kod nekih klijanaca sva tri odsečka su pokazala potencijal za *de novo* organogenezu izdanaka (**Slika 12; V**), dok je kod nekih samo gornji odsečak ( $h_1$ ) imao tu sposobnost (**Slika 12; I, III i IV**). Kod pojedinih klijanaca nijedan od odsečaka hipokotila nije pokazao potencijal za indukciju izdanaka (**Slika 12; II**).

#### 4.2.3. Histoanatomska analiza indukcije organogeneze izdanaka na odsečku hipokotila

Praćena je dinamika formiranja izdanaka tokom prvih 30 dana gajenja eksplantata hipokotila *V. cornuta in vitro*. Histoanatomskom analizom procesa regeneracije uočena su dva načina formiranja izdanaka: putem indirektno i direktno organogeneze *de novo* (**Slika 13**).

Kod eksplantata hipokotila neposredno posle izolacije (**Slika 13a**) na uzdužnom preseku vidljive su epidermalne ćelije, parenhimske ćelije i sprovodni elementi (**Slika 13b**).

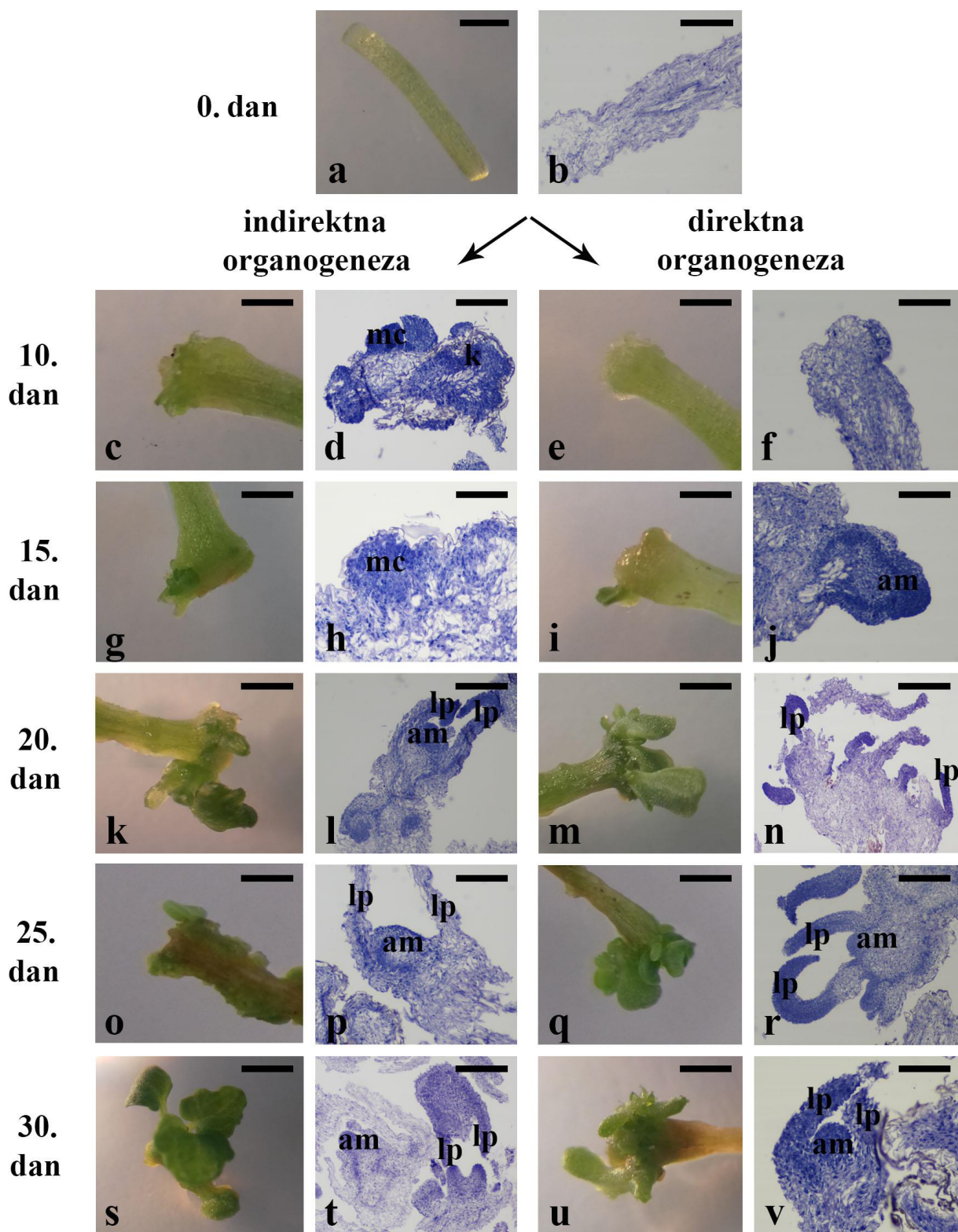
Nakon 10 dana gajenja u kulturi na pojedinim eksplantatima, na mestima preseka i povrede tkiva uočeno je formiranje kalusa (**Slika 13c**). Unutar kalusnog tkiva (k, **Slika 13d**) formirali su se meristemski centri (mc, **Slika 13d**) koji su sačinjeni od ćelija sa izraženim jedrom i citoplazmom. Kod nekih eksplantata (**Slika 13e**) nije bilo vidljivih histoanatomskih promena tokom ovog perioda (**Slika 13f**).

Na eksplantatima na kojima je došlo do formiranja kalusnog tkiva (**Slika 13g**) uočeno je dalje formiranje meristemskih centara sa ćelijama koje odlikuje gusta citoplazma (**Slika 13h**). Na poprečnim presecima pojedinih eksplantata (**Slika 13i**) 15. dana od početka kultivacije je uočeno formiranje apikalnog meristema (am) direktno na eksplantatu, bez formiranja kalusnog tkiva (**Slika 13j**).

Na eksplantatima na kojima je došlo do formiranja kalusa 20. dana gajenja uočeno je formiranje izdanaka (**Slika 13k**) koji se sastoje od apikalnog meristema i lisnih primordija (lp, **Slika 13l**). U isto vreme, na pojedinim eksplantatima gde nije došlo do formiranja kalusnog tkiva (**Slika 13m**) adventivni izdanci koji su se direktno formirali na eksplantatu, nastavili su svoje razviće i bili su jasno diferencirani (**Slika 13n**).

Daljom histoanatomskom analizom eksplantata do 30. dana gajenja pokazano je da pojedini adventivni izdanci (**Slika 13o, 13s**) vode poreklo od ćelija kalusnog tkiva, što ukazuje na proces indirektno organogeneze *de novo* (**Slika 13p, 13t**). Istovremeno, kod pojedinih eksplantata adventivni izdanci su nastajali procesom direktno organogeneze *de novo* (**Slika 13q i 13u**), od epidermalnih ili subepidermalnih ćelija hipokotila (**Slika 13r i 13v**) bez formiranja kalusnog tkiva. Prema tome, histoanatomska analiza je pokazala da se u kulturi hipokotila *V. cornuta*, gajenih na istoj hranljivoj podlozi, proces indukcije i potpune regeneracije izdanaka može odvijati i direktnom i indirektnom organogenezom.





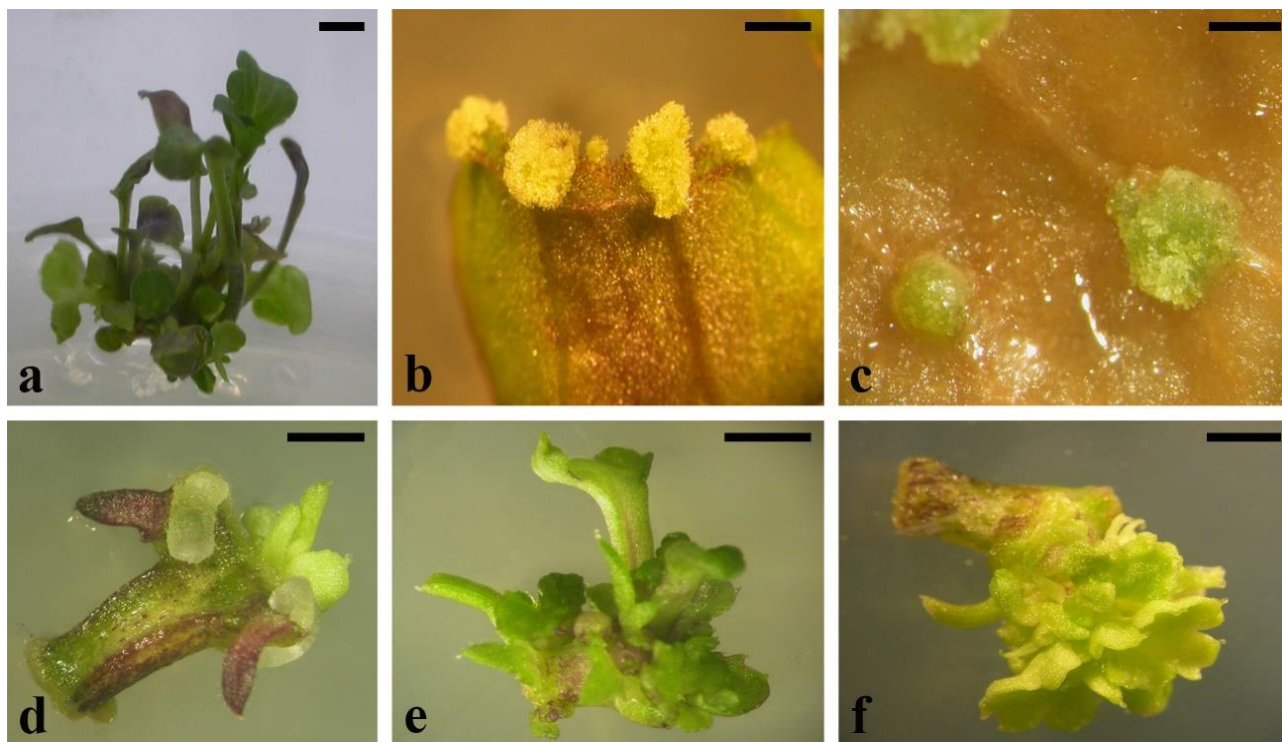
**Slika 13.** Histoanatomska analiza indukcije organogeneze izdanaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro*. **a, b** - eksplantat hipokotila; **c-f** - indukcija kalusa i formiranje meristemskog centra nakon 10 dana gajenja; **g-j** - formiran meristemski centar i apikalni pupoljak nakon 15 dana gajenja; **k-n** - apikalni pupoljci nakon 20 dana gajenja; **o-r** - apikalni pupoljci nakon 25 dana gajenja; **s-v** - apikalni pupoljci nakon 30 dana gajenja. k – kalus; mc – meristemski centar; am – apikalni meristem; lp – lisna primordija. Leva strana slike prikazuje indukciju adventivnih pupoljaka procesom indirektna organogeneze, dok desna strana slike prikazuje indukciju izdanaka procesom direktna organogeneze. Bar = 2 mm (a, b, k, m, o, q); 1 mm (c, e, g, i); 0,2 mm (d, f, h, j, l, n, p, r, t, v); 3 mm (s, u).

### 4.3. Indukcija organogeneze izdanaka na eksplantatima *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta*

Ispitan je uticaj 29 hranljivih podloga na indukciju organogeneze na odsečcima lisne drške i lista poreklom sa *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta*. Praćen je uticaj 4 citokinina (BAP, KIN, TDZ ili CPPU) dodatih u hranljivu podlogu pojedinačno, tj. kao jedini regulatori rasteња u podlozi (odeljak 4.3.1.), kao i uticaj auksina, IAA ili NAA, dodatih u hranljivu podlogu u kombinaciji sa jednim od citokinina, na formiranje kalusa i izdanaka (odeljak 4.3.2.).

#### 4.3.1. Uticaj citokinina na formiranje kalusa i izdanaka

Eksplantati lisnih drški i listova (**Slika 14a**) *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta* gajeni su 4 nedelje na podlogama sa različitim koncentracijama citokinina, gde je došlo do formiranja kalusa i izdanaka u zavisnosti od tipa eksplantata i hranljive podloge (**Tabela 23**). Na eksplantatima listova, kalus je najčešće bio formiran na mestima preseka lista (**Slika 14b**), po obodu lista, kao i duž lisnih nerava (**Slika 14c**). I kod eksplantata lisnih drški kalus je formiran na mestima preseka, odnosno na mestima povrede biljnog tkiva.



**Slika 14.** Indukcija formiranja kalusa i izdanaka na eksplantatima poreklom od *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta*. **a** - izdanci gajeni u kulturi *in vitro*; **b** - kalus formiran na eksplantatu lista okrenutom adaksijalnom stranom ka podlozi (0,1 mg/l TDZ); **c** - kalus formiran na lisnom nervu eksplantata lista koji je okrenut abaksijalnom stranom ka podlozi (0,1 mg/l TDZ); **d** - izdanci formirani na eksplantatu lisne drške gajenom na  $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez regulatora rasteња; **e**, **f** - izdanci formirani na eksplantatu lisne drške gajene na podlozi sa 0,5 mg/l CPPU (**e**) i 0,5 mg/l IAA i 1,0 mg/l CPPU (**f**). Bar = 5 mm (a); 2 mm (b, c); 3 mm (d-f).

Sastav hranljive podloge, tip eksplantata kao i interakcija podloge i tipa eksplantata su značajni faktori za formiranje kalusa na hranljivim podlogama sa citokinima kao jednim regulatorima rasteња u podlozi (**Tabela 26**). Najveći procenat eksplantata na kojima se formirao kalus bio je na podlogama sa TDZ, kod oba tipa eksplantata. Na eksplantatima listova gajenim na hranljivim podlogama sa TDZ ( $\geq 0,5$  mg/l) došlo je do značajno većeg formiranja kalusa (80,06%) u

**Tabela 23.** Uticaj citokinina na formiranje kalusa i adventivnih izdanaka iz odsečaka lisnih drške i listova *V. cornuta* gajene *in vitro*.

Citokinini*				Tip eksplantata	Eksplantati sa formiranim kalusom (%)	Eksplantati sa izdancima (%)	Broj izdanaka po eksplantatu
BAP	KIN	TDZ	CPPU				
-	-	-	-	odsečak lisne drške	0,20 ± 0,20 <sup>a**</sup>	21,30 ± 0,30 <sup>e</sup>	2,32 ± 0,45 <sup>d</sup>
-	-	-	-	odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
0,1	-	-	-	odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
0,5	-	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	11,20 ± 1,60 <sup>d</sup>	1,50 ± 0,64 <sup>cd</sup>
0,5	-	-	-	odsečak lista	5,71 ± 0,64 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>b-d</sup>
1,0	-	-	-	odsečak lista	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
-	0,1	-	-	odsečak lisne drške	1,33 ± 1,33 <sup>ab</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>b-d</sup>
-	0,1	-	-	odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
-	0,5	-	-	odsečak lisne drške	2,56 ± 0,86 <sup>bc</sup>	4,99 ± 1,95 <sup>c</sup>	1,00 ± 0,70 <sup>a-c</sup>
-	0,5	-	-	odsečak lista	2,56 ± 0,86 <sup>bc</sup>	0,32 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	9,44 ± 1,19 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,48 <sup>b-d</sup>
-	1,0	-	-	odsečak lista	5,71 ± 0,64 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	0,1	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
-	-	0,1	-	odsečak lista	1,33 ± 1,33 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	0,5	-	odsečak lisne drške	32,18 ± 0,28 <sup>f</sup>	2,56 ± 0,86 <sup>bc</sup>	0,50 ± 0,29 <sup>a-c</sup>
-	-	0,5	-	odsečak lista	78,17 ± 2,83 <sup>g</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	21,07 ± 0,84 <sup>e</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>b-d</sup>
-	-	1,0	-	odsečak lista	80,06 ± 1,98 <sup>g</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	-	0,1	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,62 ± 1,94 <sup>d</sup>	1,50 ± 0,87 <sup>cd</sup>
-	-	-	0,1	odsečak lista	3,80 ± 1,36 <sup>c</sup>	2,56 ± 0,86 <sup>bc</sup>	1,00 ± 0,58 <sup>a-c</sup>
-	-	-	0,5	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	24,59 ± 0,30 <sup>f</sup>	2,50 ± 0,50 <sup>d</sup>
-	-	-	0,5	odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	4,99 ± 1,95 <sup>cd</sup>	4,99 ± 1,95 <sup>c</sup>	1,00 ± 0,71 <sup>a-c</sup>
-	-	-	1,0	odsečak lista	5,27 ± 1,33 <sup>cd</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

\*Koncentracije citokinina su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene razlicitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

odnosu na hranljive podloge sa drugim citokininima. Takođe, na podlozi sa TDZ (0,5 mg/l) dobijen je najveći procenat eksplantata lisnih drški sa formiranim kalusom (32,18%).

Za indukciju organogeneze izdanaka na eksplantatima *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta* najvažniji faktor je tip eksplantata, kao i interakcija tipa eksplantata i primenjenog citokinina. Kod eksplantata lisnih drški postignuta je veća indukcija izdanaka nego kod eksplantata listova. Do formiranja izdanaka (21,3%) došlo je i kada su eksplantati lisne drške gajeni na podlozi bez regulatora rastjenja (**Slika 14d**). Najveća efikasnost regeneracije izdanaka (24,6%) i ujedno najveći broj *de novo* formiranih izdanaka po eksplantatu (2,5) postignuti su na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l CPPU. Izdanci su nastajali direktno na eksplantatu lisne drške bez formiranja kalusa (**Slika 14e**). Kod eksplantata listova, najbolja indukcija organogeneze izdanaka (2,56%) postignuta je na podlozi sa niskom koncentracijom CPPU (0,1 mg/l).

#### 4.3.2. Uticaj kombinacija auksina i citokinina na formiranje kalusa i izdanaka

Ispitan je uticaj različitih koncentracija dva auksina, IAA ili NAA, u kombinacijama sa jednim od citokinina (BAP, KIN, TDZ ili CPPU) u koncentraciji 1,0 mg/l na formiranje kalusa i izdanaka na odseccima lisnih drški i listova *in vitro* gajenih biljaka posle 4 nedelje gajenja (**Tabele 24 i 25**).

Sastav hranljive podloge, tip eksplantata kao i njihova interakcija su faktori koji utiču na formiranje kalusa na podlogama sa IAA i citokininom (**Tabela 24**). Na hranljivim podlogama sa IAA i citokininima adeninskog tipa (BAP ili KIN) ni kod jednog tipa eksplantata nije došlo do formiranja kalusa, izuzev kod eksplantata lisnih drški na podlozi sa 0,1 mg/l IAA i 1,0 mg/l BAP. Dodatak IAA hranljivim podlogama sa citokininima koji su derivati feniluree (TDZ ili CPPU) doveo je do smanjenja broja eksplantata na kojima se formira kalus u odnosu na podlogu bez IAA.

Tip eksplantata je najznačajniji faktor za formiranje izdanaka na podlogama sa IAA i citokininom. Eksplantati lisne drške pokazali su veći potencijal za regeneraciju izdanaka u odnosu na eksplantate listova. Najveći procenat eksplantata sa formiranim izdancima (17,53%), kao i najveći broj izdanaka po eksplantatu (2,25), dobijen je kod eksplantata lisnih drški gajenih na podlozi sa 0,5 mg/l IAA i 1,0 mg/l CPPU (**Slika 14f**). Kod eksplantata listova izdanci su formirani samo na podlozi sa 0,1 mg/l IAA i 1,0 mg/l TDZ (0,32%).

Sastav hranljive podloge i interakcija podloge i tipa eksplantata značajni su faktori za formiranje kalusa na podlogama sa NAA i citokininom (**Tabela 25**). Nasuprot IAA, NAA u podlozi sa citokininom pozitivno je uticala na formiranje kalusa, posebno na podlogama sa citokininima derivatima feniluree (TDZ i CPPU). Kod eksplantata lisnih drški kalus je formiran kod 96,19-100%, dok je kod eksplantata listova kalus formiran kod 63,40-100% eksplantata, u zavisnosti od koncentracije NAA u podlozi. Na podlogama sa NAA i citokininima adeninskog tipa (BAP i KIN) kalusno tkivo je formirano na znatno manjem broju eksplantata, pa je tako kod eksplantata lisnih drški najveća efikasnost formiranja kalusa (34,65%) bila na podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l KIN, a kod eksplantata listova (29,40%) na podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP.

Na regeneraciju izdanaka iz eksplantata lisnih drški i listova gajenih na podlogama sa NAA i citokininom najviše utiče tip eksplantata. Eksplantati lisne drške su pokazali veći potencijal za regeneraciju izdanaka u odnosu na eksplantate listova. Indukcija organogeneze izdanaka je bila najveća (21,07%) kod lisnih drški, kao i broj formiranih izdanaka po eksplantatu (2,25) na podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l KIN. Na ovoj hranljivoj podlozi zabeležen je i najveći procenat formiranih izdanaka kod eksplantata listova (0,31%).

**Tabela 24.** Uticaj IAA i citokinina na formiranje kalusa i adventivnih izdanaka iz odsečaka lisnih drške i listova *V. cornuta* gajene *in vitro*.

Regulatori rastenja*					Tip eksplantata	Eksplantati sa formiranim kalusom (%)	Eksplantati sa izdancima (%)	Broj izdanaka po eksplantatu
IAA	BAP	KIN	TDZ	CPPU				
-	-	-	-	-	odsečak lisne drške	0,20 ± 0,20 <sup>a**</sup>	21,30 ± 0,30 <sup>e</sup>	2,32 ± 0,45 <sup>d</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a**</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,31 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
0,1	1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	12,91 ± 2,04 <sup>de</sup>	1,75 ± 0,85 <sup>cd</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,5	1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	9,44 ± 1,19 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,48 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	5,71 ± 0,64 <sup>bc</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,46 ± 0,96 <sup>cd</sup>	1,00 ± 0,41 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,5	-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,99 ± 1,95 <sup>cd</sup>	1,00 ± 0,71 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	21,07 ± 0,84 <sup>d</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	80,06 ± 1,97 <sup>e</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	8,02 ± 2,92 <sup>d</sup>	1,50 ± 0,95 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	19,18 ± 0,97 <sup>d</sup>	0,32 ± 0,32 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
0,5	-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	2,56 ± 0,86 <sup>b</sup>	1,31 ± 1,31 <sup>a-c</sup>	0,50 ± 0,50 <sup>a-c</sup>
					odsečak lista	8,01 ± 2,92 <sup>c</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	4,99 ± 1,99 <sup>bc</sup>	4,99 ± 1,95 <sup>cd</sup>	1,00 ± 0,71 <sup>b-d</sup>
					odsečak lista	5,27 ± 1,78 <sup>bc</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	1,33 ± 1,33 <sup>a-c</sup>	0,50 ± 0,50 <sup>a-c</sup>
					odsečak lista	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,5	-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	1,33 ± 1,33 <sup>ab</sup>	17,53 ± 2,26 <sup>e</sup>	2,25 ± 0,85 <sup>d</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

\*Koncentracije regulatora rastenja su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).



Tabela 25. Uticaj NAA i citokinina na formiranje kalusa i adventivnih izdanaka iz odsečaka lisnih drške i listova *V. cornuta* gajene *in vitro*.

Regulatori rastenja*					Tip eksplantata	Eksplantati sa formiranim kalusom (%)	Eksplantati sa izdancima (%)	Broj izdanaka po eksplantatu
NAA	BAP	KIN	TDZ	CPPU				
-	-	-	-	-	odsečak lisne drške	0,20 ± 0,20 <sup>a**</sup>	21,30 ± 0,30 <sup>e</sup>	2,32 ± 0,45 <sup>d</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	0,00 ± 0,00 <sup>a**</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>e</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>cd</sup>
					odsečak lista	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,31 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
0,1	1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	29,75 ± 0,20 <sup>i</sup>	3,81 ± 1,36 <sup>cd</sup>	0,75 ± 0,48 <sup>a-d</sup>
					odsečak lista	3,81 ± 1,36 <sup>bc</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,5	1,0	-	-	-	odsečak lisne drške	16,75 ± 0,38 <sup>f</sup>	13,09 ± 1,88 <sup>f</sup>	1,75 ± 0,75 <sup>de</sup>
					odsečak lista	29,40 ± 0,57 <sup>i</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	0,64 ± 0,64 <sup>ab</sup>	9,43 ± 1,19 <sup>e</sup>	1,25 ± 0,48 <sup>cd</sup>
					odsečak lista	5,71 ± 0,64 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	26,31 ± 0,79 <sup>h</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b-c</sup>
					odsečak lista	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,5	-	1,0	-	-	odsečak lisne drške	34,65 ± 0,30 <sup>j</sup>	21,07 ± 0,85 <sup>g</sup>	2,25 ± 0,75 <sup>e</sup>
					odsečak lista	11,20 ± 1,56 <sup>e</sup>	0,31 ± 0,31 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
-	-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	21,07 ± 0,84 <sup>g</sup>	9,06 ± 1,40 <sup>e</sup>	1,25 ± 0,63 <sup>cd</sup>
					odsečak lista	80,06 ± 1,97 <sup>l</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	96,19 ± 1,36 <sup>mn</sup>	2,56 ± 0,86 <sup>c</sup>	1,50 ± 0,95 <sup>a-c</sup>
					odsečak lista	100,00 ± 0,00 <sup>n</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,5	-	-	1,0	-	odsečak lisne drške	99,35 ± 0,64 <sup>n</sup>	1,33 ± 1,33 <sup>a-c</sup>	0,50 ± 0,50 <sup>a-c</sup>
					odsečak lista	94,28 ± 0,64 <sup>m</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
-	-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	4,99 ± 1,99 <sup>cd</sup>	4,99 ± 1,95 <sup>c-e</sup>	1,00 ± 0,71 <sup>b-e</sup>
					odsečak lista	5,27 ± 1,78 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,1	-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	97,91 ± 2,08 <sup>mn</sup>	3,80 ± 1,36 <sup>cd</sup>	0,75 ± 0,47 <sup>a-d</sup>
					odsečak lista	63,40 ± 1,19 <sup>k</sup>	0,31 ± 0,31 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>
0,5	-	-	-	1,0	odsečak lisne drške	100,00 ± 0,00 <sup>n</sup>	7,46 ± 0,96 <sup>e</sup>	1,00 ± 0,41 <sup>b-e</sup>
					odsečak lista	94,72 ± 1,78 <sup>m</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

\*Koncentracije regulatora rastenja su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4. Umnožavanje izdanaka *V. cornuta*

Proučavano je umnožavanje izdanaka dobijenih od eksplantata klijanaca (odjeljak 4.4.1.), kao i umnožavanje izdanaka poreklom od eksplantata *in vitro* gajenih biljaka (odjeljak 4.4.2.).

##### 4.4.1. Umnožavanje izdanaka dobijenih regeneracijom na eksplantatima klijanaca

Praćeno je umnožavanje izdanaka koji su dobijeni od različitih eksplantata klijanaca (odsečaka lista, lisne drške i hipokotila) na dve hranljive podloge kojima su dodati NAA i BAP (Tabela 26). Na obe hranljive podloge do umnožavanja izdanaka je došlo aktiviranjem aksilarnih pupoljaka (Slika 15a i 15b).

**Tabela 26.** Umnožavanje izdanaka *V. cornuta* na različitim hranljivim podlogama nakon 4 nedelje gajenja *in vitro* u uslovima dugog dana.

Hranljiva podloga*	Tip eksplantata	Broj aksilarnih izdanaka
½MS + 0,1 NAA + 1,0 BAP	odsečak lista	1,85 ± 0,19 <sup>b**</sup>
	odsečak lisne drške	1,72 ± 0,16 <sup>ab</sup>
	odsečak hipokotila	1,75 ± 0,05 <sup>ab</sup>
½MS + 0,5 NAA + 1,0 BAP	odsečak lista	1,98 ± 0,27 <sup>b</sup>
	odsečak lisne drške	1,33 ± 0,12 <sup>a</sup>
	odsečak hipokotila	1,80 ± 0,05 <sup>ab</sup>

\*Koncentracije NAA i BAP su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Najveći broj novoformiranih aksilarnih izdanaka po biljci (1,85-1,98) dobijen je kod izdanaka koji vode poreklo od odsečaka listova klijanaca, na obe hranljive podloge (Slika 15c). Pokazano je da nema statistički značajnih razlika u broju novoformiranih aksilarnih izdanaka između ove dve hranljive podloge. Najveće umnožavanje izdanaka postignuto je kada su odsečki listova (1,98) gajeni na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP što je bilo statistički značajno više u odnosu na izdanke dobijene na odseccima lisnih drški (1,33).



**Slika 15.** Umnožavanje izdanaka *V. cornuta* na hranljivim podlogama sa NAA i BAP posle 4 nedelje gajenja u uslovima dugog dana. **a** - izdanak gajen na podlozi sa 0,1 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP; **b** - izdanak gajen na podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP; **c** - *in vitro* kultura izdanaka. Bar = 5 mm (a, b); 10 mm (c).

#### 4.4.2. Umnožavanje i izduživanje izdanaka dobijenih od eksplantata *in vitro* gajenih biljaka

Proučavano je umnožavanje i izduživanje izdanaka koji su dobijeni od eksplantata *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta* na podlozi sa NAA i BAP, kao i na podlogama sa TDZ ili CPPU (**Tabela 27**). Broj novoformiranih izdanaka bio je značajno veći (7,1-7,6) kada su izdanci gajeni na podlogama sa citokininima derivatima feniluree (TDZ ili CPPU) u odnosu na broj izdanaka (2,9) koji je formiran na podlozi sa NAA i BAP. Najveća prosečna dužina izdanaka (82,2 mm) zabeležena je na podlozi sa 0,5 mg/l CPPU.

**Tabela 27.** Umnožavanje i izduživanje izdanaka *V. cornuta* na različitim hranljivim podlogama nakon 6 nedelja gajenja u kulturi *in vitro* u uslovima dugog dana.

Hranljiva podloga*	Umnožavanje izdanaka	Izduživanje izdanaka
	Prosečan broj aksilarnih izdanaka	Dužina izdanaka (mm)
½MS + 0,5 NAA + 1,0 BAP	2,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	75,0 ± 5,4 <sup>ab</sup>
½MS + 0,1 TDZ	7,6 ± 0,5 <sup>b</sup>	63,5 ± 2,9 <sup>a</sup>
½MS + 0,5 CPPU	7,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	82,2 ± 7,0 <sup>b</sup>

\*Koncentracije NAA, BAP, TDZ i CPPU su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

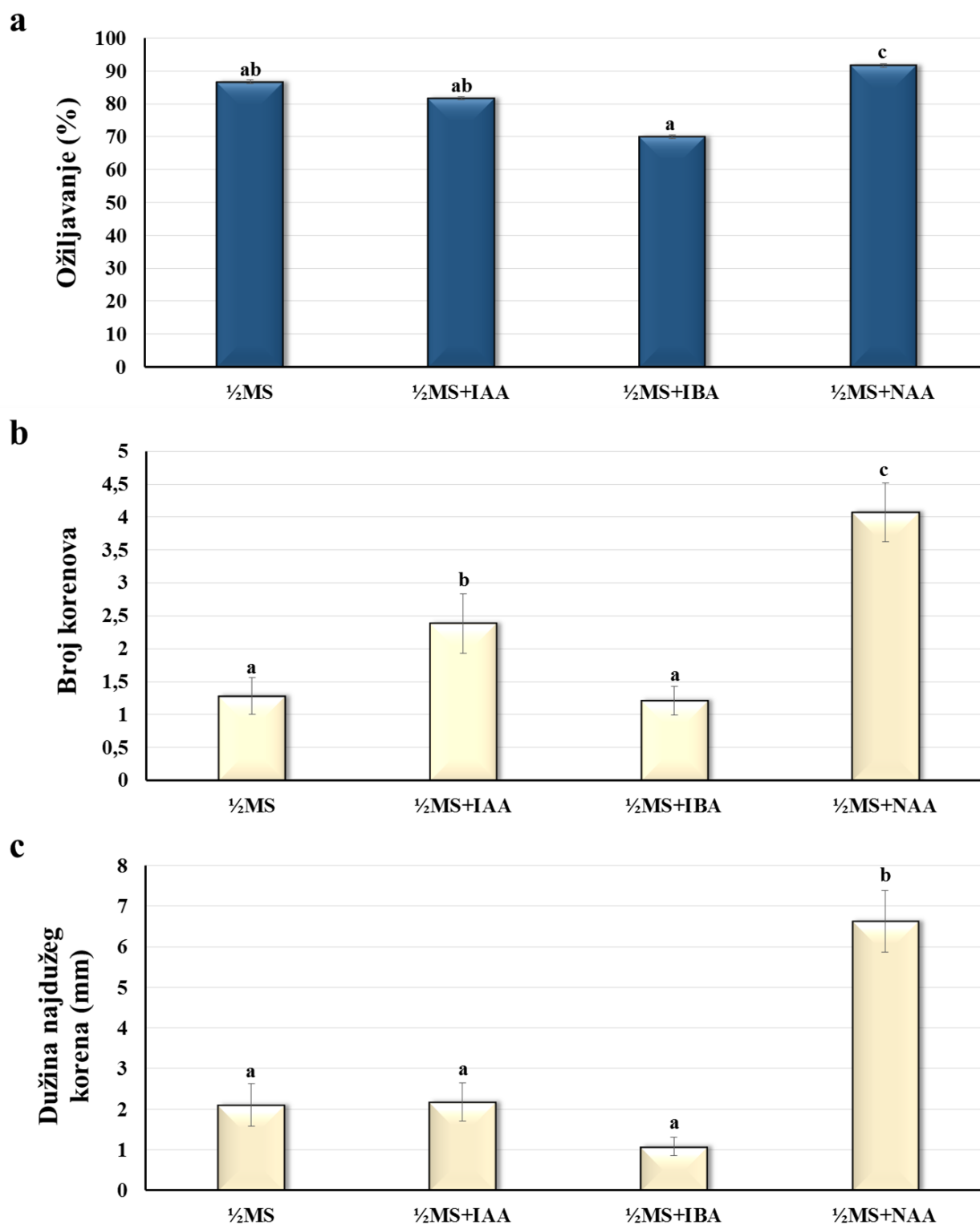
#### 4.5. Ožiljavanje izdanaka *V. cornuta*

Ispitan je uticaj četiri hranljive podloge na ožiljavanje izdanaka *V. cornuta* (**Histogram 2 i 2**). Izdanci su gajeni na podlozi bez regulatora rastenja i podlogama sa niskom koncentracijom (0,1 mg/l) auksina (IAA, IBA ili NAA).

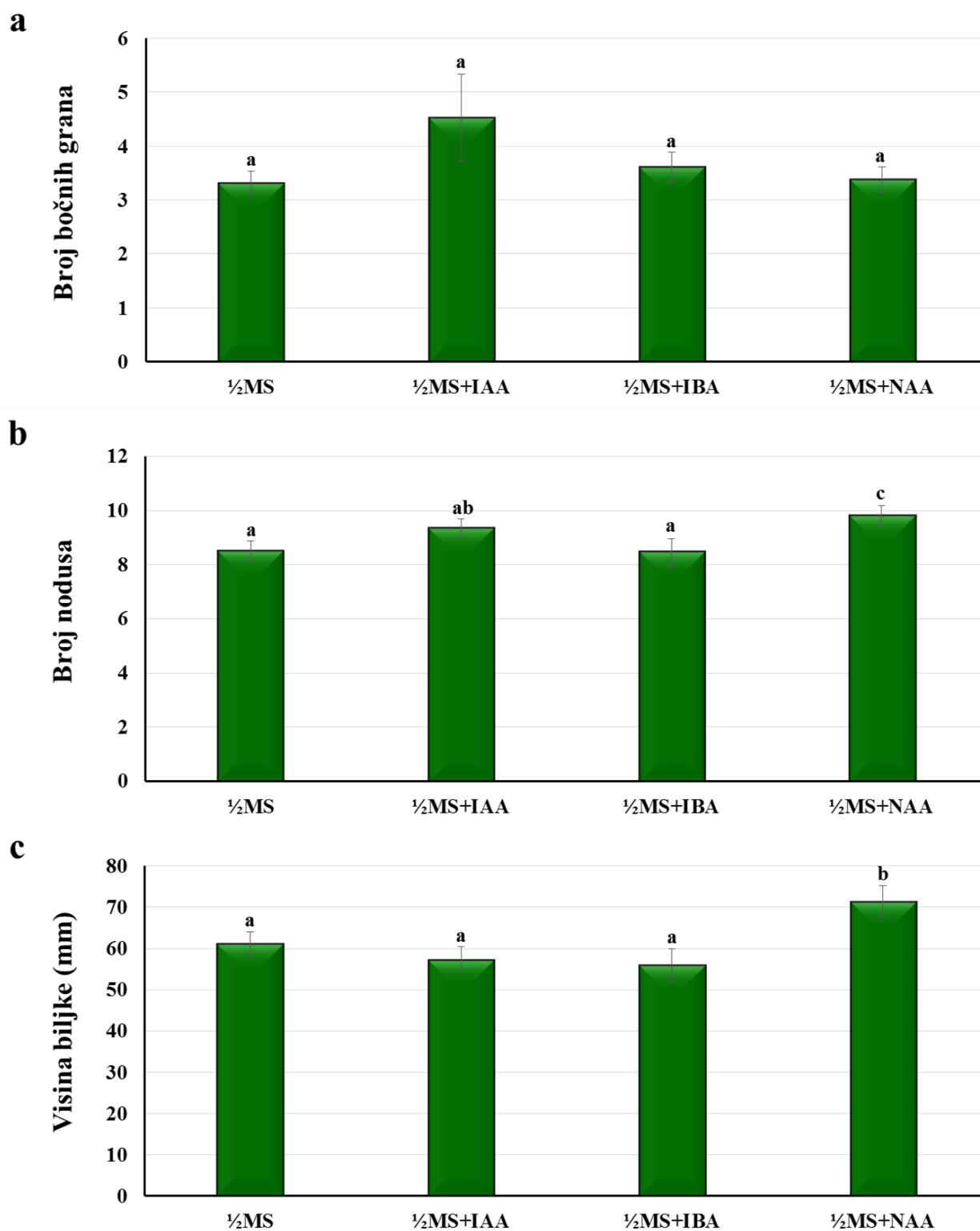
Nakon 8 nedelja gajenja na podlozi bez dodatih auksina primećeno je spontano ožiljavanje izdanaka (**Histogram 2**). Na hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l NAA dobijen je najveći procenat ožiljenih izdanaka (**Histogram 2a**), broj korenova po izdanku (**Histogram 2b**) i dužina najdužeg korena (**Histogram 2c**).

Kod ožiljenih biljaka broj formiranih bočnih grana po biljci se nije razlikovao kod biljaka gajenih na različitim podlogama (**Histogram 3a**). Prosečan broj nodusa po biljci (**Histogram 3b**) i prosečna visina biljke (**Histogram 3c**) bili su značajno veći na podlozi sa NAA nego na drugim hranljivim podlogama na kojima su izdanci ožiljavani.

Pored toga, praćeno je ožiljvanje izdanaka koji su prethodno umnožavani na različitim hranljivim podlogama (NAA i BAP, TDZ ili CPPU). Izdanci sa ovih podloga su ožiljavani na podlozi bez regulatora rastenja (**Tabela 28**). Posle 4 nedelje gajenja svi izdanci su bili ožiljeni (100%) i imali su sličan broj formiranih korenova i dužinu najdužeg korena, bez obzira na podlogu na kojoj su umnožavani.



**Histogram 2.** Ožljavanje izdanaka *V. cornuta* nakon 8 nedelja gajenja. **a** - procenat ožiljenih biljaka; **b** - broj korenova po ožiljenoj biljci; **c** - dužina najdužeg korena. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova na istom histogramu ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).



**Histogram 3.** Morfološke karakteristike ožiljenih biljaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro*. **a** - broj novoformiranih bočnih grana po biljci; **b** - broj nodusa po biljci; **c** - prosečna visina biljke. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova na istom histogramu ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 28.** Ožiljavanje izdanaka i morfološke karakteristike *V. cornuta* na hranljivoj podlozi bez regulatora rastanja, nakon 4 nedelje gajenja u uslovima dugog dana.

Hranljiva podloga umnožavanja izdanaka*	Ožiljavanje		Morfološke karakteristike	
	Broj korenova	Dužina korena (mm)	Broj bočnih grana	Visina biljke (mm)
0,5 NAA + 1,0 BAP	5,8 ± 0,3 <sup>a**</sup>	10,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	66,6 ± 3,4 <sup>a</sup>
0,1 TDZ	6,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	11,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	68,3 ± 2,7 <sup>a</sup>
0,5 CPPU	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	11,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	74,8 ± 3,5 <sup>a</sup>

\*Koncentracije NAA, BAP, TDZ i CPPU su u mg/l. \*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Između ožiljenih biljaka nisu postojale značajne razlike za posmatrane morfološke karakteristike. Visina ožiljenih biljaka se kretala od 66,6 do 74,8 mm, i formirano je prosečno od 3,4-3,5 bočnih grana po biljci.

#### 4.6. Aklimatizacija biljaka *V. cornuta*

Biljke ožiljene u kulturi *in vitro* (Slika 16a) su uspešno aklimatizovane (96%) u stakleniku, u periodu od jula do novembra, a narednog proleća su cvetale (Slika 16b). Tokom gajenja u uslovima staklenika došlo je do oplodjenja (Slika 16c) kada su se formirali plodovi tipa čaure sa semenima (Slika 16d). Čaure su pucale po šavovima (Slika 16e) i tako omogućile rasejavanje semena (Slika 16f).



**Slika 16.** Aklimatizacija biljaka *V. cornuta* u uslovima staklenika. **a** - potpuno formirana *in vitro* ožiljena biljka; **b** - aklimatizovane biljke u fazi cvetanja u stakleniku; **c** - plod čaura; **d** - pucanje čaure; **e** - otvorena čaura sa zrelim semenima; **f** - čaura nakon oslobađanja semena. Bar = 5 mm (a, c-f); 10 mm (b).



#### 4.7. Genetička transformacija *V. cornuta*

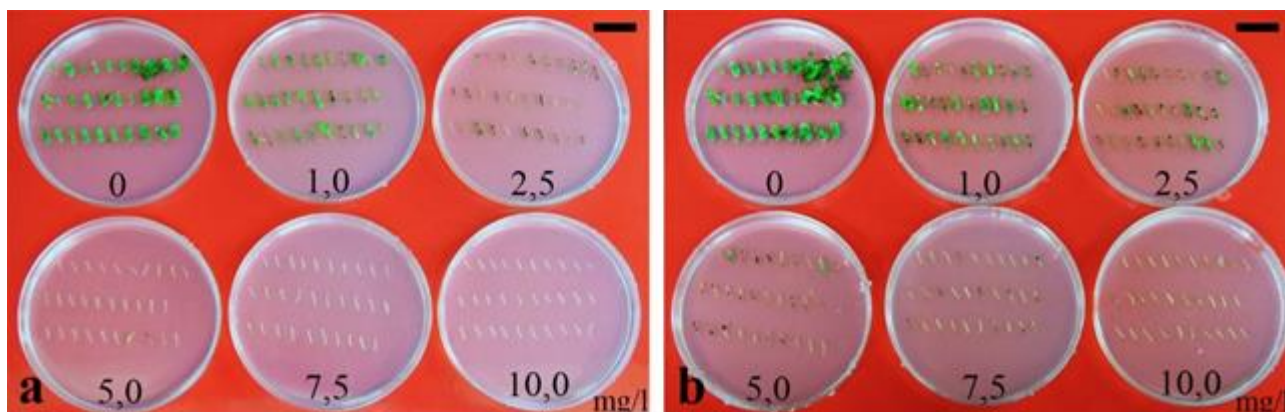
Na osnovu rezultata o indukciji izdanaka *V. cornuta* u kulturi *in vitro* izabrani su odsecci hipokotila kao početni eksplantati za genetičku transformaciju. Takođe, odsecci hipokotila su se u preliminarnim eksperimentima transformacije pokazali kao podesniji tip eksplantata za transformaciju pomoću *A. tumefaciens* u odnosu na odsečke listova i lisnih drških *in vitro* gajenih biljaka. Usled osetljivosti na infekciju agrobakterijama, visoki procenat eksplantata listova i lisnih drški je brzo propadao nakon inokulacije, i nije dolazilo do regeneracije izdanaka.

##### 4.7.1. Selektivna koncentracija higromicina

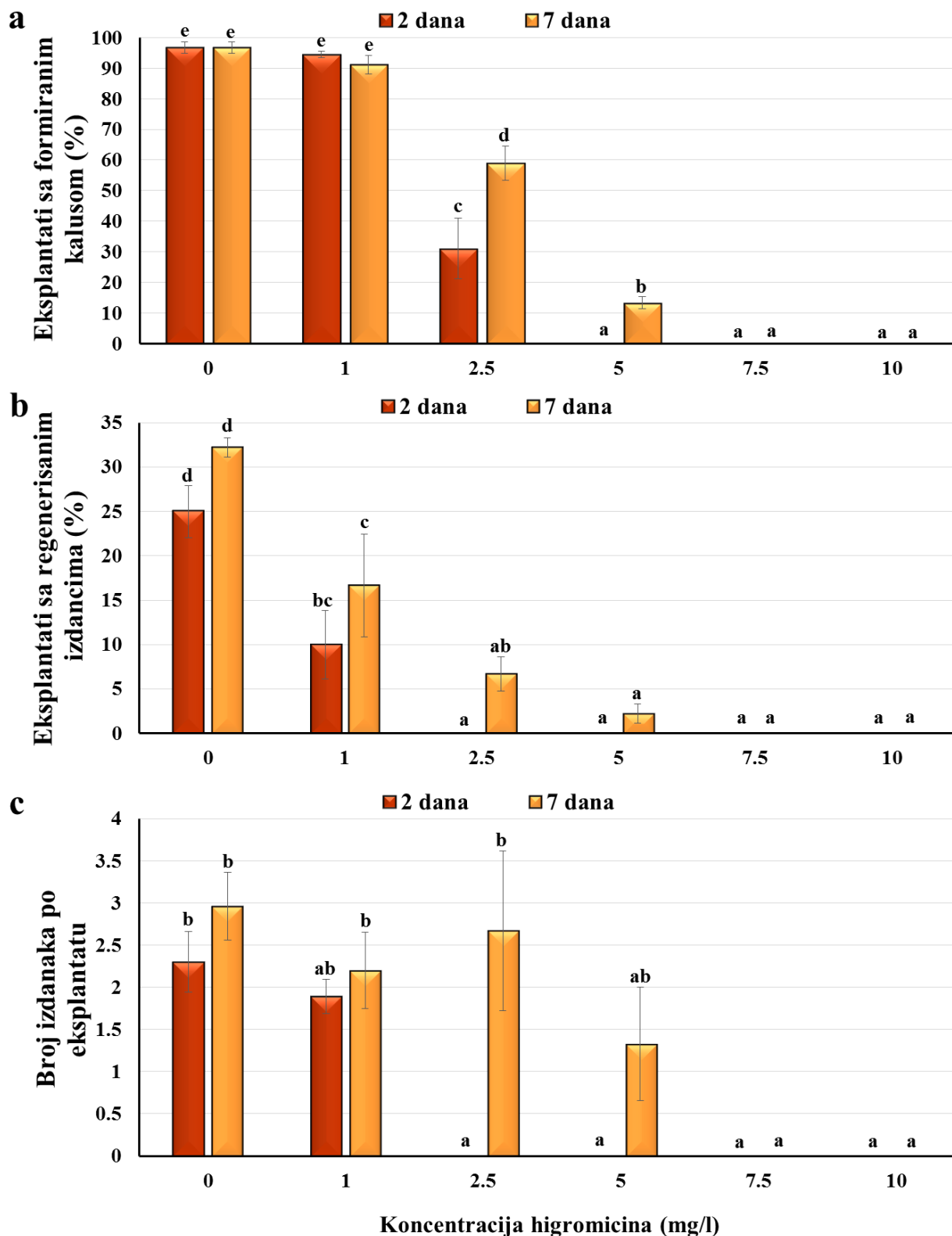
Za genetičku transformaciju *V. cornuta* korišćeni su vektori koji kao selektivni marker sadrže gen za higromicin-fosfotransferazu. Zbog toga je najpre ispitana osetljivost eksplantata hipokotila na antibiotik higromicin kako bi se odredila njegova optimalna koncentracija za selekciju transformisanih od netransformisanih biljnih ćelija. Ispitan je regenerativni potencijal eksplantata hipokotila *V. cornuta* na različitim koncentracijama higromicina u hranljivoj podlozi za indukciju izdanaka, sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2,0 mg/l BAP (**Histogram 4, Slika 18**). Eksplantati hipokotila su gajeni 2, odnosno 7 dana na podlozi bez higromicina kao predtretman, a zatim na podlogama sa rastućim koncentracijama ovog antibiotika (0-10 mg/l). Posle 4 nedelje određen je procenat eksplantata sa formiranim kalusom (**Histogram 4a**), procenat eksplantata sa regenerisanim izdancima (**Histogram 4b**), kao i prosečan broj izdanaka po eksplantatu hipokotila (**Histogram 4c**).

Kada su eksplantati hipokotila gajeni na predtretmanu 2 dana, podloga sa najnižom koncentracijom higromicina (1,0 mg/l) nije uticala na efikasnost formiranja kalusa, ali je regeneracija izdanaka bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu bez higromicina. Na podlozi sa 2,5 mg/l higromicina procenat formiranja kalusa je bio značajno smanjen u odnosu na kontrolu, a do regeneracije izdanaka nije došlo. Na podlogama sa višim koncentracijama higromicina ( $\geq 5$  mg/l) svi eksplantati su nekrozirali (**Slika 17a**).

Sa druge strane, predtretman od 7 dana omogućio je preživljavanje eksplantata hipokotila i na podlogama sa višim koncentracijama higromicina (2,5 i 5,0 mg/l). Kao i u slučaju kraćeg trajanja predtretmana, na podlozi sa najnižom koncentracijom higromicina (1,0 mg/l) visok procenat eksplantata je formirao kalus dok je regeneracija izdanaka bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu. Sa porastom koncentracije higromicina (2,5 i 5,0 mg/l) došlo je do daljeg smanjenja efikasnosti formiranja kalusa i regeneracije izdanaka, bez uticaja na prosečan broj izdanaka po eksplantatu. Na podlogama sa višim koncentracijama higromicina ( $\geq 7,5$  mg/l) svi eksplantati su nekrozirali (**Slika 17b**).



**Slika 17.** Efekat rastućih koncentracija higromicina (mg/l) na formiranje kalusa i izdanaka u kulturi hipokotila *V. cornuta*. **a** - predtretman 2 dana; **b** - predtretman 7 dana. Bar = 10 mm.



**Histogram 4.** Uticaj različitih koncentracija higromicina i predtretmana na formiranje kalusa i regeneraciju izdanaka na odsečcima hipokotila. **a** - eksplantati sa formiranim kalusom (%); **b** - eksplantati sa regenerisanim izdancima (%); **c** - prosečan broj izdanaka po eksplantatu. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova na jednom histogramu, ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).



Duže trajanje predtretmana (7 dana) uticalo je na smanjenje osetljivosti eksplantata hipokotila prema higromicinu. Na podlogama sa istim koncentracijama higromicina, eksplantati koji su gajeni na predtretmanu 7 dana na podlogama bez higromicina, imali su veću efikasnost formiranja kalusa i regeneracije izdanaka u odnosu na eksplantate gajene na predtretmanu 2 dana. Za predtretman od 2 dana kao selektivna izabrana je koncentracija higromicina od 2,5 mg/l, dok je za predtretman 7 dana ona iznosila 7,5 mg/l.

#### 4.8. Transformacija genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*)

Genetička transformacija eksplantata hipokotila *V. cornuta* urađena je korišćenjem dva vektora koji nose gen za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*ccs*) pod kontrolom različitih promotora: pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos (35S-*Llccs*) i pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos (PchsA-*Llccs*). "Prazan vektor" (pWBVec10a) predstavljao je kontrolu transformacije (*Llccs*-).

Do formiranja kalusa i regeneracije izdanaka kod eksplantata hipokotila inokulisanih u bakterijskoj suspenziji dolazilo je kasnije u odnosu na kontrolne eksplantate hipokotila koji su potapani u tečni YEP medijum bez bakterija. Netransformisani eksplantati hipokotila su u potpunosti nekrozirali na podlozi sa selektivnom koncentracijom higromicina.

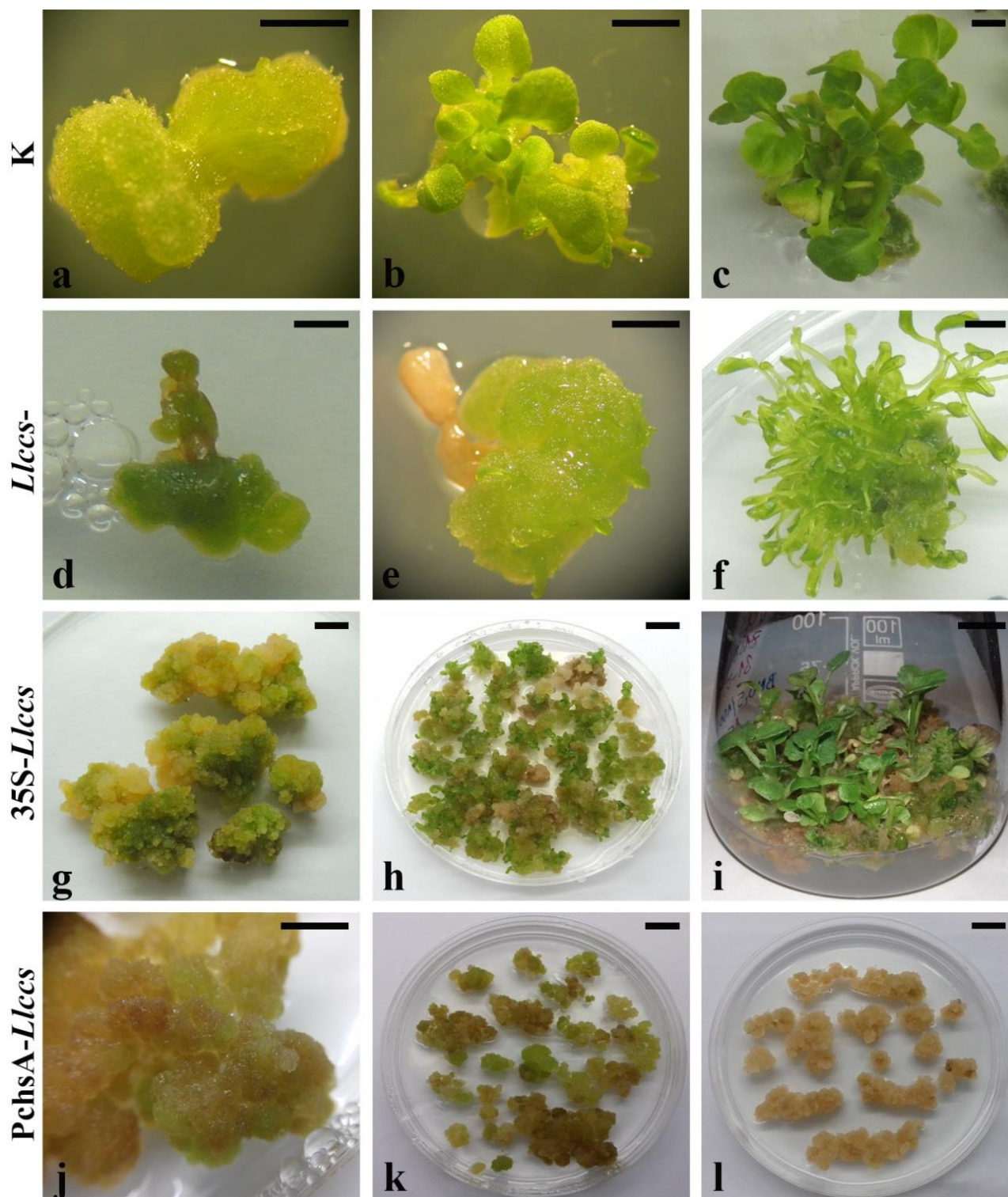
Kalusno tkivo kontrolnih netransformisanih eksplantata hipokotila počelo je da se formira već posle par dana od izolacije eksplantata hipokotila i bilo je kompaktno i zelene boje (**Slika 18a**). Indukcija adventivnih izdanaka kod netransformisanih eksplantata hipokotila uočena je oko petnaest dana od izolacije, a zatim su izdanci potpuno formirani posle mesec dana (**Slika 18b**) dok je umnožavanje izdanaka postignuto posle dva meseca (**Slika 18c**).

Eksplantati hipokotila prethodno gajeni 2 dana na predtretmanu koji su inokulirani agrobakterijumom sa "praznim vektorom" (*Llccs*-) formirali su kompaktno kalusno tkivo zelene boje (**Slika 18d**), a zatim je krenula regeneracija izdanaka iz kalusnog tkiva nakon tri nedelje od inokulacije (**Slika 18e**). Dva meseca posle inokulacije formirana je kultura potencijalno transformisanih izdanaka (**Slika 18f**).

Eksplantati hipokotila gajeni na predtretmanu 2 dana i transformisani vektorom kod koga je *Llccs* gen pod kontrolom konstitutivnog 35S promotora su formirali kalus (35S-*Llccs*) na kome su pored zelene bili uočljivi i delovi kalusa narandžaste i žute boje (**Slika 18g**). Iz ovog kalusa regenerisani su izdanci nakon tri nedelje od inokulacije. Iako je 35S-*Llccs* kalusno tkivo imalo GUS pozitivnu reakciju, regenerisani izdanci su bili GUS negativni. 35S-*Llccs* kalusno tkivo je dalje gajeno duže od godinu dana na podlozi za regeneraciju izdanaka, a zatim su vraćeni antibiotici u hranljivu podlogu (cefotaksim 200 mg/l i higromicin 2,5 mg/l). Ponovna regeneracija izdanaka krenula je nakon dva meseca gajenja kalusa na ovoj podlozi (**Slika 18h**). Novoformirani izdanci su pokazivali GUS pozitivnu reakciju i uspostavljena je kultura izdanaka (**Slika 18i**).

Eksplantati hipokotila gajeni 7 dana na predtretmanu i potom transformisani sa pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom (PchsA-*Llccs*) formirali su samo kalusno tkivo (**Slika 18j**). Gajenjem PchsA-*Llccs* kalusa u uslovima različite osvetljenosti uočena je promena u njegovoj boji. U uslovima dugog dana pored kalusa zelene uočen je i kalus tamno narandžaste boje (**Slika 18k**). Kalus koji je gajen u mraku bio je svetlo roze boje (**Slika 18l**). Kalus je bio rastresitog tipa bez obzira na svetlosne uslove gajenja. Do trenutka pisanja ove disertacije nisu regenerisani izdanci iz GUS pozitivnog PchsA-*Llccs* kalusa.

Svi dobro razvijeni, potencijalno transformisani izdanci, izolovani su i dalje gajeni kao zasebne linije na hranljivoj podlozi za umnožavanje izdanaka sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP.



**Slika 18.** Genetička transformacija *V. cornuta* genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*). **a-c** - formiranje kalusa i regeneracija izdanaka iz netransformisanog eksplantata hipokotila; **d-f** - formiranje kalusa i regeneracija izdanaka iz eksplantata hipokotila transformisanog sa "praznim vektorom"; **g-i** - formiranje kalusa i regeneracija izdanaka iz eksplantata hipokotila transformisanog sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; **j-l** - formiranje kalusa iz eksplantata hipokotila transformisanog sa pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom. Bar = 3 mm (a, b, c, d, e, f, j); 5 mm (g); 10 mm (h, k, l).

Efikasnost formiranja kalusa i izdanaka procenjena je dva meseca nakon transformacije (**Tabela 29**). Kod eksplantata hipokotila nakon inokulacije sa *A. tumefaciens* (*Llccs*-, *35S-Llccs* i

PchsA-*Llccs*) efikasnost formiranja kalusa bila je značajno manja (15,40-21,11%) nego kod neinokulisanih eksplantata hipokotila (100%). I regeneracija izdanaka iz eksplantata hipokotila inokulisanih u bakterijskoj suspenziji (*Llccs*- i 35S-*Llccs*) bila je značajno niža (0,2-2%) u poređenju sa regeneracijom izdanaka iz neinokulisanih eksplantata hipokotila (32%). Efikasnost genetičke transformacije za *Llccs*- iznosila je 2%, za 35S-*Llccs* 0,3%, dok je za PchsA-*Llccs* ona iznosila 2,22%.

**Tabela 29.** Efikasnost genetičke transformacije *V. cornuta* pomoću *A. tumefaciens* LBA4404 (pWBVec10a).

Tretman	Broj inokulisanih eksplantata	Eksplantati sa formiranim kalusom (%)	Efikasnost genetičke transformacije (%)*	Eksplantati sa izdancima (%)
K**	50	100,00 ± 0,00 <sup>b***</sup>	-	32,00 ± 4,90 <sup>b</sup>
<i>Llccs</i> -	100	21,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	2,00	2,00 ± 1,15 <sup>a</sup>
35S- <i>Llccs</i>	300	15,40 ± 2,35 <sup>a</sup>	0,33	0,20 ± 0,20 <sup>a</sup>
PchsA- <i>Llccs</i>	90	21,11 ± 4,84 <sup>a</sup>	2,22	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

\*Efikasnost genetičke transformacije je predstavljena kao broj eksplantata sa izdancima (*Llccs*- i 35S-*Llccs*)/kalusom (PchsA-*Llccs*) kod kojih je PCR analizom potvrđeno prisustvo transgena u odnosu na ukupan broj inokulisanih eksplantata.

\*\*K: netransformisani eksplantati hipokotila; *Llccs*-: eksplantati hipokotila transformisani sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs*: eksplantati hipokotila transformisani pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; PchsA-*Llccs*: eksplantati hipokotila transformisani pWBVec10a/PchsA::*Llccs*::TNos vektorom.

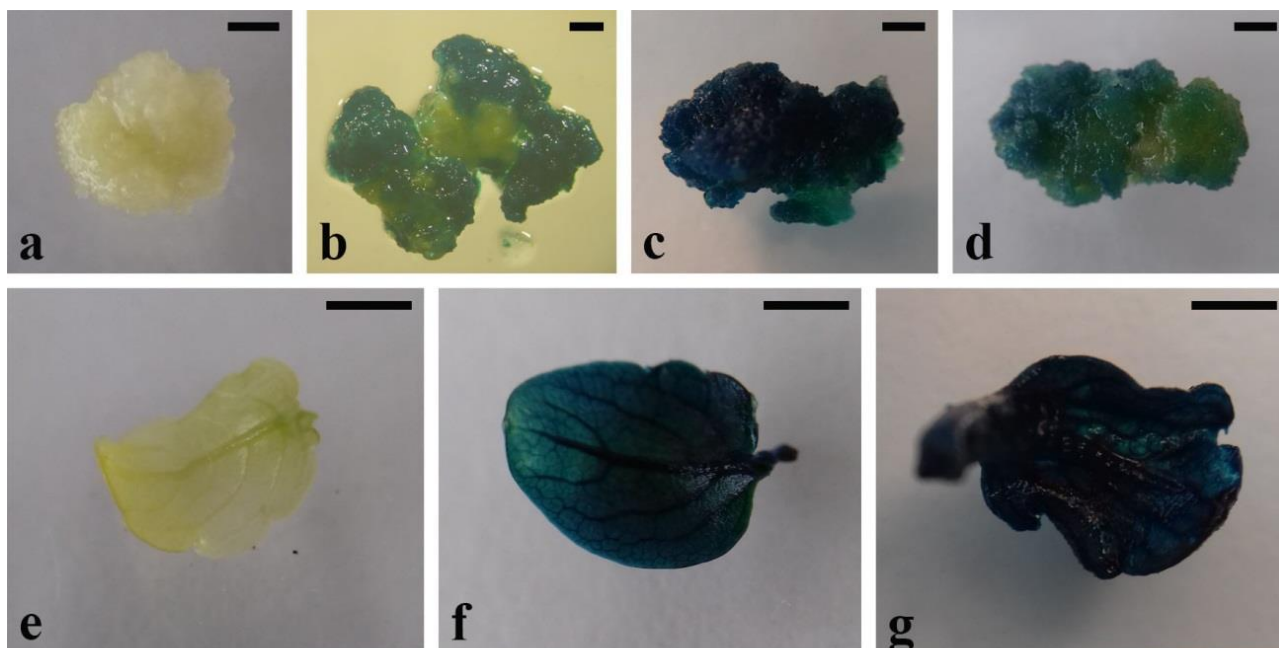
\*\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8.1. Potvrda genetičke transformacije

Uspešnost genetičke transformacije *V. cornuta* najpre je potvrđena histohemijskim GUS testom koji je predstavljao prvi, preliminarni dokaz o transformaciji (odeljak 4.8.1.1.). Potom je PCR analizom genomske DNK izolovane iz GUS pozitivnih linija kalusnog tkiva i listova regenerisanih izdanaka pokazano prisustvo transgena u genomu *V. cornuta* (odeljak 4.8.1.2.)

##### 4.8.1.1. Histohemijski GUS test

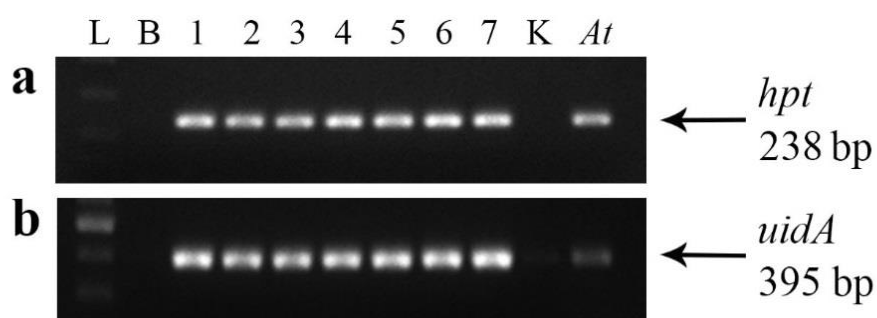
Test je urađen na uzorcima koji su dobijeni transformacijom eksplantata hipokotila sa "praznim vektorom" (*Llccs*-), sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom (35S-*Llccs*) i sa pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom (PchsA-*Llccs*). Prvo su testirani uzorci kalusnog tkiva, a potom i uzorci listova regenerisanih izdanaka. Netransformisani kalus (**Slika 19a**) i list (**Slika 19e**) ostali su nebojeni usled odsustva *uidA* gena. Kao posledica integracije i ekspresije *uidA* gena, transformisani komadići kalusnog tkiva *Llccs*- (**Slika 19b**), 35S-*Llccs* (**Slika 19c**) i PchsA-*Llccs* (**Slika 19d**) bili su obojeni u plavo, u potpunosti ili delimično. Isto tako, i listovi *Llccs*- (**Slika 19f**) i 35S-*Llccs* (**Slika 19g**) potencijalno transformisanih izdanaka bili su intenzivno obojeni u plavo kao rezultat ekspresije *uidA* gena.



**Slika 19.** Ekspresija *uidA* gena u kalusu i listovima nakon transformacije. **a** - netransformisani kalus; **b** - kalus transformisan sa "praznim vektorom"; **c** - kalus transformisan pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; **d** - kalus transformisan pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom; **e** - list netransformisane biljke, **f** - list biljke transformisane sa "praznim vektorom"; **g** - list biljke transformisane sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. Bar = 3 mm.

#### 4.8.1.2. PCR

PCR analizom genomske DNK izolovane iz listova potencijalno transformisanih linija koje su dobijene transformacijom "praznim vektorom" potvrđeno je prisustvo produkata amplifikacije marker gena za selekciju (*hpt*) kao i reporter gena (*gus*) kod svih 7 ispitivanih transformisanih linija. Produkti amplifikacije odgovarajuće veličine od 238 bp (*hpt*) i 395 bp (*uidA*) potvrđeni su i kod bakterijske DNK koja je predstavljala pozitivnu kontrolu. U uzorku negativne kontrole, odnosno DNK izolovane iz lista netransformisane biljke produkti amplifikacije nisu detektovani (**Slika 20**).

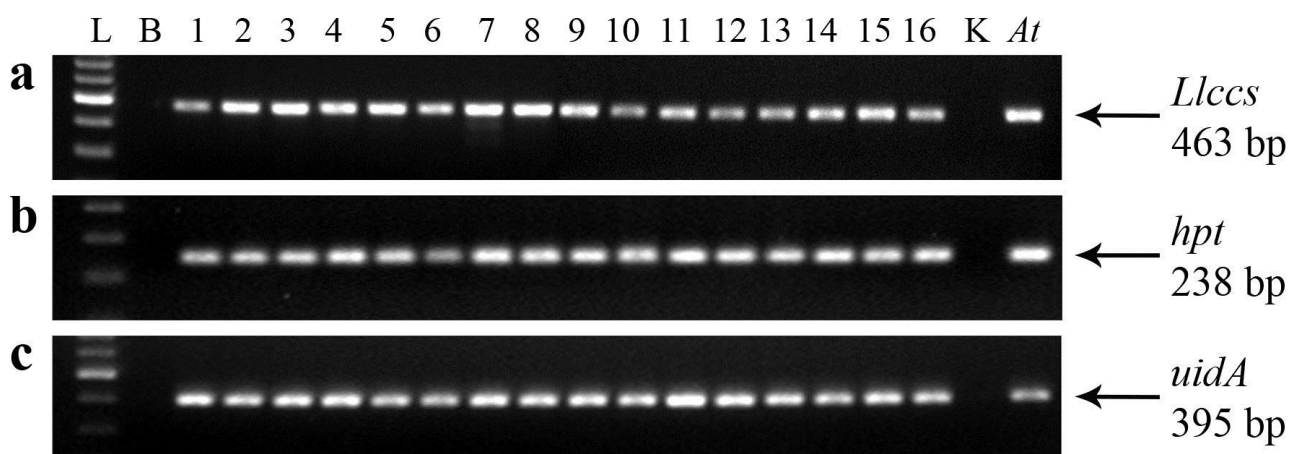


**Slika 20.** PCR analiza potencijalno transformisanih linija koje su dobijene transformacijom sa "praznim vektorom". **a** - amplifikacija fragmenta *hpt* gena dužine 238 bp; **b** - amplifikacija fragmenta *uidA* gena dužine 395 bp. L: DNK standard (100 bp DNA ladder); B: negativna kontrola PCR reakcije (blank); 1-7: potencijalno transformisane linije; K: negativna kontrola (list netransformisane biljke); At: pozitivna kontrola (*A. tumefaciens*).

PCR analizom genomske DNK izolovane iz listova potencijalno transformisanih linija koje su dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom, potvrđeno je prisustvo produkta amplifikacije gena za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*) veličine 463 bp, kod

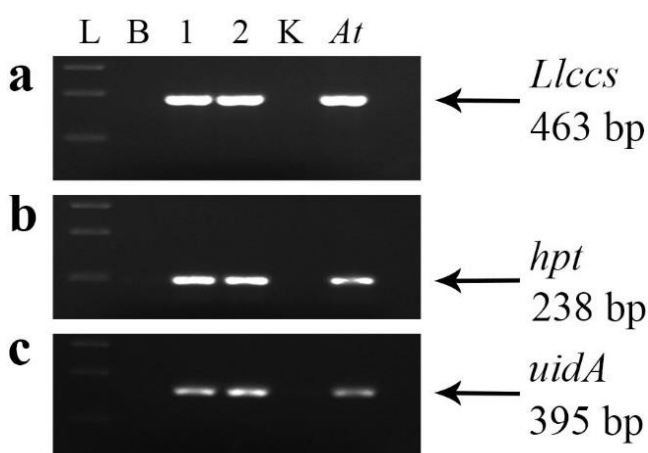


29 od 30 linija. Kod istog broja uzoraka detektovani su i produkti amplifikacije *hpt* odnosno *uidA* gena. Prisustvo sva tri transgena potvrđeno je i u pozitivnoj kontroli, dok u negativnoj kontroli produkti amplifikacije nisu detektovani (**Slika 21**).



**Slika 21.** PCR analiza potencijalno transformisanih linija koje su dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. **a** - amplifikacija fragmenta *Llccs* gena dužine 463 bp; **b** - amplifikacija fragmenta *hpt* gena dužine 238 bp; **c** - amplifikacija fragmenta *uidA* gena dužine 395 bp. L: DNK standard (100 bp DNA ladder); B: negativna kontrola PCR reakcije (blank); 1-16: potencijalno transformisane linije; K: negativna kontrola (list netransformisane biljke); At: pozitivna kontrola (*A. tumefaciens*).

PCR analizom DNK izolovane iz kalusnog tkiva dobijenog transformacijom eksplantata hipokotila sa pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom detektovani su produkti amplifikacije odgovarajućih veličina, 463 bp (*Llccs*), 238 bp (*hpt*) i 395 bp (*uidA*), i kod dva testirana potencijalno transformisana uzorka (**Slika 22**).



**Slika 22.** PCR analiza kalusa dobijenog transformacijom sa pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom. **a** - amplifikacija fragmenta *Llccs* gena dužine 463 bp; **b** - amplifikacija fragmenta *hpt* gena dužine 238 bp; **c** - amplifikacija fragmenta *uidA* gena dužine 395 bp. L: DNK standard (100 bp DNA ladder); B: negativna kontrola PCR reakcije (blank); 1, 2: potencijalno transformisane linije; K: negativna kontrola (netransformisani kalus); At: pozitivna kontrola (*A. tumefaciens*).

#### 4.9. Umnožavanje izdanaka transformisanih linija *V. cornuta*

Za sva dalja ispitivanja nasumično su odabrane po tri linije izdanaka transformisane sa "praznim vektorom" (*Llccs*-), kao i vektorom koji nosi *Llccs* gen pod kontrolom konstitutivnog promotora (*35S-Llccs*). Transformisane linije i netransformisana kontrola umnožavane su na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1,0 mg/l BAP u uslovima dugog dana. Posle 4 nedelje gajenja u kulturi *in vitro*, postojale su značajne razlike u broju *de novo* formiranih aksilarnih izdanaka po biljci, broju nodusa po biljci kao i srednjoj visini biljaka između netransformisane i transformisanih linija (Tabela 30).

**Tabela 30.** Umnožavanje i izduživanje izdanaka 6 transformisanih linija *V. cornuta* na ½MS hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/l NAA i 1 mg/l BAP nakon 4 nedelje gajenja u kulturi *in vitro*.

Linija	Umnožavanje		Izduživanje	
	Broj aksilarnih izdanaka	Broj nodusa po biljci	Prosečna visina izdanka (mm)	
K*	1,95 ± 0,17 <sup>b**</sup>	5,62 ± 0,33 <sup>b</sup>	44,05 ± 1,76 <sup>b</sup>	
<i>Llccs</i> - 1	1,05 ± 0,22 <sup>ab</sup>	5,35 ± 0,27 <sup>ab</sup>	46,25 ± 3,35 <sup>b</sup>	
<i>Llccs</i> - 2	1,05 ± 0,18 <sup>ab</sup>	5,40 ± 0,31 <sup>ab</sup>	32,60 ± 2,17 <sup>a</sup>	
<i>Llccs</i> - 3	2,45 ± 0,18 <sup>c</sup>	6,45 ± 0,40 <sup>c</sup>	32,35 ± 1,53 <sup>a</sup>	
<i>35S-Llccs</i> 1	1,25 ± 0,19 <sup>ab</sup>	5,40 ± 0,20 <sup>ab</sup>	29,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	
<i>35S-Llccs</i> 2	1,20 ± 0,27 <sup>ab</sup>	4,30 ± 0,29 <sup>a</sup>	32,35 ± 1,29 <sup>a</sup>	
<i>35S-Llccs</i> 3	0,65 ± 0,22 <sup>a</sup>	4,75 ± 0,23 <sup>a</sup>	32,75 ± 1,69 <sup>a</sup>	

\*K: netransformisana kontrola; *Llccs*- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; *35S-Llccs* 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV *35S::Llccs::TNos* vektorom.

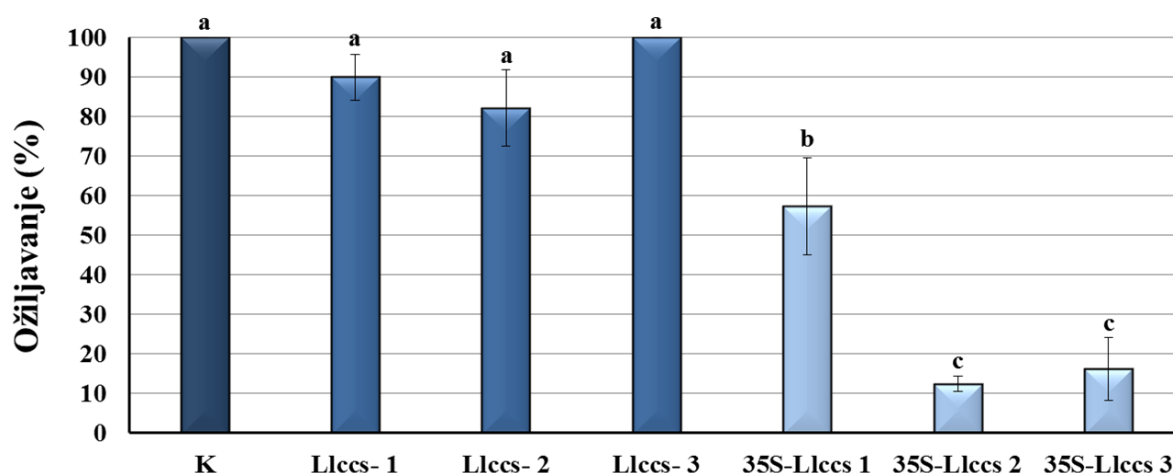
\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

U poređenju sa netransformisanom kontrolom, *Llccs*- transformisana linija 3 imala je značajno veći broj formiranih aksilarnih izdanaka po biljci (2,45). U okviru grupe *Llccs*-transformisanih linija jedino je linija 3 formirala veći broj izdanaka u odnosu na kontrolu. Značajno manji broj aksilarnih izdanaka u poređenju sa netransformisanom kontrolom, formiran kod *35S-Llccs* transformisane linije 3 (0,65). Broj aksilarnih izdanaka kod *35S-Llccs* 3 nije se značajno razlikovao od broja izdanaka formiranih kod druge dve linije, *35S-Llccs* 1 i *35S-Llccs* 2. Srednji broj nodusa po biljci bio je najveći kod *Llccs*- transformisane linije 3 (6,45). Značajno manji broj nodusa u odnosu na netransformisanu kontrolu formiran je kod *35S-Llccs* transformisanih linija 2 i 3 (4,30 odnosno 4,75). Kod ostalih testiranih transformisanih linija srednji broj nodusa po biljci nije se razlikovao od broja nodusa kod netransformisanih biljaka. Osim linije *Llccs*- 1, sve druge *Llccs*- i *35S-Llccs* transformisane linije su bile niže (29-32,75 mm) u odnosu na netransformisanu kontrolu (44,05 mm).

#### 4.10. Ožiljavanje izdanaka transformisanih linija *V. cornuta*

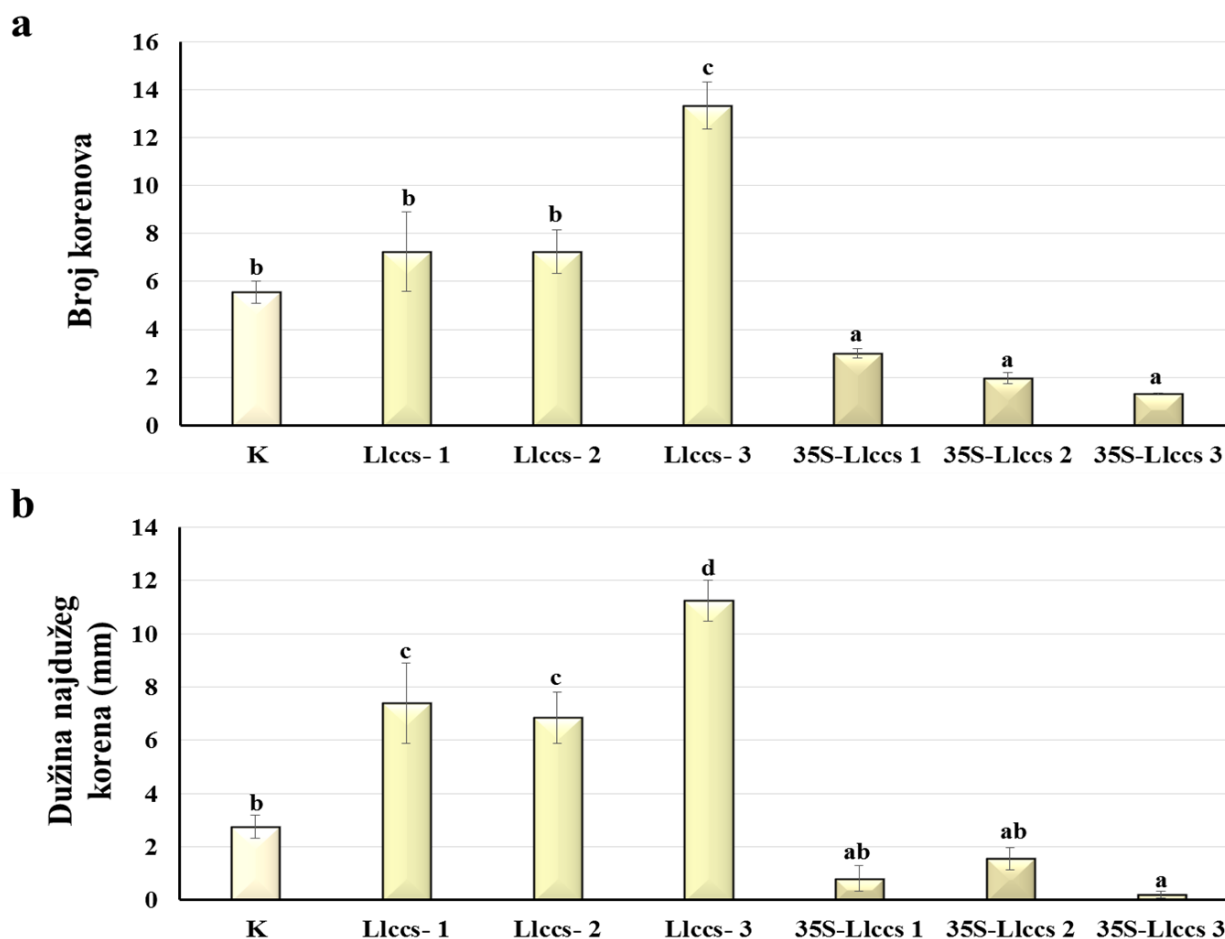
Netransformisani izdanci i izdanci transformisanih linija ožiljavani su na podlozi sa 0,1 mg/l NAA u uslovima dugog dana *in vitro*. Posle 7 nedelja gajenja izdanci *35S-Llccs* transformisanih linija ožiljeni su u značajno manjem procentu (12,42-57,35%) u odnosu na izdanke linija transformisanih "praznim vektorom" (82,2-100%) i netransformisanu kontrolu (100%) (Histogram 5). U okviru *35S-Llccs* grupe, transformisana linija 1 imala je značajno veći broj ožiljenih izdanaka

od linija 35S-*Llccs* 2 i 3. Između netransformisane kontrole (K) i linija transformisanih "praznim vektorom" (*Llccs*-), nije bilo značajnih razlika u procentu ožiljenih izdanaka.



**Histogram 5.** Ožljavanje netransformisane i transgenih linija *V. cornuta*. K: netransformisana kontrola; *Llccs*- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs* 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

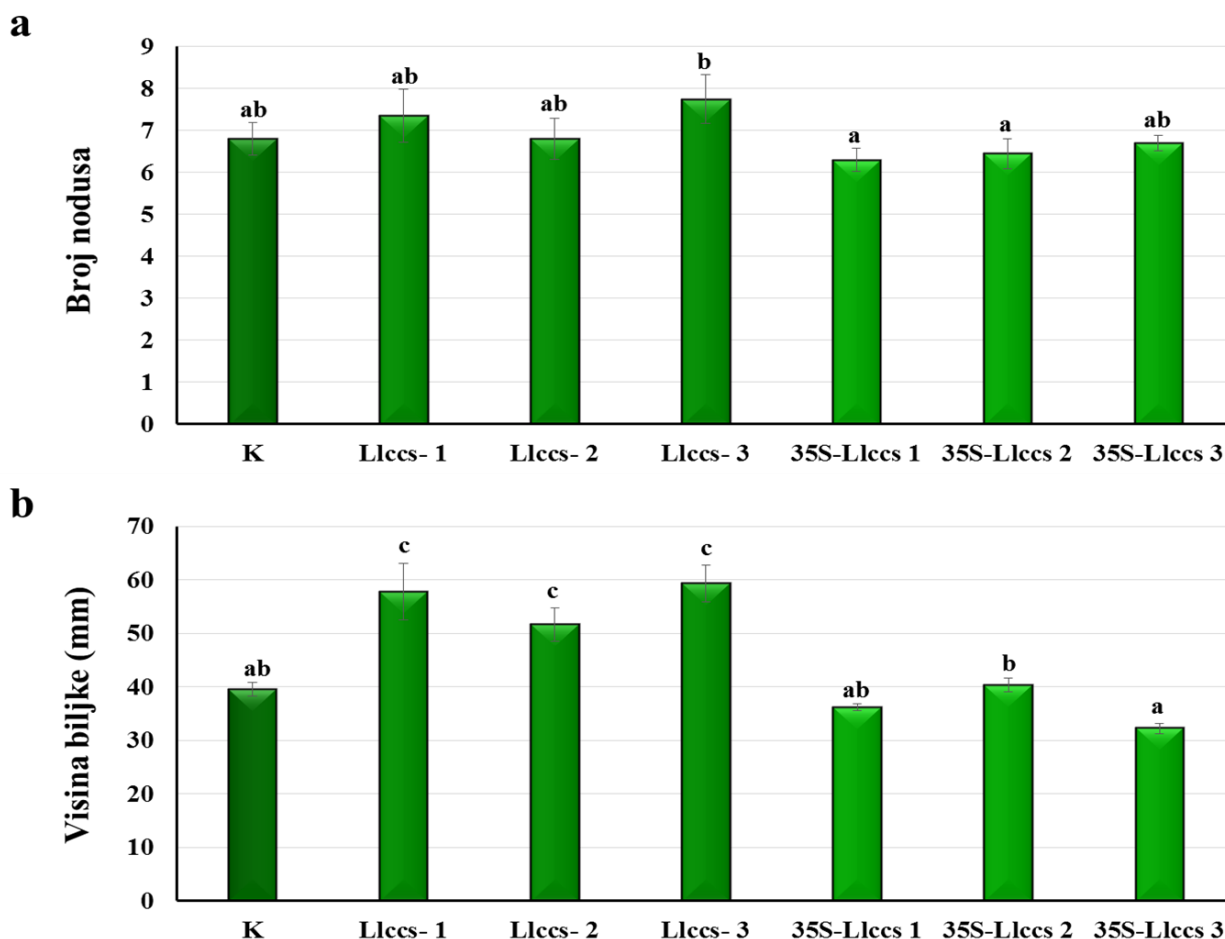
*Llccs*- transformisana linija 3 odlikovala se najvećim brojem korenova po ožiljenoj biljci (13,30). Ona je imala značajno veći broj korenova od netransformisane kontrole, kao i od svih drugih transformisanih linija. Sve tri 35S-*Llccs* transformisane linije formirale su značajno manji broj korenova po ožiljenoj biljci (1,3-3), u odnosu na netransformisanu kontrolu (5,55) i *Llccs*-transformisane linije (7,25-13,35) (**Histogram 6a**). Dužina najdužeg korena kod *Llccs*-transformisanih linija (6,85-11,25 mm) bila je značajno veća u odnosu na dužinu korena netransformisane kontrole (2,75 mm) i 35S-*Llccs* transformisanih linija (0,2-1,55 mm). *Llccs*-transformisana linija 3 imala je najduže korenove (11,25 mm). Nasuprot tome, korenovi 35S-*Llccs* transformisanih linija bili su značajno kraći (0,2-1,55 mm) od korenova netransformisane kontrole (2,75 mm) i *Llccs*- transformisanih linija (6,85-11,25 mm) (**Histogram 6b**).



**Histogram 6.** Parametri ožiljavanja *V. cornuta* nakon 7 nedelja gajenja na podlozi sa 0,1 mg/l NAA *in vitro*. **a** - broj korenova; **b** - dužina korena. K: netransformisana kontrola; Llccs- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-Llccs 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::Llccs::TNos vektorom. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova na istom histogramu ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Značajne razlike u srednjem broju nodusa po ožiljenoj biljci između transformisanih linija i netransformisane kontrole nisu postojale. Jedino je Llccs- transformisana linija 3 imala veći broj nodusa od 35S-Llccs transformisanih linija 1 i 2 (**Histogram 7a**). Posle 4 nedelje gajenja na podlozi za ožiljavanje izdanaka zabeležena je i razlika u visini ožiljenih biljaka. Biljke sve tri Llccs- transformisane linije bile su značajno više (51,7-59,3 mm) u odnosu na biljke netransformisane kontrole (39,6 mm) i 35S-Llccs transformisanih linija (32,3-40,4 mm). Srednja visina biljaka 35S-Llccs transformisanih linija nije se značajno razlikovala od netransformisane kontrole, ali je okviru 35S-Llccs grupe transformisanih linija postojala značajna razlika u visini biljaka između linija 35S-Llccs 2 i 35S-Llccs 3 (**Histogram 7b**).





**Histogram 7.** Parametri rasteња ožiljenih biljaka *V. cornuta* posle 7 nedelja gajenja na podlozi sa 0,1 mg/l NAA *in vitro*. **a** - broj nodusa po biljci; **b** - prosečna visina biljke. K: netransformisana kontrola; Llccs- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-Llccs 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova na istom histogramu ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.11. Aklimatizacija biljaka transformisanih linija *V. cornuta*

Procenat aklimatizovanih netransformisanih biljaka iznosio je 66,67% (Slika 23a), Llccs-transformisanih biljaka 79,18% (Slika 23b), a 35S-Llccs transformisanih biljaka 59,93% (Slika 23c).

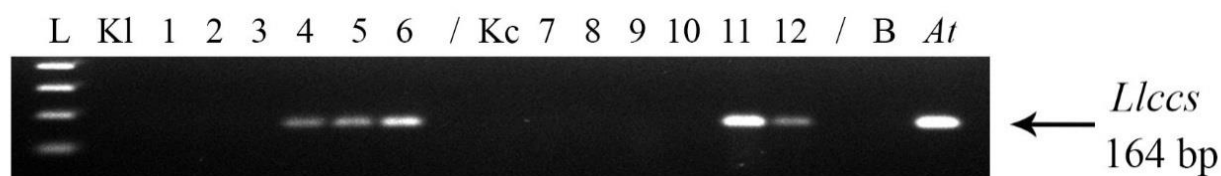


**Slika 23.** Aklimatizacija i cvetanje *V. cornuta*. **a-c** - aklimatizacija netransformisanih (K) i transformisanih biljaka (*Llccs*- i *35S-Llccs*); **d-f** - umnožavanje i formiranje cvetnih pupoljaka netransformisanih (K) i transformisanih biljaka (*Llccs*- i *35S-Llccs*); **g-h** - cvetni pupoljci netransformisane (K) i transformisanih biljaka (*Llccs*- i *35S-Llccs*); **j-l** - potpuno otvoreni cvet netransformisane (K) i transformisanih biljaka (*Llccs*- i *35S-Llccs*). Bar = 20 mm (a-c); 10 mm (d-l).

Aklimatizovane biljke su uspešno umnožene tokom zime u stakleniku (**Slika 23d-f**), a krajem zime počeli su da se formiraju cvetni pupoljci (**Slika 23g-i**). Cvetanje biljaka se odvijalo tokom proleća i leta (**Slika 23j-l**).

#### 4.12. Ekspresija *Llccs* gena

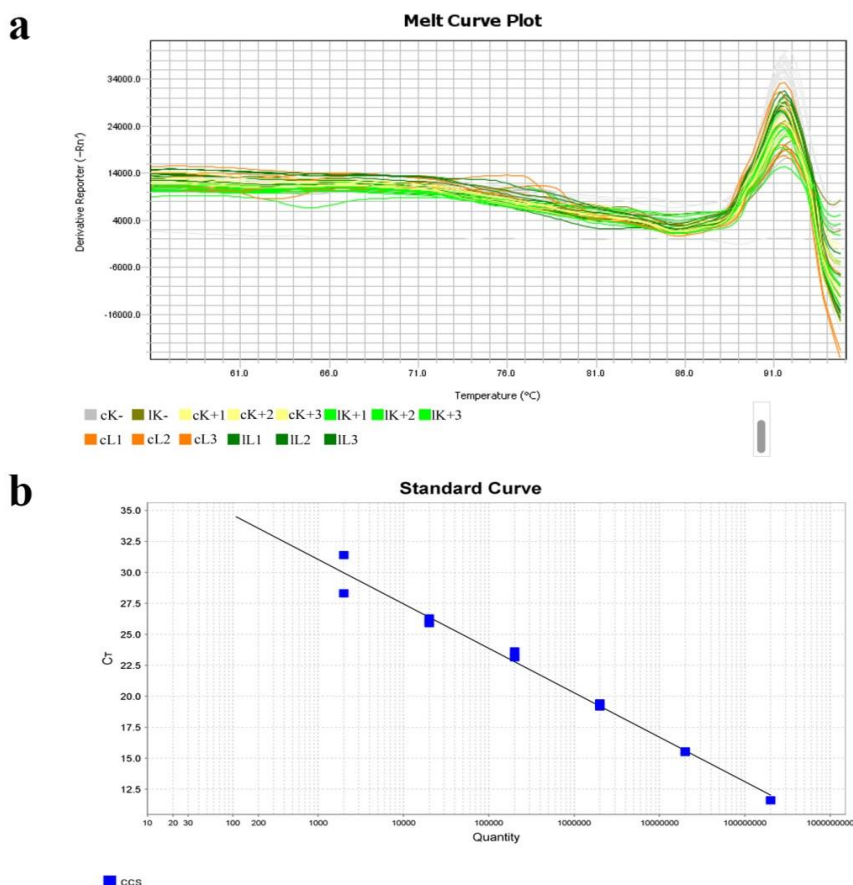
Potvrda ekspresije *Llccs* gena metodom RT-PCR izvršena je kod tri linije koje su dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom, kao i tri linije transformisane "praznim vektorom" koji je služio kao kontrola transformacije. Analizirana je RNK izolovana iz listova i krubičnih listića potpuno otvorenih cvetova aklimatizovanih transformisanih biljaka *V. cornuta*. Produkt amplifikacije transkripta veličine 164 bp iz kodirajućeg regiona *Llccs* gena detektovan je kod sva tri uzorka lista i dva uzorka cveta 35S-*Llccs* transformisanih biljaka (**Slika 24**). Odgovarajući produkt nije amplifikovan u uzorcima listova i cvetova netransformisane kontrole i *Llccs*- transformisanih biljaka.



**Slika 24.** Ekspresija *Llccs* gena u listovima i cvetovima biljaka transformisanih linija. L: DNK standard (100 bp DNA ladder); Kl: list netransformisane biljke (negativna kontrola); 1-3: listovi biljaka dobijeni transformacijom sa praznim vektorom; 4-6: listovi biljaka dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; Kc: cvet netransformisane biljke (negativna kontrola); 7-9: cvetovi biljaka dobijeni transformacijom sa "praznim vektorom"; 10-12: cvetovi biljaka dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; B: negativna kontrola PCR reakcije (blank); At: pozitivna kontrola (*A. tumefaciens*).

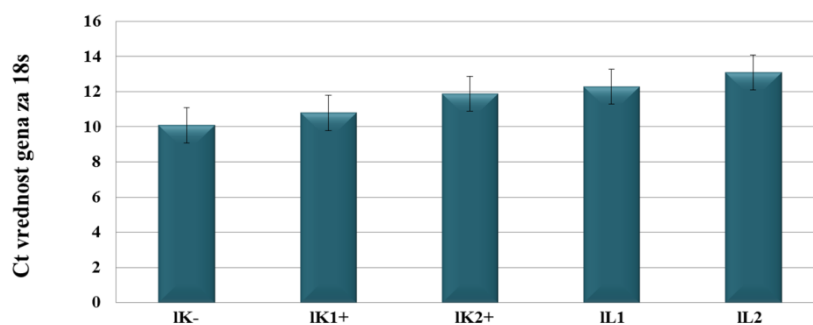
Nivo ekspresije gena za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*) određen je metodom kvantitativnog PCR-a. cDNK fragment *Llccs* gena dužine 164 bp odabranih netransformisanih i transformisanih uzoraka listova i krubičnih listića cvetova amplifikovan je na temperaturi od 56 °C. Specifičnost amplifikacije *Llccs* gena proverena je analizom krive topljenja čiji je maksimum iznosio oko 91,5 °C (**Slika 25a**).





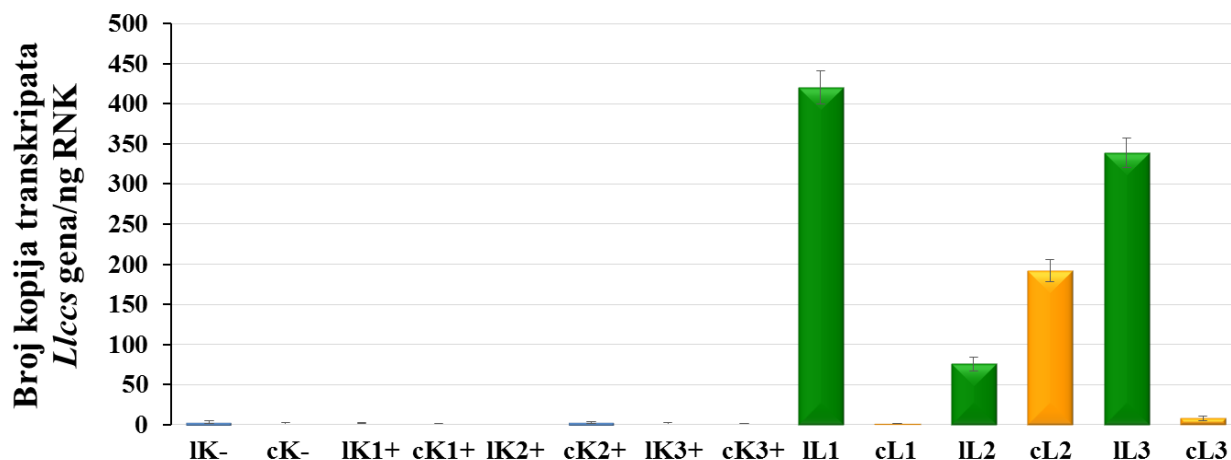
**Slika 25.** Primer specifične i efikasne amplifikacije *Llccs* gena. **a** - zbirne krive topljenja; **b** - standardna kriva. IK-: listovi netransformisanih biljkaka; cK-: cvetovi netransformisanih biljaka; IK1-3+: listovi biljaka dobijeni transformacijom sa "praznim vektorom"; cK1-3+: cvetovi biljaka dobijeni transformacijom sa praznim vektorom; IL1-3: listovi biljaka dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; cL1-3: cvetovi biljaka dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom.

Ujednačena količina ukupne cDNK na početku qPCR reakcije potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena za 18S rRNK (**Histogram 8**).



**Histogram 8.** Ct vrednosti gena za 18S rRNK za odabrane netransformisane i transformisane uzorke listova. IK- - list netransformisane kontrole; IK1+i IK2+ - listovi transformisane kontrole; IL1 i IL2 - transformisani listovi. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška).

qPCR analiza je pokazala nejednak nivo ekspresije *Llccs* gena u listovima i kruničnim listićima cvetova biljaka transformisanih linija. Broj kopija transkripata *Llccs* gena po ng RNK u listovima transformisanih biljaka varirao je od 76 do 420, dok je u cvetovima broj kopija transkripata po ng RNK varirao od 8 do 192 (**Histogram 9**).



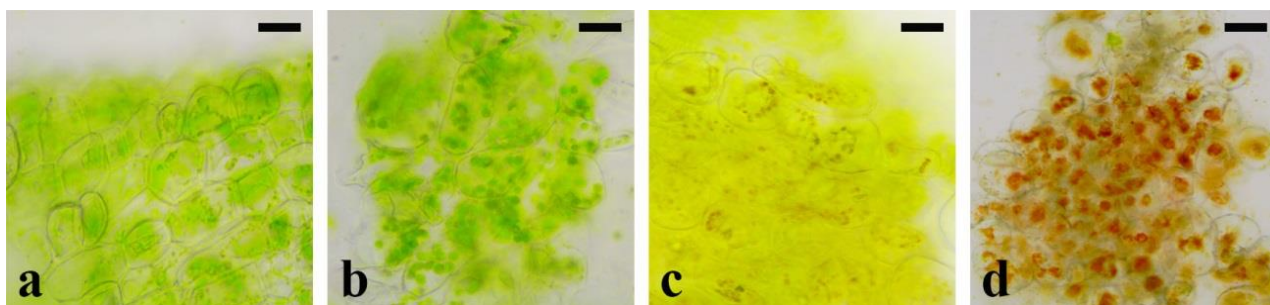
**Histogram 9.** Broj kopija transkripata *Llccs* gena u listovima (l) i kruničnim listićima cvetova (c) biljaka netransformirane kontrole (IK-, cK-), linija dobijenih transformacijom sa "praznim vektorom" (IK1-3+, cK1-3+) i linija dobijenih transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom (IL1-3, cL1-3). Broj kopija je izražen po nanogramu ukupne RNK. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška).

#### 4.13. Akumulacija karotenoida u kalusu i cvetovima *V. cornuta*

Nakon analize ekspresije *Llccs* gena urađene su analize pomoću kojih je pokazano da se u ćelijama transformisanih cvetova *V. cornuta* sintetiše i akumulira novi pigment kao rezultat aktivnosti kapsantin-kapsorubin-sintaze (CCS), enzima koji kodira ovaj gen.

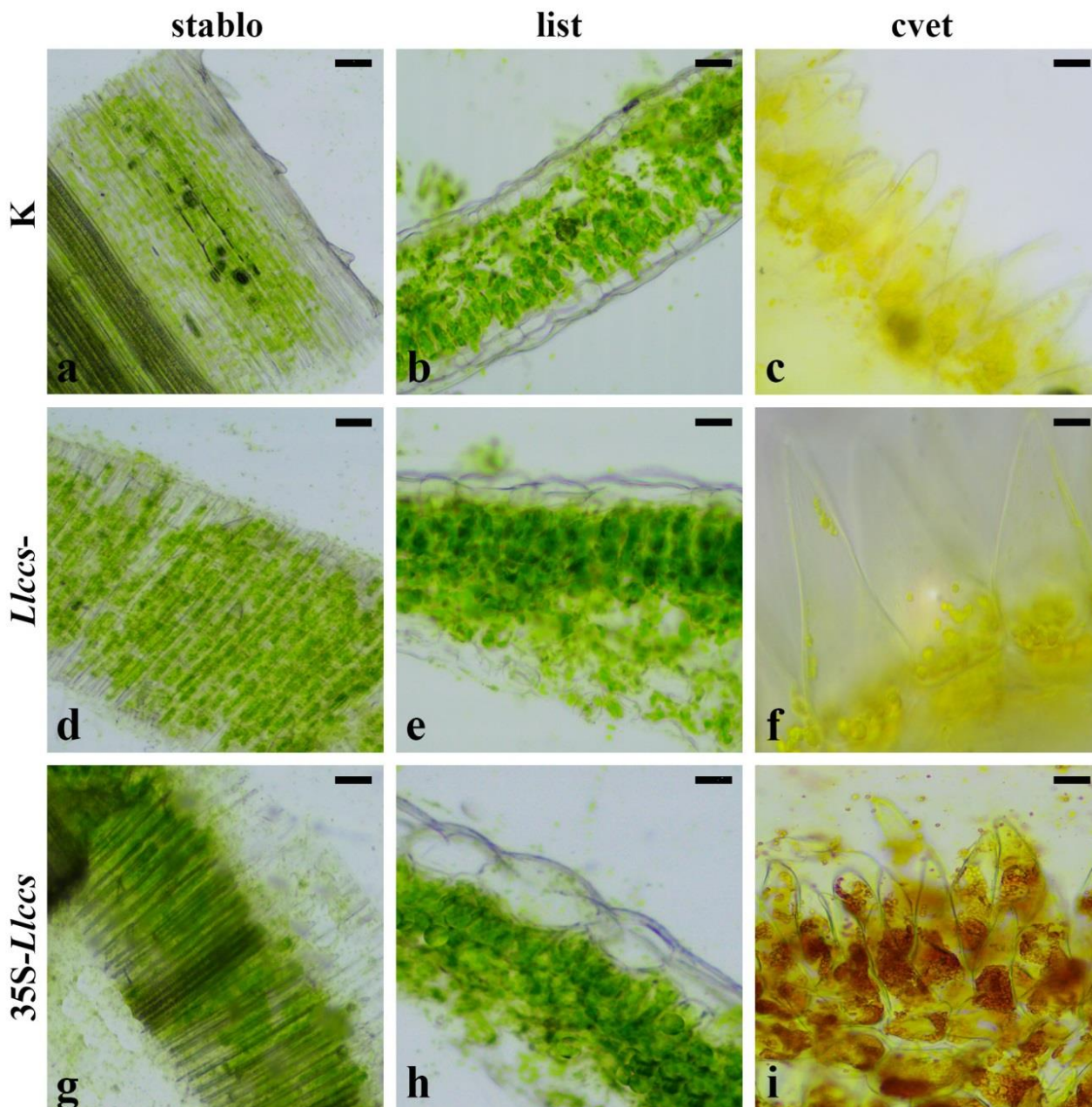
##### 4.13.1. Detekcija novosintetisanog pigmenta

Akumulacija pigmenata u ćelijama kalusnog tkiva gajenog u *in vitro* uslovima vizuelizovana je svetlosnom mikroskopijom. Kod netransformisanog kalusa (**Slika 26a**) i *Llccs*- transformisanog kalusa (**Slika 26b**), pod svetlosnim mikroskopom bile su vidljive ćelije kalusnog tkiva sa velikim brojem hloroplasta ispunjenih hlorofilom, koji je dao zelenu boju tkivu. U ćelijama transformisanog kalusa 35S-*Llccs* (**Slika 26c**) i PchsA-*Llccs* (**Slika 26d**) mogli su se uočiti hromoplasti ispunjeni novosintetisanim crvenim pigmentima.



**Slika 26.** Presek kalusa *V. cornuta*. **a** - netransformisani kalus; **b** - kalus dobijen transformacijom sa "praznim vektorom"; **c** - kalus dobijen transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom; **d** - kalus dobijen transformacijom sa pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos vektorom. Bar = 50 µm.

Pored analize kalusa urađena je analiza akumulacije pigmenata u stablu, listu i kruničnim listićima netransformisanih i transformisanih biljaka (**Slika 27**). Na uzdužnim presecima stabla netransformisanih (K, **Slika 27a**) i transformisanih biljaka (*Llccs*-, **Slika 27d** i 35S-*Llccs*, **Slika 27g**) bile su vidljive parenhimske ćelije bogate hloroplastima sa hlorofilom, kao i sprovodni elementi. Na poprečnim presecima listova netransformisanih (K, **Slika 27b**) i transformisanih biljaka (*Llccs*-, **Slika 27e** i 35S-*Llccs*, **Slika 27h**) bile su vidljive ćelije epidermisa, kao i ćelije palisadnog i sunderastog tkiva koje grade tkivo lista. Na presjecima stabla i listova svih analiziranih biljaka nisu uočene promene u boji tkiva.



**Slika 27.** Uzdužni i poprečni presecci stabla, lista i kruničnih listića cvetova netransformisanih i transformisanih biljaka *V. cornuta*. **a** - stablo netransformisane biljke; **b** - list netransformisane biljke; **c** - epidermalni sloj kruničnog listića cveta netransformisane biljke; **d** - stablo *Llccs*-transformisane biljke; **e** - list *Llccs*- transformisane biljke; **f** - epidermalni sloj kruničnog listića cveta *Llccs*- transformisane biljke; **g** - stablo 35S-*Llccs* transformisane biljke; **h** - list 35S-*Llccs* transformisane biljke; **i** - epidermalni sloj kruničnog listića cveta 35S-*Llccs* transformisane biljke. K: netransformisane biljke; *Llccs*-: biljke dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs*: biljke dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. Bar = 200  $\mu$ m (a, d, g); 100  $\mu$ m (b, e, h); 30  $\mu$ m (c, f, i).



Nasuprot tome, epidermalne ćelije kruničnih listića cvetova su se razlikovale po boji. U cvetovima kontrolnih biljaka (K, **Slika 27c** i *Llccs*-, **Slika 27f**) uočeni su hromoplasti u kojima je akumuliran pigment koji daje žutu boju cvetu. Epidermalne ćelije 35S-*Llccs* transformisanih cvetova (**Slika 27i**) bile su bogate hromoplastima sa akumuliranim crvenim pigmentom, koji je kruničnim listićima dao različite nijanse narandžaste boje.

U populaciji 35S-*Llccs* transformisanih linija (**Slika 28a** i **28b**) uočeni su i cvetovi koji su bili himerični. Pojedini cvetovi ovih biljaka su imali narandžastu boju, ali je na kruničnim listićima bila vidljiva i žuta pruga (**Slika 28c**). Cvetovi su analizirani svetlosnom mikroskopijom gde se mogla jasno uočiti granica epidermalnih ćelija u čijim hromoplastima su akumulirani žuti odnosno crveni pigmenti (**Slika 28d**).



**Slika 28.** Cvetovi transformisanih biljaka *V. cornuta* dobijeni transformacijom pomoću pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektora. **a** - cvet transformisane biljke; **b** - uzdužni presek kroz krunični listić transformisanog cveta; **c** - himerni transformisani cvet; **d** - presek kroz krunični listić transformisanog himernog cveta. Bar = 10 mm (a, c); 0,2 mm (b, d).

#### 4.13.2. Promene hromatičnosti u CIE L\*a\*b\* sistemu kod transformisanih cvetova

Merenjem hromatičnosti kruničnih listića cvetova aklimatizovanih netransformisanih, *Llccs*- i 35S-*Llccs* transformisanih biljaka pokazano da postoje statistički značajne razlike u udelu žute i crvene boje u cvetovima kontrolnih i transformisanih biljaka *V. cornuta*. Vrednosti svetloće boje (L\*), udeo žute boje (b\*) i nijansa boje (h\*) bile su značajno niže kod cvetova 35S-*Llccs* transformisanih biljaka nego kod cvetova kontrolnih biljaka (K i *Llccs*-). Udeo crvene boje (a\*) bio je značajno veći u cvetovima 35S-*Llccs* transformisanih biljaka u odnosu na kontrolne cvetove. Vrednosti čistoće boje (C\*) nisu se značajno razlikovale između ispitivanih cvetova (**Tabela 31**).

**Tabela 31.** Promene pokazatelja hromatičnosti u CIE L\*a\*b\* koordinatnom sistemu boja kruničnih listića cvetova netransformisanih i transformisanih biljaka *V. cornuta*.

Linija	L*	a*	b*	C*	h*
K*	78,32 ± 0,51 <sup>b**</sup>	-4,02 ± 0,83 <sup>a</sup>	71,06 ± 2,73 <sup>b</sup>	71,38 ± 2,71 <sup>a</sup>	93,83 ± 0,74 <sup>b</sup>
<i>Llccs</i> -	78,54 ± 0,51 <sup>b</sup>	-4,15 ± 1,07 <sup>a</sup>	70,88 ± 2,40 <sup>b</sup>	71,35 ± 2,34 <sup>a</sup>	94,26 ± 1,03 <sup>b</sup>
35S- <i>Llccs</i>	69,26 ± 0,29 <sup>a</sup>	13,22 ± 0,98 <sup>b</sup>	64,66 ± 0,65 <sup>a</sup>	66,40 ± 0,58 <sup>a</sup>	78,34 ± 0,89 <sup>a</sup>

\*K: cvetovi netransformisanih biljaka; *Llccs*-: cvetovi biljaka dobijeni transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs*: cvetovi biljaka dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom.

\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Promena u boji cvetova uočena je samo kod 35S-*Llccs* transformisanih biljaka *V. cornuta* (Slika 29). Cvetovi netransformisanih biljaka i biljaka dobijenih transformacijom sa "praznim vektorom" (*Llccs*-) imali su istu, žutu boju cvetova (Slika 29a i 29b). Razlike u intenzitetu boje bile su najizraženije u donjim kruničnim listićima (Slika 29c i 29d).



**Slika 29.** Cvetovi *V. cornuta*. **a** - žuti cvetovi kontrolnih (K i *Llccs*-) biljaka i narandžasti cvetovi 35S-*Llccs* transformisanih biljaka; **b** - netransformisani cvet (K) žute boje (donji) i 35S-*Llccs* transformisani cvet narandžaste boje (gornji); **c** - donji krunični listić žutog cveta netransformisane biljke; **d** - donji krunični listić narandžastog cveta 35S-*Llccs* transformisane biljke. Bar = 20 mm (a); 10 mm (b); 3 mm (c, d).

#### 4.13.3. HPLC analiza sadržaja ksantofila

Identifikacija i kvantifikacija nosintetisanog ksantofila urađena je pomoću HPLC metode. Pigmenti su ekstrahovani iz kruničnih listića potpuno otvorenih cvetova netransformisanih i transformisanih aklimatizovanih biljaka *V. cornuta*. Uz korišćenje odgovarajućeg standarda, u uzorcima 35S-*Llccs* transformisanih cvetova (35S-*Llccs* 1, 35S-*Llccs* 2, 35S-*Llccs* 3) identifikovan je pigment kapsantin čije je retenciono vreme bilo na 6,05 minuta (Slika 30).

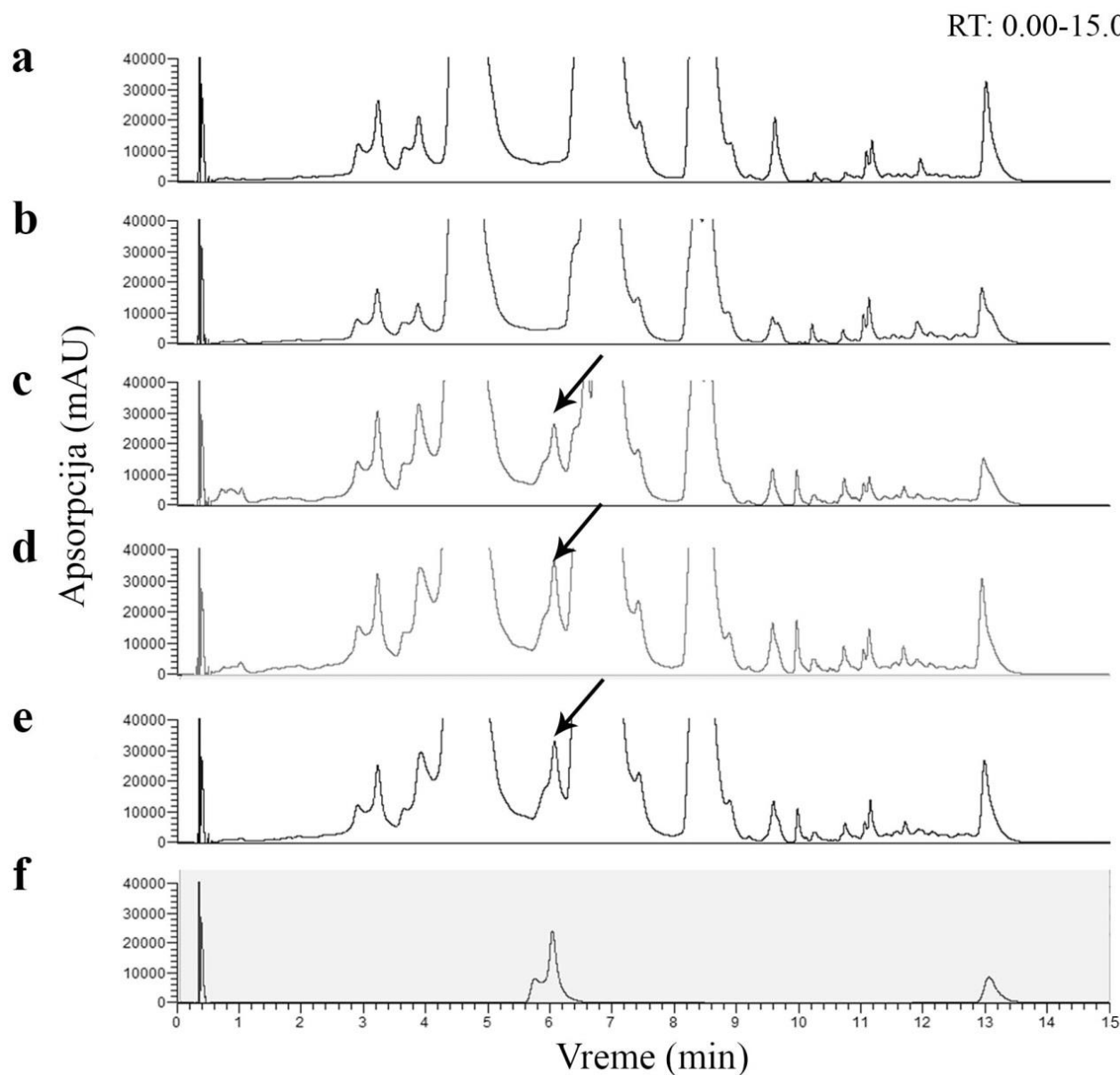
Sadržaj kapsantina u testiranim uzorcima 35S-*Llccs* transformisanih cvetova kretao se od 1,31-1,76 µg/g sveže mase (Tabela 32). U cvetovima netransformisanih biljaka, kao i u cvetovima *Llccs*- transformisanih biljaka, kapsantin nije identifikovan. Pigment kapsorubin nije identifikovan ni u jednom od testiranih uzoraka transformisanih cvetova.

**Tabela 32.** Sadržaj kapsantina (µg/g sveže mase biljnog tkiva) u saponifikovanim ekstraktima iz cvetova netransformisanih i transformisanih biljaka (35S-*Llccs*), određen na osnovu HPLC analize i poređenjem sa odgovarajućim standardom.

Linija	Kapsantin (µg/g)
K*	Nije detektovan
<i>Llccs</i> -	Nije detektovan
35S- <i>Llccs</i> 1	1,31
35S- <i>Llccs</i> 2	1,76
35S- <i>Llccs</i> 3	1,62

\*K: netransformisana kontrola; *Llccs*-: linija dobijena transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs* 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom.

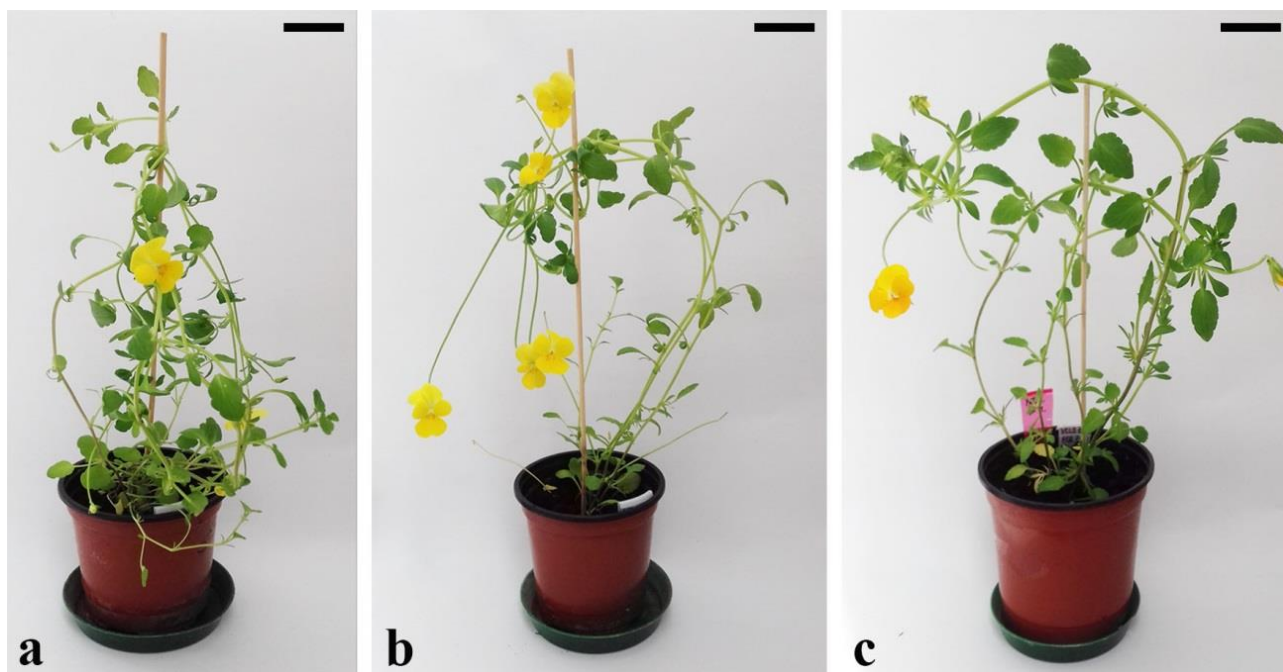




**Slika 30.** HPLC hromatogrami saponifikovanih ekstrakata kruničnih listića cvetova *V. cornuta*. **a** - netransformisani cvetovi (K); **b** - cvetovi dobijeni transformacijom sa "praznim vektorom" (*Llccs*-); **c-e** - cvetovi dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom (35S-*Llccs* 1-3); **f** - standard kapsantina. Crna strelica na hromatogramima c, d i e predstavlja maksimum koji odgovara kapsantinu.

#### 4.14. Fenotipske karakteristike transformisanih biljaka *V. cornuta*

Parametri morfoloških i fenotipskih karakteristika netransformisanih i transformisanih aklimatizovanih biljaka su mereni kod biljaka u fazi cvetanja (**Slika 31a-c**).



**Slika 31.** Cvetanje aklimatizovanih transformisanih biljaka *V. cornuta*. **a** - netransformisana biljka; **b** - biljka dobijena transformacijom sa "praznim vektorom"; **c** - biljka dobijena transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::Llccs::TNos vektorom. Bar = 20 mm.

Upoređene su fenotipske karakteristike biljaka (dužina i prečnik stabla, broj nodusa i bočnih grana, kao i dužina i širina listova) tri *Llccs*- i tri 35S-*Llccs* transformisane linije i netransformisanih biljaka (**Tabela 36**).

Dužina stabla transformisanih linija *Llccs*- 1 i *Llccs*- 2, i transformisanih linija 35S-*Llccs* 2 i 35S-*Llccs* 3 bila je značajno veća (36,28-42,33 mm) nego kod biljaka netransformisane kontrole (28,43 mm). Dužina stabla dve preostale transformisane linije (*Llccs*- 3 i 35S-*Llccs* 1) nije značajno odstupala od dužine stabla kontrolnih biljaka (**Tabela 33**).

Srednji broj nodusa po biljci bio je značajno veći kod *Llccs*- transformisanih linija 2 (11,86) i 3 (11,30), kao i kod 35S-*Llccs* transformisane linije 2 (10,68), u poređenju sa netransformisanom kontrolom (8,80). Među 35S-*Llccs* transformisanim linijama, linija 1 je imala manji broj nodusa od druge dve transformisane linije, 35S-*Llccs* 2 i 3.

Prečnik stabla sve tri 35S-*Llccs* transformisane linije (1,64-2,59 mm) i *Llccs*-transformisane linije 3 (1,54 mm) bio je značajno veći u odnosu na prečnik stabla netransformisanih biljaka (1,23 mm). Kod 35S-*Llccs* transformisanih linija postojale su značajne razlike u prečniku stabla između sve tri linije. 35S-*Llccs* transformisana linija 1 odlikovala se najmanjim prečnikom stabla (1,64 mm), dok je stablo 35S-*Llccs* transformisane linije 3 bilo najdeblje (2,59 mm).

Srednji broj formiranih bočnih grana odnosno aksilarnih izdanaka bio je izrazito varijabilan između ispitivanih linija i kretao se od 1,5 do 6,57 grana po biljci. U odnosu na netransformisanu kontrolu (2,40), *Llccs*- transformisane linije 2 i 3 (6,57 odnosno 6,40) imale su veći broj bočnih grana po biljci, kao i linija 35S-*Llccs* 2 (5,54). Između 35S-*Llccs* transformisanih linija, takođe je postojala razlika u broju formiranih bočnih grana. Linija 35S-*Llccs* 2 imala je veći broj bočnih grana (5,54) od transformisane linije 35S-*Llccs* 1 (1,50).

**Tabela 33.** Fenotipske karakteristike aklimatizovanih biljaka transformisanih linija *V. cornuta*.

Linija	Dužina stabla (mm)	Broj nodusa	Prečnik stabla (mm)	Broj bočnih izdanaka	Dužina lista (mm)	Širina lista (mm)
K*	28,43 ± 1,64 <sup>ab**</sup>	8,80 ± 0,39 <sup>ab</sup>	1,23 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,40 <sup>ab</sup>	28,20 ± 0,94 <sup>b**</sup>	12,31 ± 0,43 <sup>ab</sup>
<i>Llccs</i> - 1	42,33 ± 1,18 <sup>d</sup>	10,00 ± 0,62 <sup>bc</sup>	1,36 ± 0,06 <sup>ab</sup>	4,89 ± 0,54 <sup>bcd</sup>	27,55 ± 0,94 <sup>ab</sup>	10,44 ± 0,58 <sup>a</sup>
<i>Llccs</i> - 2	36,28 ± 1,02 <sup>cd</sup>	11,86 ± 0,77 <sup>c</sup>	1,33 ± 0,07 <sup>ab</sup>	6,57 ± 1,13 <sup>d</sup>	27,43 ± 1,54 <sup>ab</sup>	11,00 ± 0,72 <sup>ab</sup>
<i>Llccs</i> - 3	33,65 ± 0,62 <sup>bc</sup>	11,30 ± 0,58 <sup>c</sup>	1,54 ± 0,08 <sup>b</sup>	6,40 ± 0,91 <sup>d</sup>	24,10 ± 0,95 <sup>a</sup>	12,50 ± 0,79 <sup>ab</sup>
35S- <i>Llccs</i> 1	23,94 ± 2,97 <sup>a</sup>	7,87 ± 0,58 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,50 <sup>a</sup>	23,87 ± 1,35 <sup>a</sup>	12,00 ± 0,82 <sup>ab</sup>
35S- <i>Llccs</i> 2	40,54 ± 0,89 <sup>d</sup>	10,68 ± 0,30 <sup>c</sup>	1,97 ± 0,05 <sup>c</sup>	5,54 ± 0,59 <sup>cd</sup>	28,27 ± 0,61 <sup>b</sup>	13,79 ± 0,40 <sup>c</sup>
35S- <i>Llccs</i> 3	37,14 ± 2,79 <sup>cd</sup>	10,43 ± 0,37 <sup>bc</sup>	2,59 ± 0,10 <sup>d</sup>	3,14 ± 0,63 <sup>abc</sup>	27,86 ± 0,88 <sup>ab</sup>	16,57 ± 0,61 <sup>d</sup>

\*K: netransformisana kontrola; *Llccs*- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs* 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom.

\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,01$ ).

Dužina lista kod transformisanih linija *Llccs*-3 (24,10 mm) i 35S-*Llccs* 1 (23,87 mm) bila je manja od dužine lista netransformisanih biljaka (28,20 mm). Značajna razlika u dužini lista postojala je i između 35S-*Llccs* transformisanih linija. Linija 35S-*Llccs* 2 imala je duže listove od linije 35S-*Llccs* 1.

Širina lista je kod dve 35S-*Llccs* transformisane linije, 35S-*Llccs* 2 i 3 (13,79 odnosno 16,57 mm), bila značajno veća nego kod netransformisane kontrole (12,31 mm). Takođe, širina lista se među 35S-*Llccs* transformisanim linijama značajno razlikovala, pri čemu je linija 35S-*Llccs* 3 imala najšire listove (16,57 mm).

Pored fenotipskih karakteristika biljaka, urađena je uporedna analiza broja potpuno otvorenih cvetova i cvetnih pupoljaka, kao i veličine cvetova, tri *Llccs*- i tri 35S-*Llccs* transformisane linije sa netransformisanim biljkama (**Tabela 34**).

**Tabela 34.** Karakteristike cvetova kod transformisanih linija *V. cornuta*.

Linija	Broj cvetova	Broj cvetnih pupoljaka
K*	3,33 ± 0,70 <sup>c</sup>	4,60 ± 0,93 <sup>bc</sup>
<i>Llccs</i> -1	1,44 ± 0,24 <sup>ab</sup>	2,33 ± 0,73 <sup>ab</sup>
<i>Llccs</i> -2	1,00 ± 0,31 <sup>ab</sup>	1,28 ± 0,28 <sup>a</sup>
<i>Llccs</i> -3	1,80 ± 0,36 <sup>bc</sup>	2,50 ± 0,56 <sup>ab</sup>
35S- <i>Llccs</i> 1	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,51 <sup>a</sup>
35S- <i>Llccs</i> 2	0,18 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,42 <sup>a</sup>
35S- <i>Llccs</i> 3	3,28 ± 1,11 <sup>c</sup>	6,71 ± 0,94 <sup>c</sup>

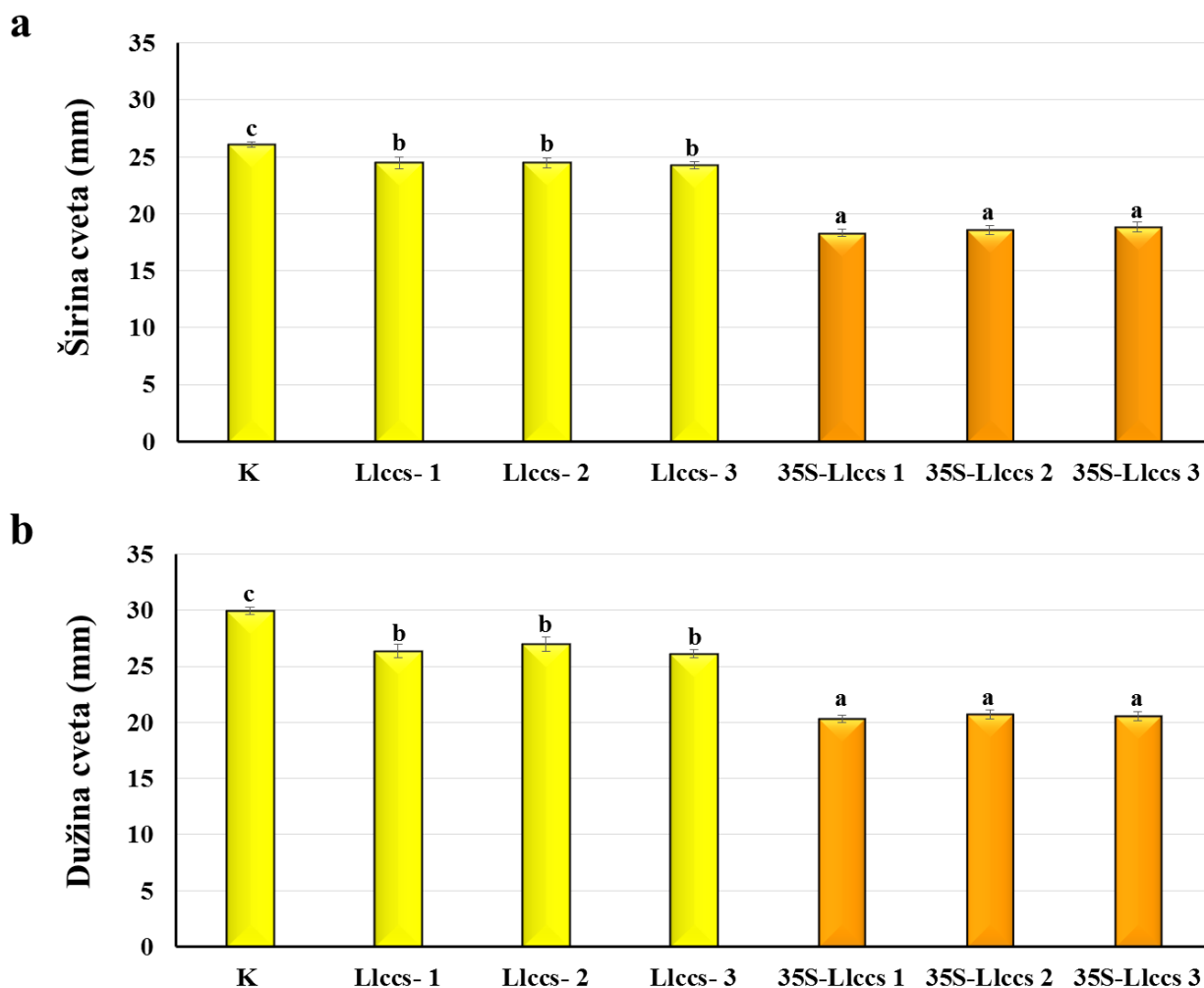
\*K: netransformisana kontrola; *Llccs*- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs* 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom.

\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,01$ ).

Broj cvetova i broj cvetnih pupoljaka kod aklimatizovanih netransformisanih biljaka i biljaka transformisanih linija *V. cornuta* bio je različit. Među biljkama transformisanim "praznim vektorom", dve transformisane linije, *Llccs*- 1 i 2, imale su značajno manji broj cvetova (1,00 odnosno 1,80) od netransformisane kontrole (3,33). Takođe, kod linija transformisanih *ccs* genom, linija 35S-*Llccs* 2 je imala manji broj otvorenih cvetova od netransformisane kontrole, a kod linije 35S-*Llccs* 1 otvorenih cvetova nije bilo. U okviru ove gupe, 35S-*Llccs* transformisana linija 3 imala je najveći broj otvorenih cvetova (3,28), koji se nije značajno razlikovao od broja cvetova netransformisanih biljaka (3,33).

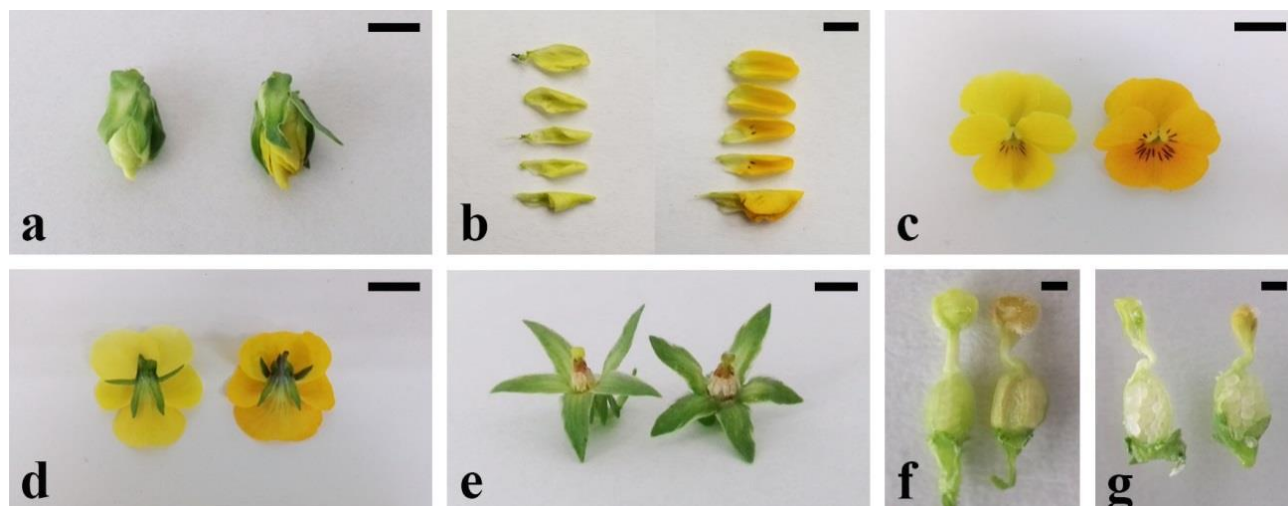
Broj cvetnih pupoljaka kod linije *Llccs*- 2 (1,28), kao i kod 35S-*Llccs* transformisanih linija 1 (0,87) i 2 (1,59) bio je značajno manji nego kod netransformisanih biljaka (4,60). Među svim transformisanim linijama, linija 35S-*Llccs* 3 imala je najveći broj pupoljaka (6,71) (**Tabela 37**).

Merenje dimenzija cvetova (njihove širine i dužine) ukazalo je i na postojanje statistički značajnih razlika u veličini cvetova netransformisanih i transformisanih biljaka (**Histogram 10**). 35S-*Llccs* transformisane linije imale su cvetove najmanje širine (18,33-18,85 mm). *Llccs*-transformisani cvetovi bili su veći od cvetova 35S-*Llccs* transformisanih linija, ali istovremeno manje širine (24,25-24,48 mm) od cvetova netransformisanih biljaka (26,08 mm) (**Histogram 10a**). I dužina cvetova 35S-*Llccs* transformisanih linija (20,30-20,72 mm) je bila najmanja u poređenju sa cvetovima *Llccs*- transformisanih linija (26,11-26,96 mm) i netransformisane kontrole (29,92 mm). Takođe, kao i kod širine cveta, dužina cvetova *Llccs*- transformisanih linija bila je veća od dužine cvetova 35S-*Llccs* linija, ali manja od netransformisanih cvetova (**Histogram 10b**).



**Histogram 10.** Dimenzije cvetova *V. cornuta*. **a** - širina cveta; **b** - dužina cveta. K: netransformisana kontrola; *Llccs*- 1-3: linije dobijene transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs* 1-3: linije dobijene transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. Vertikalne linije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (standardna greška). Različita slova ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika na osnovu Fišerovog LSD testa, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Već sa pojavom cvetnih pupoljaka zapaženo je da će između budućih cvetova netransformisanih biljaka i 35S-*Llccs* transformisanih biljaka postojati razlika u boji (**Slika 32a**). Krunični listići cvetnih pupoljaka netransformisanih biljaka bili su svetle žuto-zelene dok su 35S-*Llccs* transformisani cvetni pupoljci imali krunične listiće jarko žute boje (**Slika 32b**). Kada su se cvetovi u potpunosti otvorili razlika u boji bila je najuočljivija. Cvetovi netransformisanih biljaka su bili žute boje, dok su 35S-*Llccs* transformisane biljke imale cvetove u različitim nijansama narandžaste (**Slika 32c** i **32d**). Od cvetnih delova, žig tučka je, takođe, promenio boju iz svetlo zelene u svetlu narandžasto-braon boju (**Slika 32e-g**).

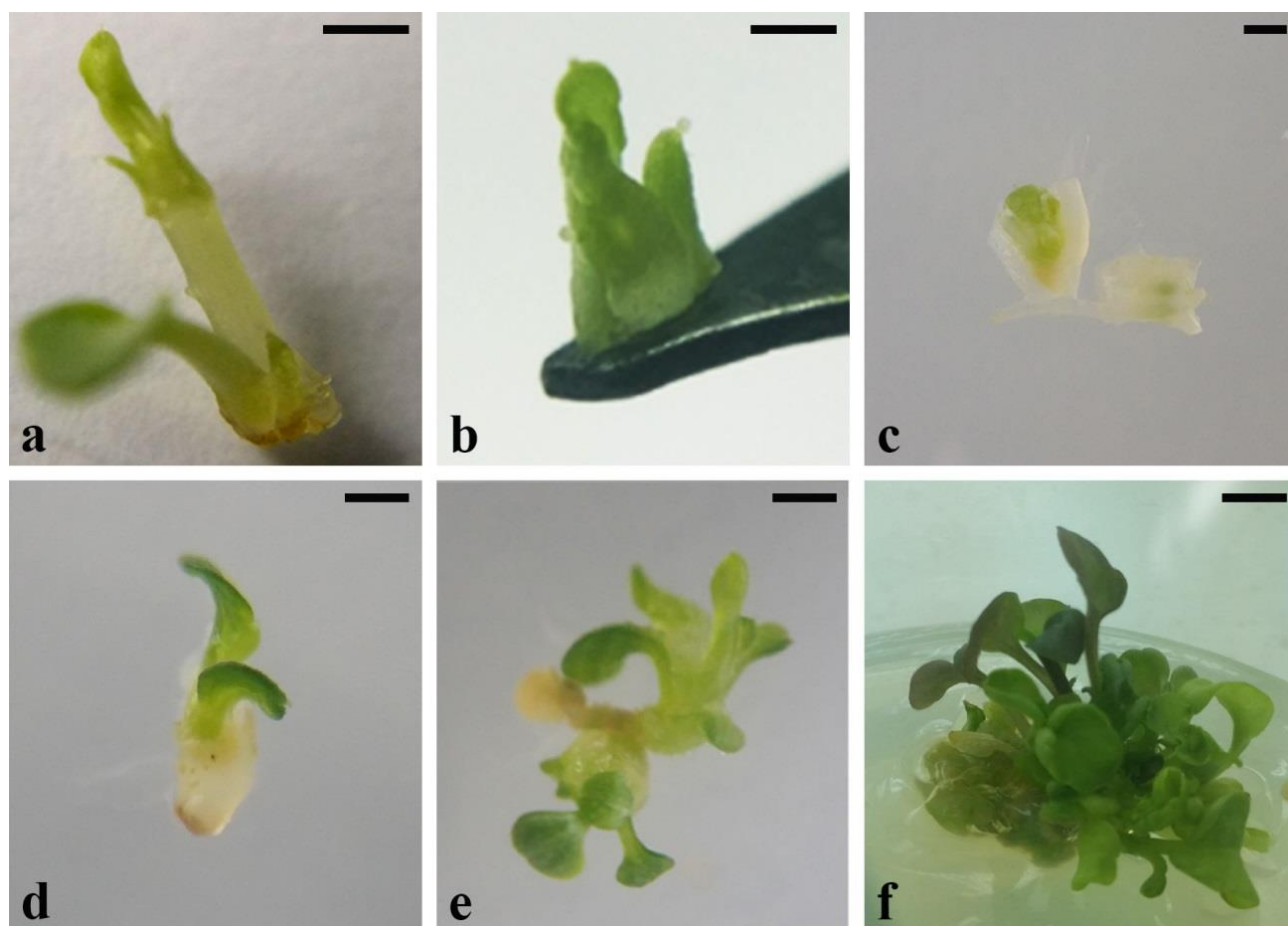


**Slika 32.** Cvetovi aklimatizovanih biljaka *V. cornuta*. **a** - cvetni pupoljci; **b** - potpuno otvoreni cvetovi; **c** - zadnja strana cvetova; **d** - cvetovi oslobođeni od kruničnih listića; **e** - izolovani krunični listići cvetnih pupoljaka; **f** - tučkovi; **g** - uzdužni presek kroz tučkove. Na svakoj pojedinačnoj slici, levo su cvetovi netransformisanih biljaka a desno cvetovi 35S-*Llccs* transformisanih biljaka. Bar = 1 mm (a, e, f, g); 3 mm (b, c, d).

#### 4.15. Krioprezervacija vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih linija *V. cornuta*

Mogućnost dugotrajnog čuvanja netransformisanih i transformisanih linija *V. cornuta* ispitana je metodama za krioprezervaciju vrhova izdanaka. Primenjena je metoda vitrifikacije koja podrazumeva hemijsku dehidrataciju vrhova izdanaka pre potapanja u tečni azot. Najpre je analizirana citotoksičnost rastvora za vitrifikaciju (PVS2 i PVS3), koji se najčešće koriste za osmotsku dehidrataciju tkiva pre zamrzavanja (**Tabela 35**). Vrhovi izdanaka netransformisanih (**Slika 33a** i **33b**) i *Llccs*- transformisanih biljaka *V. cornuta* su pokazali različitu osetljivost na PVS2 i PVS3 rastvore za vitrifikaciju. Kada su vrhovi izdanaka izlagani PVS2 rastvoru pre zamrzavanja u tečnom azotu, svi *Llccs*- transformisani vrhovi izdanaka su preživeli (100%) za razliku od vrhova izdanaka netransformisane kontrole (73,45%). Iako su *Llccs*- transformisane linije dobro podnosile izlaganje PVS2 rastvoru i brzo se oporavljale, njihovo preživljavanje je bilo drastično smanjeno posle izlaganja tečnom azotu kada je samo 8,58% vrhova izdanaka preživelo. Sa druge strane, preživljavanje vrhova netransformisanih (**Slika 33c**) i *Llccs*- transformisanih izdanaka je bilo veće kada su oni tretirani PVS3 rastvorom pre potapanja u tečni azot. Svi eksplantati su preživeli izlaganje PVS3 rastvoru pre izlaganja tečnom azotu (100%), kako netransformisani tako i transformisani sa "praznim vektorom" (*Llccs*-). Nakon otapanja iz tečnog azota preživljavanje vrhova se kretalo od 36,06% za *Llccs*- transformisane vrhove izdanaka, pa do 43,33% za vrhove izdanaka netransformisane kontrole (**Tabela 35**). Izdanci su se formirali iz apikalnih meristema bez kalusne faze (**Slika 33d** i **33e**). Rastenje i razvoj vrhova izdanaka u izdanke obezbedilo je potpuni oporavak i ponovno uspostavljanje kultura izdanaka posle 8 nedelja gajenja. Na osnovu ovih preliminarnih istraživanja je zaključeno da se PVS3 rastvor može uspešno primenjivati za krioprezervaciju kako netransformisanih tako i transformisanih linija *V. cornuta*.





**Slika 33.** Krioprezervacija vrhova izdanaka pomoću PVS3 rastvora *V. cornuta*. **a** - apikalni pupoljak; **b** - vrh apikalnog pupoljka koji se koristi za krioprezervaciju; **c** - vrh izdanaka 7 dana nakon otapanja iz LN; **d** - oporavak izdanaka posle 2 nedelje od otapanja; **e, f** - umnožavanje regenerisanih izdanaka. Bar = 5 mm (a, e, f); 3 mm (b, c, d).

**Tabela 35.** Preživljavanje vrhova izdanaka *V. cornuta* posle izlaganja PVS2 i PVS3 rastvoru.

Linija	Preživljavanje (%)			
	PVS2		PVS3	
	LN-	LN+	LN-	LN+
K*	73,45 ± 9,57 <sup>b**</sup>	22,72 ± 1,93 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	43,33 ± 12,01 <sup>a</sup>
Llccs-	100 <sup>a</sup>	8,58 ± 4,10 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	36,06 ± 9,39 <sup>a</sup>

\*K: netransformisani vrhovi izdanaka; Llccs-: vrhovi izdanaka dobijeni transformacijom sa "praznim vektorom". LN-: pre izlaganja tečnom azotu; LN+: posle izlaganja tečnom azotu.

\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

U cilju poboljšanja osnovnog protokola, ispitan je uticaj hladnog pretretmana na preživljavanje i dalje rastenje vrhova izdanaka posle krioprezervacije. Vrhovi izdanaka su gajeni 2 nedelje na temperaturi od 4 °C pre vitifikacije. Izdanci koji su bili na hladnom pretretmanu, nakon otapanja iz tečnog azota imali su dva puta veće preživljavanje (86,67%) u odnosu na netretirane izdanke (43,33%) (**Tabela 36**). Takođe, posle mesec dana od otapanja iz tečnog azota, regeneracija je bila za 1,6 puta veća kod prethodno hlađenih izdanaka.

**Tabela 36.** Uticaj hladnog pretretmana na preživljavanje i oporavak netransformisanih vrhova izdanaka *V. cornuta* izlaganih PVS3 rastvoru pre (LN-) i posle (LN+) krioprezervacije.

Hladni pretretman	Preživljavanje (%)		Oporavak (%)	
	LN-*	LN+	LN-	LN+
-	100 <sup>a**</sup>	43,33 ± 12,01 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	39,72 ± 1,21 <sup>a</sup>
2 nedelje	100 <sup>a</sup>	86,67 ± 6,67 <sup>b</sup>	95,83 ± 4,16 <sup>a</sup>	64,08 ± 3,02 <sup>b</sup>

\*LN-: pre izlaganja tečnom azotu; LN+: posle izlaganja tečnom azotu.

\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Dalja optimizacija protokola za krioprezervaciju transformisanih linija je bila u pravcu ispitivanja uticaja dužine izlaganja PVS3 rastvoru (**Tabela 37**) kao i uticaj koncentracije saharoze u pripremnom rastvoru (**Tabela 38**) na preživljavanje (1 nedelja) i oporavak vrhova izdanaka (4 nedelje) posle krioprezervacije.

Uticaj dužine trajanja izlaganja vrhova izdanaka PVS3 rastvoru praćena je kod 7 transformisanih linija koje su dobijene transformacijom sa "praznim vektorom". Vrhovi izdanaka *Llccs*- transformisanih linija dobro su podnosili izlaganje PVS3 rastvoru do 60 min, lako su se oporavljali i nije bilo negativnih efekata na dalje rasteenje i gajenje. Preživljavanje izdanaka se nije razlikovalo sedam dana posle otapanja iz tečnog azota, ali su značajne razlike uočene u sposobnosti potpunog oporavka i regeneracije izdanaka posle 4 nedelje gajenja. Najveći oporavak vrhova izdanaka nakon krioprezervacije (70,83%) bio je kada su vrhovi izdanaka izlagani PVS3 rastvoru u trajanju od 45 minuta (**Slika 34a**).

**Tabela 37.** Uticaj dužine izlaganja PVS3 rastvoru na preživljavanje (1 nedelja) i dalji oporavak vrhova izdanaka (4 nedelje) *Llccs*- transformisanih linija *V. cornuta* pre (LN-) i posle (LN+) krioprezervacije.

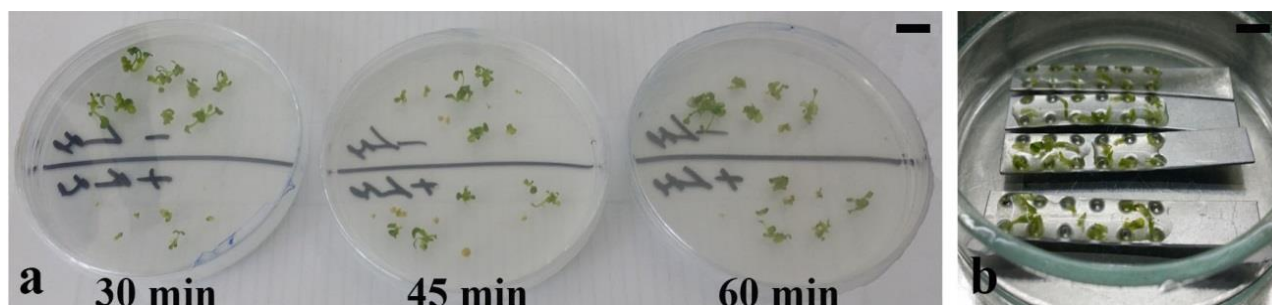
Trajanje tretmana (min)	LN-		LN+	
	Preživljavanje (%)	Oporavak (%)	Preživljavanje (%)	Oporavak (%)
30	100,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	91,66 ± 8,33 <sup>a</sup>	49,70 ± 11,31 <sup>a</sup>	44,80 ± 2,89 <sup>a</sup>
45	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	74,00 ± 9,78 <sup>a</sup>	70,83 ± 5,06 <sup>b</sup>
60	96,67 ± 3,33 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	63,13 ± 9,47 <sup>a</sup>	63,73 ± 11,10 <sup>ab</sup>

\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Povećanje koncentracije saharoze u pripremnom rastvoru dovelo je do smanjenja preživljavanja i oporavka izdanaka posle otapanja iz tečnog azota (**Tabela 38**). Pri koncentraciji saharoze od 0,4 M u pripremnom rastvoru, koja se najčešće i koristi u pripremnim rastvorima, nakon otapanja iz tečnog azota dobijen je najveći procenat preživljavanja i regeneracije krioprezerviranih vrhova *Llccs*- transformisanih izdanaka.



Na osnovu dobijenih rezultata testiranjem različitih parametara uspostavljen je protokol za krioprezervaciju vrhova izdanaka *V. cornuta* tehnikom vitrifikacije sa PVS3. Protokol je potom optimizovan sa metodom vitrifikacije sa PVS3 sa krio pločicama (Slika 34b).



**Slika 34.** Krioprezervacija *LlcS*- transformisanih biljaka *V. cornuta* tehnikom V krio pločica. **a** - tretman PVS3 rastvorom; **b** - vrhovi izdanaka na alumunijumskim pločicama. Bar = 20 mm (a, b).

**Tabela 38.** Uticaj sadržaja saharoze u pripremnom rastvoru na preživljavanje (1 nedelja) i oporavak (4 nedelje) vrhova izdanaka *LlcS*- transformisanih linija *V. cornuta* pre (LN-) i posle (LN+) krioprezervacije.

Koncentracija saharoze (M)	LN-		LN+	
	Preživljavanje (%)	Oporavak (%)	Preživljavanje (%)	Oporavak (%)
0	100,00 ± 0,00 <sup>a*</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	15,50 ± 8,67 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
0,4	95,83 ± 4,16 <sup>a</sup>	95,83 ± 4,16 <sup>ac</sup>	80,50 ± 4,22 <sup>d</sup>	52,50 ± 9,46 <sup>d</sup>
0,6	94,43 ± 5,56 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	35,00 ± 8,66 <sup>abc</sup>	26,66 ± 13,33 <sup>a-d</sup>
0,8	91,66 ± 8,33 <sup>a</sup>	77,14 ± 11,89 <sup>bcd</sup>	39,80 ± 7,57 <sup>ac</sup>	35,00 ± 7,65 <sup>b-d</sup>
1,0	90,47 ± 16,50 <sup>a</sup>	90,00 ± 10,00 <sup>abc</sup>	56,54 ± 7,95 <sup>c</sup>	49,81 ± 8,43 <sup>cd</sup>
1,2	90,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	88,56 ± 5,94 <sup>abc</sup>	41,10 ± 10,91 <sup>ac</sup>	15,10 ± 2,65 <sup>ab</sup>
1,4	88,90 ± 11,10 <sup>a</sup>	72,50 ± 6,11 <sup>bd</sup>	30,93 ± 1,36 <sup>ab</sup>	23,80 ± 12,59 <sup>abc</sup>
1,6	86,66 ± 13,33 <sup>a</sup>	65,71 ± 3,29 <sup>d</sup>	27,75 ± 3,20 <sup>ab</sup>	16,20 ± 11,12 <sup>ab</sup>

\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Primenom obe metode (vitrifikacija sa PVS3 rastvorom i V krio pločica), oporavak vrhova izdanaka kod *LlcS*- i *35S-LlcS* transformisanih biljaka bio je značajno manji nego kod biljaka netransformisane kontrole, kako pre, tako i posle izlaganja tečnom azotu (**Tabela 39**). Najmanji oporavak izdanaka je postignut kod *35S-LlcS* transformisanih biljaka kod kojih je integrisan gen za kapsantin-kapsorubin-sintazu i iznosio je 21,85% kada je primenjena metoda vitrifikacije sa PVS3, odnosno 21,78% kada su korišćene krio pločice.

**Tabela 39.** Oporavak biljaka posle krioprezervacije vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih linija *V. cornuta* vitrifikacijom sa PVS3 rastvorom i PVS3 rastvorom i krio pločicama.

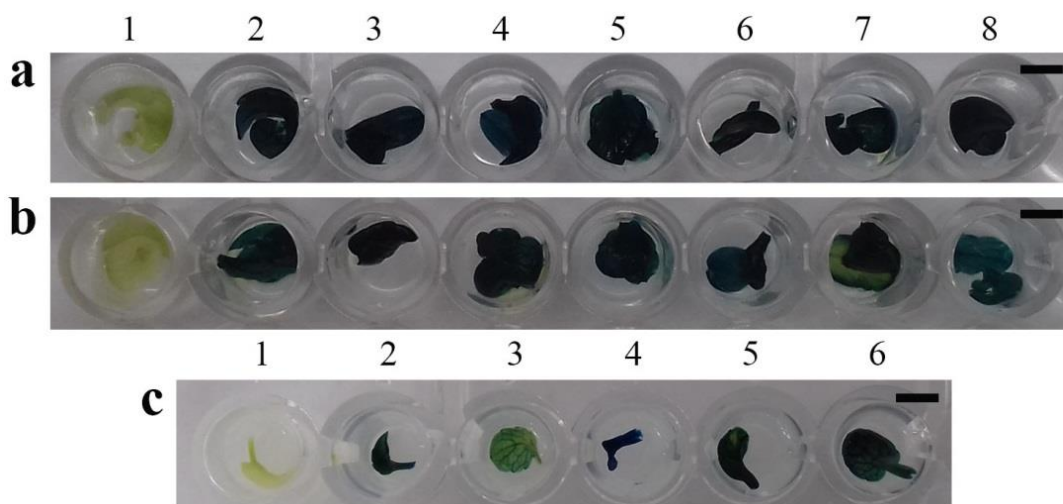
Linija	Metod krioprezervacije			
	PVS3		PVS3 i krio pločice	
	LN-	LN+	LN-	LN+
K*	94,00 ± 2,32 <sup>b**</sup>	64,53 ± 1,77 <sup>c</sup>	97,16 ± 2,00 <sup>c</sup>	77,12 ± 5,51 <sup>c</sup>
<i>Llccs</i> -	86,77 ± 3,40 <sup>b</sup>	51,57 ± 6,28 <sup>b</sup>	61,62 ± 8,55 <sup>b</sup>	56,27 ± 3,97 <sup>b</sup>
35S- <i>Llccs</i>	26,77 ± 2,32 <sup>a</sup>	21,85 ± 2,66 <sup>a</sup>	25,82 ± 1,47 <sup>a</sup>	21,78 ± 4,34 <sup>a</sup>

\*K: netransformisani izdanci; *Llccs*-: izdanci transformisani sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs*: izdanci transformisani sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom.

LN-: pre izlaganja tečnom azotu, LN+: posle izlaganja tečnom azotu.

\*\*Podaci u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Srednje vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Fišerovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ ).

Obe grupe transformisanih biljaka (*Llccs*- i 35S-*Llccs*) regenerisanih posle krioprezervacije bile su podvrgnute histohemijskom GUS bojenju radi potvrde prisustva transgena. U svim testiranim uzorcima je bila uočena plava boja tkiva lista kao rezultat ekspresije *uidA* reporterskog gena (Slika 35).

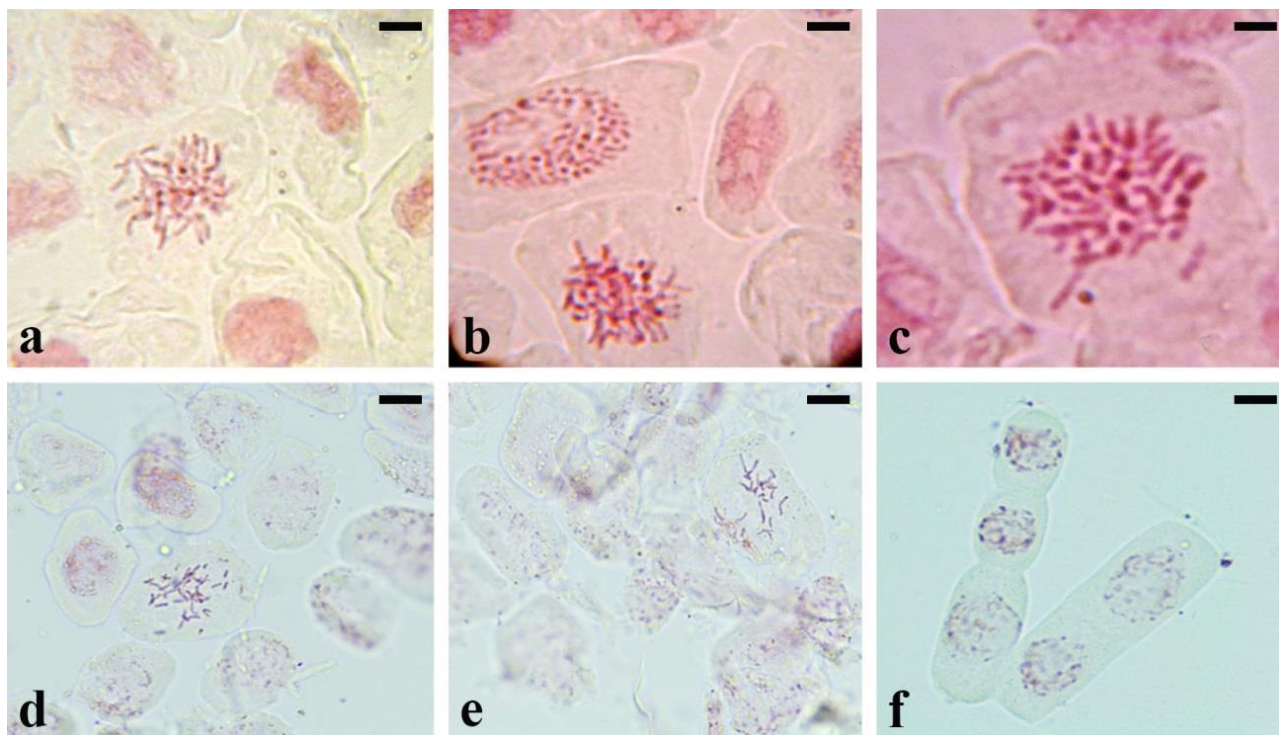


**Slika 35.** Ekspresija *uidA* gena u transformisanim listovima *V. cornuta*. **a** - ekspresija *uidA* gena u *Llccs*- transformisanim listovima pre krioprezervacije; **b** - ekspresija *uidA* gena u *Llccs*- transformisanim listovima posle krioprezervacije (1: list netransformisane biljke, 2-8: listovi različitih transformisanih linija); **c** - ekspresija *uidA* gena u 35S-*Llccs* transformisanim listovima nakon krioprezervacije (1: list netransformisane biljke, 2-6: listovi različitih transformisanih linija). *Llccs*-: listovi biljaka dobijeni transformacijom sa "praznim vektorom"; 35S-*Llccs*: listovi biljaka dobijeni transformacijom sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom. Bar = 5 mm (a-c).

#### 4.16. Analiza nivoa ploidnosti regenerisanih biljaka *V. cornuta*

Nivo ploidnosti regenerisanih biljaka *V. cornuta* utvrđen je upoređivanjem broja hromozoma u ćelijama vrha korena biljaka dobijenih iz semena (Slika 36a) i biljaka regenerisanih u kulturi *in vitro* (Slika 36b). Upoređena je ploidnost regenerisanih netransformisanih biljaka posle

krioprezervacije (Slika 36c), kao i transformisanih biljaka pre (Slika 36d i 36e) i posle krioprezervacije (Slika 36f) sa . Kod svih ispitivanih biljaka utvrđen je isti broj hromozoma u ćelijama vrha korena ( $2n=2x=22$ ).



**Slika 36.** Ćelije korenke kape netransformisanih i transformisanih biljaka *V. cornuta* sa vidljivim hromozomima u različitim fazama. **a** - metafazni hromozomi ćelija klijanaca; **b** - metafazni hromozomi biljaka regenerisanih u kulturi *in vitro*; **c** - metafazni hromozomi biljaka regenerisanih nakon krioprezervacije; **d** - metafazni hromozomi ćelija *Llccs*- transformisanih biljaka pre krioprezervacije; **e** - metafazni hromozomi ćelija *35S-Llccs* transformisanih biljaka pre krioprezervacije; **f** - interfazni hromozomi ćelija *Llccs*- transformisanih biljaka posle krioprezervacije. Bar = 40  $\mu\text{m}$  (a, b); 20  $\mu\text{m}$  (c); 100  $\mu\text{m}$  (d, e, f).

Uspostavljeni protokol za regeneraciju, genetičku transformaciju i krioprezervaciju *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' omogućio je dobijanje biljaka sa stabilnim nivoom ploidnosti. Proces genetičke transformacije i čuvanje na ultra niskoj temperaturi ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) nisu izazvali promene u broju hromozoma.

## 5. DISKUSIJA

Primena različitih tehnika kulture *in vitro* može doprineti efikasnijem razmnožavanju ukrasnih, lekovitih, retkih i ugroženih biljnih vrsta, kao i očuvanju njihovog genskog fonda. Važan preduslov za aplikaciju brojnih savremenih biotehnoloških postupaka za oplemenjivanje biljaka je upravo razvoj efikasnog protokola za regeneraciju biljaka u kulturi *in vitro* (Chandana i sar., 2018). U ovoj doktorskoj disertaciji prvi put je uspostavljen protokol za regeneraciju biljaka *V. cornuta* L. 'Lutea Splendens' koji je, istovremeno, bio i neophodan za njenu uspešnu genetičku transformaciju.

### 5.1. Klijanje semena *V. cornuta*

Vrste roda *Viola* sp. pokazuju različite zahteve za klijanje semena u kulturi *in vitro* (Mitchell i sar., 2000; Li i sar., 2010; Mokhtari i sar., 2016), tako da semena nekih vrsta lako kličaju i na vlažnom filter papiru dok je kod drugih neophodna čvrsta hranljiva podloga (Li i sar., 2010; Blidar i Ilea, 2014). Pored toga, i kultivari iste vrste mogu pokazivati različitu sposobnost klijanja pri istim uslovima. Na primer, dok je u našim preliminarnim eksperimentima posle 4 nedelje gajenja na vlažnom filter papiru dobijen nizak stepen klijanja semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' (10%), semena *V. cornuta* cv. 'Perfection' su kličala u znatno većem procentu (87,6%) pri istim uslovima i za isto vreme (Mitchell i sar., 2000).

Značajno povećanje klijanja *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' u kulturi *in vitro* postignuto je gajenjem semena na čvrstim MS hranljivim podlogama. Posle 4 nedelje gajenja na sobnoj temperaturi kličalo je od 30% do 41,25% semena, u zavisnosti od hranljive podloge (**Histogram 1**). Za isti vremenski period i pri istim uslovima semena *V. wittrockiana* su pokazala znatno veću sposobnost klijanja, kada je za prvih deset dana kličalo 80% (Blidar i sar., 2016). Međutim, neke vrste roda *Viola* kao što je *V. baoshanensis* su pokazale niži stepen klijanja (21%) nakon iste dužine gajenja na čvrstoj hranljivoj podlozi (Li i sar., 2010). U nedavnim istraživanjima veliki procenat (85%) klijanja semena dva kultivara *Viola wittrockiana*, Matrix F1 'Red Blotch' i 'Blue Blotch', postignut je gajenjem i na tečnoj MS podlozi sa sterilnim filter papirom. Procenat klijanja semena nije se značajno razlikovao pri gajenju na čvrstim podlogama, ali je pokazan pozitivan efekat na izduživanje korena i hipokotila, što je važno kod pripreme biljaka za subkultivaciju ili eventualnu aklimatizaciju u stakleniku (Blidar i Ilea, 2014; Blidar i sar., 2016).

Koncentracija mineralnih soli u MS podlogama može imati uticaja na klijanje semena u kulturi *in vitro*, tako da semena nekih biljnih vrsta bolje kličaju na podlogama sa smanjenom koncentracijom mineralnih soli (Huh i sar., 2016). Naši rezultati su pokazali da i kod *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' posle 12 nedelja gajenja, smanjenje koncentracije mineralnih soli u MS podlozi ima značajan uticaj na klijanje semena ovog kultivara. Nije uočen pozitivan efekat GA<sub>3</sub> na klijanje semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens'. Giberelini utiču na klijanje semena i smatra se da mogu zameniti stratifikaciju niskom ili visokom temperaturom u cilju prekida dormancije (Gupta i Chakrabarty, 2013; Miransari i Smith, 2014; Fišer Pečnikar i sar., 2018). Procenat klijanja semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' na MS podlozi bez regulatora rastenja i MS podlozi obogaćenoj sa GA<sub>3</sub> nije se značajno razlikovao. Mogući razlog izostanka pozitivnog efekta GA<sub>3</sub> na klijanje semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' može biti relativno niska koncentracija ovog regulatora rastenja (0,1 mg/l) u MS hranljivoj podlozi. Biljne vrste mogu biti različito osetljive prema GA<sub>3</sub>, tako semena nekih biljaka kličaju na hranljivim podlogama pri koncentraciji GA<sub>3</sub> od 1 mg/l dok druge zahtevaju i do sto puta veću koncentraciju ovog regulatora rastenja (Cerabolini i sar., 2004).

Za razliku od hranljive podloge, temperatura utiče na klijanje semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' u kulturi *in vitro*. Semena *V. cornuta* 'Lutea Splendens' ne kličaju posle 4 nedelje gajenja na niskoj temperaturi (4°C) (**Slika 9**). Slični rezultati dobijeni su za *V. cornuta* cv. 'Perfection' gde je izlaganje niskoj temperaturi imalo negativan efekat na klijanje semena (Mitchell i sar., 2000). Ipak, sa produženim gajenjem od 8 i 12 nedelja dolazi do značajnog povećanja klijanja semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' na nižim temperaturama. Najveće povećanje (40-44%) u

odnosu na period od 4 nedelje je detektovano kada su semena gajena na temperaturi od 10 °C 8 nedelja. Istovremeno, došlo je i do značajnog povećanja (33-41%) klijanja semena pri niskoj temperaturi od 4°C. Viši procenat klijanja semena *V. cornuta* cv. 'Lutea Splendens' na 10°C nije neočekivan rezultat pošto je ova temperatura prisutna u regionima gde ova biljna vrsta prirodno raste. Sličan pozitivan efekat temperature od 10°C na klijanje semena u uslovima *in vitro* zapažen je i kod drugih biljnih vrsta koje su porekom iz Mediteranske oblasti (El Aou-ouad i sar., 2014).

## 5.2. Uticaj tipa eksplantata i hranljive podloge na regeneraciju biljaka

Tip početnog eksplantata je jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na efikasnost organogeneze izdanaka i regeneraciju cele biljke (Sheeja i sar., 2004; Smith, 2013). Na osnovu dosadašnjih istraživanja kod drugih vrsta roda *Viola* najčešće korišćeni eksplantati za indukciju regeneracije izdanaka bili su odsecci lisnih drški i listova, bilo poreklom sa klijanaca (Wang i Bao, 2007; Li i sar., 2010; Mokhtari i sar., 2015) ili sa *ex vitro* gajenih biljaka (Naeem i sar., 2013; Vishwakarma i sar., 2013; Slazak i sar., 2015; Khajuria i sar., 2017; Narayani i sar., 2018; Zabicki i sar., 2019).

Morfogenetski potencijal eksplantata poreklom od klijanaca do sada je proučavan kod nekoliko hortikulturno ili farmaceutski značajnih vrsta roda *Viola*, kao što su *V. baoshanensis* (Li i sar., 2010), *V. odorata* (Mokhtari i sar., 2016), *V. tricolor* (Babber i Sharma, 1991) i *V. wittrockiana* 'Caidie' (Wang i Bao, 2007). Kod eksplantata lisne drške *V. wittrockiana* 'Caidie' je pokazano da dolazi samo do formiranja kalusa, dok je za regeneraciju izdanaka neophodna smena nekoliko hranljivih podloga (Wang i Bao, 2007). Veća efikasnost regeneracije izdanaka kod drugih vrsta *Viola* dobijena je kod eksplantata listova nego kod eksplantata lisnih drški (Li i sar., 2010; Mokhtari i sar., 2016).

Regeneracija izdanaka u kulturi *in vitro* postignuta je kod eksplantata poreklom od *ex vitro* gajenih biljaka nekoliko *Viola sp.*: *V. canescens* (Khajuria i sar., 2017), *V. odorata* (Kaloo i sar., 2013; Haralkar i Biradar, 2016; Narayani i sar., 2017), *V. patrinii* (Sato i sar., 1995), *V. pilosa* (Soni i Kaur, 2014), *V. serpens* (Vishwakarma i sar., 2013), *V. stagnina* (Zabicki i sar., 2019) i *V. uliginosa* (Slazak i sar., 2015). I u ovim eksperimentima dominira tip eksplantata kao jedan od najznačajnijih faktora koji utiču na regeneraciju izdanaka. Tako, na primer, veća efikasnost regeneracije izdanaka dobijena je na odseccima lisnih drški u odnosu na odsečke listova kod *V. stagnina* (Zabicki i sar., 2019), dok je, nasuprot tome, najveća efikasnost regeneracije izdanaka zabeležena kod odsečaka listova *V. uliginosa* (Slazak i sar., 2015).

Kod *V. cornuta* po prvi put je proučavana regeneracija izdanaka iz delova klijanaca i eksplantata poreklom od biljaka gajenih u kulturi *in vitro*. Eksplantati *V. cornuta* gajeni su na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama i kombinacijama biljnih regulatora rastenja, pri čemu je pokazano da je i kod *V. cornuta* tip eksplantata najznačajniji faktor za regeneraciju izdanaka.

Za uspostavljanje kulture izdanaka važno je odabrati tip eksplantata sa najvećim organogenim potencijalom (Khaliluev i sar., 2014). U kulturi *V. cornuta* eksplantati poreklom od klijanaca i *in vitro* gajenih biljaka imali su različit potencijal za formiranje kalusa i regeneraciju izdanaka. Fiziološki mlađe tkivo ima veći potencijal za regeneraciju izdanaka u kulturi *in vitro* (Cardoso i Habermann, 2014). U zavisnosti od pozicije na majci biljci eksplantati mogu imati nejednak nivo endogenih regulatora rastenja, što na istoj hranljivoj podlozi može dovesti do i njihovog različitog morfogenetskog odgovora tokom kulture *in vitro* (Lim i sar., 2012; Smith, 2013). Kod eksplantata poreklom od klijanaca, eksplantati hipokotila odlikovali su se najvećim regenerativnim potencijalom, dok su se kod eksplantata poreklom od *in vitro* gajenih biljaka najvećim potencijalom za regeneraciju izdanaka odlikovali eksplantati lisnih drški.

U kulturi *in vitro* često se koristi samo jedan tip hranljivog mineralnog rastvora, pri čemu koncentracija mineralnih soli ne mora biti optimalna za sve faze u procesu mikropropagacije biljaka



(Ramage i Williams, 2002). Za regeneraciju izdanaka *Viola sp.* uglavnom se koristi hranljiva podloga po Murashige i Skoog-u (1962). Međutim, neke vrste *Viola sp.* su osjetljive na sadržaj mineralnih soli pa je za pravilno rastenje i razviće izdanaka *Viola sp.* najčešće neophodno smanjiti njihovu koncentraciju u hranljivoj podlozi (Sato i sar., 1995; Chalageri i Babu, 2012; Naeem i sar., 2013). Značajno bolji rezultati su postignuti kada je korišćena MS hranljiva podloga sa dva puta manjim sadržajem mineralnih soli, a pri istim koncentracijama regulatora rasteња (Naeem i sar., 2013). Takođe, Sato i saradnici (1995) i Mokhtari i saradnici (2016) su pokazali da je razblaženje MS mineralnih soli vrlo važno i za postizanje visoke stope regeneracije izdanaka iz kalusnog tkiva. Najbolja regeneracija izdanaka dobijena je na podlozi sa dva puta razblaženim MS rastvorom (Sato i sar., 1995). Pored toga, regeneracija izdanaka iz kalusa *V. patrinii* bila je značajno bolja na ½MS hranljivoj podlozi naročito sa smanjenim sadržajem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sato i sar., 1995; Chalageri i Babu, 2012). U našim preliminarnim istraživanjima hranljiva podloga sa upola razblaženim MS mineralnim rastvorom uz dodatak pune koncentracije kompleksa gvožđa i vitamina (½MS) bila je podesnija za rastenje i razviće izdanaka *V. cornuta* u odnosu na MS podlogu sa punim koncentracijama mineralnih soli. Isto tako, MS hranljive podloge sa nižim koncentracijama mineralnih soli kod *V. cornuta* omogućile su uspješniju regeneraciju izdanaka u kulturi *in vitro*.

Kod vrsta roda *Viola* za formiranje kalusa i regeneraciju izdanaka korišćeni su regulatori rasteња tipa auksina i citokinina u različitim koncentracijama i kombinacijama. Kako kod eksplantata poreklom od klijanaca, tako i kod eksplantata poreklom od *ex vitro* biljaka *Viola sp.* utvrđeno je da su auksini u hranljivoj podlozi neophodni za formiranje kalusa. Kod nekoliko vrsta *Viola sp.* kalus je uspješno dobijen na podlozi sa 2,4-D kao jedinim regulatorom rasteња (Shabena i sar., 2010; Vishwakarma i sar., 2013; Khajuria i sar., 2017; Narayani i sar., 2017). 2,4-D je auksin koji podstiče deobu ćelija i njihovo izduživanje, što je karakteristično za formiranje kalusnog tkiva (Phua i sar., 2016). Korišćeni su i drugi auksini kao što su NAA i IBA, ali je njihova efikasnost u formiranju kalusa bila znatno manja od efekta 2,4-D (Kaloo i sar., 2013). Visoka efikasnost formiranja kalusa može biti postignuta i kombinovanjem različitih auksina, npr. NAA i 2,4-D, kao što je dokumentovano kod *V. odorata* (Mokhtari i sar., 2015). U radovima je pokazano da 2,4-D u kombinaciji sa citokinima, BAP ili KIN, može pozitivno uticati na formiranje kalusnog tkiva (Wijowska i sar., 1999; Naeem i sar., 2013; Haralkar i Biradar, 2016). U odnosu na KIN, BAP u kombinaciji sa 2,4-D se pokazao efikasnijim za formiranje kalusa (Slazak i sar., 2015; Khajuria i Bisht, 2018), dok samo BAP ili KIN dodati u hranljivu podlogu nisu bili dovoljni za formiranje kalusa *V. canescens* (Khajuria i sar., 2017). Kod eksplantata poreklom od klijanaca *V. cornuta* najveći procenat eksplantata koji su formirali kalus dobijen je na odsećcima hipokotila, na podlozi sa 2,4-D i BAP (97,87% u mraku i 100% u uslovima dugog dana) (**Tabela 20 i 21**).

Za organogenezu izdanaka, kod nekih *Viola sp.*, pored citokinina potrebni su i auksini. Samo KIN u hranljivoj podlozi nije bio dovoljan za indukciju adventivnih pupoljaka kod *V. baoshanensis* (Li i sar., 2010). Sa druge strane, kod *V. serpens* Wall. izdanci su indukovani na podlozi koja je sadržala samo BAP ili KIN, pri čemu je BAP bio efikasniji od KIN (Vishwakarma i sar., 2013; Khajuria i sar., 2017). Kod ostalih vrsta *Viola* uspješna indukcija organogeneze izdanaka dobijena je na podlogama sa BAP uz prisustvo auksina, IBA ili NAA (Li i sar., 2010; Kaloo i sar., 2013; Mokhtari i sar., 2016). Kombinacija KIN i NAA u hranljivoj podlozi se pokazala pogodnom za uspostavljanje kulture izdanaka *V. patrinii* (Sato i sar., 1995). Na podlozi istog sastava postignuta je i uspješna indukcija organogeneze izdanaka iz eksplantata lisnih drški *in vitro* gajenih biljaka *V. cornuta*. Podloga sa NAA i BAP bila je takođe uspješna za regeneraciju izdanaka iz eksplantata lisnih drški *V. cornuta*. Na hranljivim podlogama gde su BAP ili KIN kombinovani sa IAA (**Tabela 24**) efikasnost indukcije izdanaka bila je manja u odnosu na iste citokinine u kombinaciji sa NAA (**Tabela 25**).

Za ispitivanje organogeneze izdanaka kod *V. cornuta* pored citokinina adeninskog tipa korišćeni su i citokinini derivati feniluree, pojedinačno ili u kombinaciji sa auksinima, IAA ili NAA. Tiazuron je sintetički biljni regulator rasteња koji u uslovima *in vitro* obezbeđuje brzu i efikasnu propagaciju biljaka (Guo i sar., 2011). On pokazuje viši stepen biološke aktivnosti u

odnosu na druge regulatore rasteња prilikom regeneracije izdanaka (Murthy i sar., 1998). TDZ stimuliše procese organogeneze, ali i somatske embriogeneze, vezivanjem za iste citokininske receptore kao i citokinini adeninskog tipa. Kao rezultat toga dolazi do povećanja koncentracije endogenih citokinina i do pojačanog odgovora biljaka na njihov signal (Nisler, 2018). Tako je kod *A. thaliana* identifikovan receptor citokinina (CRE1) koji se aktivira vezivanjem TDZ-a (Inoue i sar., 2001). Za inicijaciju diferencijacije izdanaka dovoljne su niske koncentracije TDZ (do 1 mg/l) u hranljivim podlogama. Pri višim koncentracijama ( $\geq 1$  mg/l) dolazi do formiranja somatskih embriona (Mithila i sar., 2003). Kod eksplantata lisnih drški i listova *V. stagnina* izdanci su regenerisani samo na podlozi sa 1 mg/l TDZ, dok je na nižoj koncentraciji TDZ ( $\leq 1$  mg/l) formirano samo kompaktno kalusno tkivo sa krupnim ćelijama delimično prekrivenim ekstracelularnim matriksom (Zabicki i sar., 2019). U kulturi *V. odorata* na hranljivim podlogama sa TDZ u koncentraciji od 0,5 do 1 mg/l indukovani su somatski embrioni, dok je na višim koncentracijama ovog regulatora rasteња njihovo formiranje bilo inhibirano (Narayani i sar., 2018). U literaturi nema podataka o regeneraciji izdanaka *Viola sp.* iz eksplantata poreklom od klijanaca koji su gajeni na podlogama samo sa TDZ. U ovom radu, TDZ je kao jedini regulator rasteња u hranljivoj podlozi pokazao značajan potencijal za indukciju formiranja i kalusa i izdanaka kod *V. cornuta*. Uspešna regeneracija izdanaka *V. cornuta* postignuta je na podlozi sa 1 mg/l TDZ na odsećcima listova klijanaca (**Tabela 20**), kao i na odsećcima lisnih drški *in vitro* gajenih biljaka (**Tabela 23**). Na eksplantatima gajenim na podlozi sa TDZ regeneracija izdanaka *V. cornuta* dobijena je putem indirektno organogeneze, kao i kod *V. uliginosa* (Slazak i sar., 2015).

Regeneracija izdanaka *V. cornuta* bila je efikasnija na podlogama sa citokininima derivatima feniluree (TDZ ili CPPU) nego na podlogama sa citokininima derivatima adenina (BAP ili KIN). U ovoj disertaciji je pokazano da je na niskim koncentracijama TDZ ili CPPU broj indukovanih aksilarnih izdanaka kod *V. cornuta* bio do 2,5 puta veći nego na podlogama sa NAA i BAP. Jak efekat citokinina derivata feniluree je povezan sa njihovom sposobnošću da aktiviraju receptore citokinina i, istovremeno, nemogućnosti da se razgrade dejstvom citokinin oksidaze/dehidrogenaze (Nisler, 2018).

Kod nekih vrsta *Viola sp.* regeneracija izdanaka je postignuta na podlozi koja je pored TDZ sadržala bar još dva regulatora rasteња. Sinergistički efekat nekoliko regulatora rasteња kod ovih vrsta roda *Viola* pokazao se vrlo uspešnim za dobijanje efikasne regeneracije izdanaka. Tako je regeneracija izdanaka *V. wittrockiana* cv. 'Caidie' dobijena na hranljivoj podlozi koja je sadržala TDZ, GA<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub> i aktivni ugalj (Wang i Bao, 2007), dok su kod *V. odorata* izdanci regenerisani u visokom procentu na podlozi koja je pored TDZ, GA<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub> sadržala i NAA (Naeem i sar., 2013). Takođe, kombinacija regulatora rasteња TDZ i GA<sub>3</sub> uz dodatak BAP bila je uspešna i kod *V. pilosa* gde je regeneracija izdanaka dobijena u velikom procentu (Soni i Kaur, 2014). Prisustvo GA<sub>3</sub> u ovim hranljivim podlogama je bilo značajno za indukciju i izduživanje novoformiranih izdanaka *V. odorata* (Naeem i sar., 2013; Mokhtari i sar., 2015), *V. pilosa* (Soni i Kaur, 2014) i *V. wittrockiana* (Wang i Bao, 2007), s obzirom da pod uticajem TDZ rasteње i izduživanje izdanaka može biti usporeno (Taiz i Zeiger, 2006). TDZ dodat u hranljivu podlogu u visokim koncentracijama ( $\geq 4$  mg/l) može dovesti do morfoloških abnormalnosti kod listova i srastanja izdanaka (Dewir i sar., 2018). Ova odstupanja od normalnog fenotipa se mogu pojaviti već tokom prve subkulture, dok kod nekih vrsta biljaka kontinualna kultura izdanaka na podlozi sa TDZ sprečava normalan razvoj pupoljaka (Akasaka i sar., 2000). Izdanci *V. cornuta* su gajeni na koncentraciji TDZ od 0,1-1 mg/l koja je bila dovoljno visoka da dovede do indukcije organogeneze izdanaka, a ujedno i dovoljno niska da bi se izbegle abnormalnosti kod regenerisanih izdanaka (**Tabela 27 i 28**). Hiperhidričnost je još jedan od neželjenih efekata koji se može ispoljiti prilikom indukcije i gajenja izdanaka na podlozi sa TDZ. Listovi izdanaka mogu postati prozirni, a stablo voluminozno i deformisano (Dewir i sar., 2018). Ovakve abnormalnosti mogu za posledicu imati smanjenje biomase regenerisanih izdanaka (Coste i sar., 2011). I u kulturi *Viola sp.* je uočen ovaj negativni efekat TDZ, gde je čak i pri nižoj koncentraciji TDZ (0,5 mg/l) došlo do pojave hiprehidričnosti izdanaka. Daljom subkultivacijom regenerisanih izdanaka na podlogu bez TDZ,

najčešće na podlogu koja sadrži BAP ili KIN, izdanci se mogu normalno razvijati i umnožavati (Soni i Kaur, 2014).

Prema dostupnim literaturnim podacima o regeneraciji vrsta roda *Viola*, nema podataka o regeneraciji izdanaka na podlozi koja je sadržala CPPU. Kao i TDZ, ovaj regulator rastenja je sintetički citokinin derivat feniluree, koji podstiče deobu ćelija, sintezu hlorofila i odlikuje se većom citokininskom aktivnošću u odnosu na citokinine adeninskog tipa (Huetteman i Preece, 1993). Pored indukcije adventivnih izdanaka CPPU utiče i na proces formiranja kalusa i somatskih embriona (Murthy i Saxena, 1994). Tako je na primer, kod pet kultivara *Pisum sativum* L. regeneracija izdanaka bila najefikasnija na hranljivoj podlozi sa CPPU, dok je prisustvo BAP u podlozi imalo znatno manji efekat (Tulac i sar., 2002). CPPU u kombinaciji sa IAA kod *Citrus auratum* L. dovelo je do visoko efikasne regeneracije izdanaka procesom direktne organogeneze (Roussos i sar., 2011). Ova dva citokinina tipa uree se mogu koristiti i kratkotrajno, samo potapanjem bazalnih delova izdanaka u koncentrovani rastvor TDZ ili CPPU. Kod dva kultivara *Rosa hybrida* L. ovakav način upotrebe TDZ ili CPPU doveo je do visoke multiplikacije izdanaka (Singh i Syamal, 2001). Citokinini derivati feniluree (TDZ i CPPU) su se kod *V. cornuta* pokazali superiornijim i prilikom umnožavanja izdanaka u odnosu na citokinine derivate adenina. U poređenju sa njima, iste koncentracije citokinina derivate feniluree bile su efikasnije pri umnožavanju izdanaka i kod drugih biljnih vrsta (Dinani i sar., 2018). Pretpostavlja se da oni utiču na nivo endogenih regulatora rastenja u biljnom tkivu i tako dovode do veće regeneracije izdanaka (Visser i sar., 1992). Efekat TDZ na proliferaciju aksilarnih izdanaka *Malus domestica* bio je 5-10 puta veći u poređenju sa efektom adeninskih citokinina (Dinani i sar., 2018). Efikasnost CPPU je pokazana i kod *Actinidia chinensis* kod koje je ista efikasnost umnožavanja izdanaka dobijena sa dva puta manjom koncentracijom CPPU u odnosu na BAP u hranljivoj podlozi (Caboni i sar., 2009). Takođe, TDZ i CPPU bili su efikasniji i kod umnožavanja aksilarnih izdanaka *Phaseolus vulgaris* L. (Mohamed i sar., 1992). CPPU se kao i TDZ odlikuje visokom citokininskom aktivnošću (Sunagawa i sar., 2007). Kod nekih biljnih vrsta efekat CPPU na indukciju i proliferaciju izdanaka bio je slabiji u odnosu na TDZ (Singh i Syamal, 2001; Sunagawa i sar., 2007). Kod *V. cornuta* prosečan broj formiranih aksilarnih izdanaka bio je sličan na podlozi sa 0,1 mg/l TDZ i podlozi sa 0,5 mg/l CPPU. Međutim, izdanci koji su umnožavani na podlozi sa 0,5 mg/l CPPU bili su značajno duži od izdanaka gajenih na podlozi sa 0,1 mg/l TDZ, što ukazuje da je aktivnost CPPU u inhibiciji izduživanja bila manja od aktivnosti TDZ, iako je CPPU bio primenjen u većoj koncentraciji od TDZ.

TDZ deluje tako što inhibira aktivnost endogene citokinin oksidaze/dehidrogenaze koja katalizuje degradaciju citokinina (Nisler, 2018), tako da se ovaj regulator rastenja u biljnom tkivu može zadržati čak i nakon subkultivacije na drugu hranljivu podlogu (Guo i sar., 2011). Njegov efekat može biti vidljiv naročito daljim gajenjem izdanaka na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, na kojoj izdanci nastavljaju da se umnožavaju (Makara i sar., 2010). Gajenje eksplantata *Curcuma longa* na visokoj koncentraciji TDZ (4 mg/l) dovelo je do intenzivne proliferacije izdanaka i nakon subkultivacije na podlogu bez regulatora rastenja (Prathanturarug i sar., 2003). Takođe, izdanci *Phaseolus vulgaris* L. prethodno gajeni na podlogama sa TDZ ili CPPU nastavili su da se umnožavaju na podlozi bez regulatora rastenja (Mohamed i sar., 1992). I kod *V. cornuta* je bio prisutan ovaj efekat produženog dejstva TDZ kada su izdanci subkultivisani na podlozi bez regulatora rastenja nastavili da rastu, formiraju aksilarne izdanke i spontano se ožiljavaju (**Tabela 28**). Prema literaturnim podacima gajenje izdanaka na podlozi sa TDZ može negativno uticati na kasnije ožiljavanje izdanaka (Guo i sar., 2011). Takvog inhibitornog efekta TDZ na formiranje korenova *V. cornuta* na podlozi bez regulatora rastenja nije bilo, što je u saglasnosti sa rezultatima De Hsie i saradnika (2019) koji su izdanke *Lippia rotundifolia* Cham prethodno gajene na podlozi sa TDZ, uspešno ožiljili na podlozi bez regulatora rastenja.

Auksini su glavni regulatori rastenja koji indukuju pojavu, odnosno organogenezu adventivnih korenova kod biljaka (Jarvis i Yasmin, 1987). Iako izdanci nekih *Viola sp.* mogu spontano formirati adventivne korenove na podlozi bez regulatora rastenja (Li i sar., 2010), najveći



broj vrsta *Viola* je uspešno ožiljavan na podlogama sa IBA u rasponu koncentracija od 0,5 do 2 mg/l (Chalageri i Babu, 2012; Vishwakarma i sar., 2013; Soni i Kaur, 2014; Slazak i sar., 2015; Mokhtari i sar., 2016; Khajuria i Bisht, 2018). Takođe, visok procenat ožiljenih biljaka (94%) dobijen je gajenjem izdanaka na podlozi sa 0,5 mg/l IAA (Zabicki i sar., 2019). Pored toga, i smanjenje sadržaja mineralnih soli u hranljivoj podlozi pokazalo se vrlo značajnim za ožiljavanje izdanaka *Viola sp.* (Chalageri i Babu, 2012; Soni i Kaur, 2014; Slazak i sar., 2015; Khajuria i Bisht, 2018; Zabicki i sar., 2019). Na primer, na ½MS hranljivoj podlozi kod izdanaka *V. canescens* formiran je veći broj korenova koji su bili duži u odnosu na izdanke koji su ožiljavani na MS hranljivoj podlozi (Khajuria i Bisht, 2018). Za ožiljavanje *V. cornuta* korišćene su niske (0,1 mg/l) koncentracije auksina, (IAA, IBA ili NAA), s obzirom da visoke koncentracije mogu inhibitorno delovati na broj formiranih korenova (Khan i Bi, 2012; Da Costa Melo i sar., 2016). Nasuprot IAA i IBA, koji nisu imali značajan uticaj na indukciju adventivnih korenova kod *V. cornuta*, NAA je pozitivno uticao na ovaj process (**Histogram 2**). Na podlozi sa NAA dobijeni su najveći procenat ožiljenih biljaka, najveći broj korenova po biljci i najveća prosečna dužina formiranih korenova.

### 5.2.1. Odsečak hipokotila kao početni eksplantat za regeneraciju i genetičku transformaciju *V. cornuta*

Prema literaturnim podacima, eksplantati hipokotila nisu često korišćeni kao početni eksplantati za uspostavljanje *in vitro* kultura *Viola sp.* U istraživanjima drugih autora dobijeno je samo kalusno tkivo iz eksplantata hipokotila *V. tricolor*, dok kultura izdanaka nije uspostavljena (Babber i Sharma, 1991). U ovom radu su prvi put dobijeni podaci o faktorima koji utiču na regeneraciju izdanaka *V. cornuta* iz eksplantata hipokotila.

U cilju poboljšanja protokola za regeneraciju biljaka *V. cornuta* iz eksplantata hipokotila, ispitano je nekoliko faktora koji utiču na formiranje kalusa i indukciju izdanaka. Praćen je uticaj svetlosnog režima tokom indukcije organogeneze izdanaka i uticaj pozicije odsečka hipokotila i genotipa na regeneraciju izdanaka.

Temperatura i svetlosni uslovi klijanja semena mogu uticati na kasniju regeneraciju izdanaka u kulturi *in vitro* (El Aou-ouad i sar., 2014). Klijanje semena na niskoj temperaturi dovodi do veće indukcije organogeneze izdanaka u kulturi *Trapa japonica* Flerov (Hoque i sar., 2001). Proučavanjem morfogenetskog potencijala u prisustvu i odsustvu svetlosti kod drugih biljnih vrsta ustanovljeno je da svetlosni uslovi tokom klijanja semena imaju značajnog uticaja na proces regeneracije izdanaka iz eksplantata hipokotila, kao što je i pokazano kod *L. usitatissimum* (Siegień i sar., 2013). Kod *V. cornuta* uočena je značajna razlika u morfogenetskom odgovoru eksplantata hipokotila gajenih u mraku na istoj hranljivoj podlozi poreklom od semena koja su klijala na 4 °C (**Tabela 20**) i semena koja su klijala na 10 °C (**Tabela 21**). Eksplantati hipokotila klijanaca dobijenih iz semena koja su klijala na 10 °C imala su veći regenerativni potencijal od onih poreklom od semena koja su klijala na 4 °C.

Svetlost je važan sredinski faktor koji kontroliše različite fiziološke procese rastenja i razvića biljaka (Reed i Preece, 2003). Talasna dužina svetlosti, gustina svetlosnog fluksa i trajanje fotoperioda u velikoj meri utiču na morfogenezu biljaka u kulturi *in vitro* (Dou i sar., 2017). Kompletan mehanizam procesa organogeneze koji je indukovano odsustvom svetlosti tokom klijanja semena još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da gajenje biljnih tkiva u mraku štiti endogene regulatore rastenja koji su osetljivi na prisustvo svetlosti (Yalcin i sar., 2010). Sa druge strane, svetlost ima pozitivan efekat na formiranje kalusa i doprinosi povećanju njegove mase (Afshari i sar., 2011). Svetlosni uslovi kontrolišu sintezu hlorofila koji kalusu daje zelenu boju (Zhong i sar., 1991). U ćelijama kalusnog tkiva u uslovima svetlosti sintetišu se metaboliti koji će im omogućiti bolje rasteње nego u uslovima mraka (Siddique i Islam, 2015). Kalusi *V. cornuta* takođe gajeni u uslovima svetlosti bili su zelene boje za razliku od kalusa gajenih u mraku koji su bili žute boje. Gajenje eksplantata hipokotila *Linum usitatissimum* L. u uslovima svetlosti omogućilo je za 30% veću regeneraciju izdanaka i korenova u odnosu na eksplantate hipokotila koji

su gajeni u mraku (Siegień i sar., 2013). U ovom radu je pokazano da je i kod *V. cornuta* gajenje eksplantata hipokotila na svetlosti imalo pozitivan efekat na regeneraciju izdanaka (**Slika 12**). Efikasnost regeneracije izdanaka i broj izdanaka po eksplantatu hipokotila *V. cornuta* bili su značajno veći kada su eksplantati hipokotila gajeni u uslovima dugog dana nego u konstantnom mraku.

Kod većeg broja biljnih vrsta ispitivanjem regenerativnog potencijala različitih segmenata hipokotila utvrđeno je da postoji značajna razlika u efikasnosti regeneracije izdanaka između odsečaka koji su bliži epikotilu klijanca i onih koji su bliži korenu (Yoshida, 2002; Xi-Ling i sar., 2011; Sharma i sar., 2011). Ju i saradnici (2012) smatraju da je gornji odsečak hipokotila koji predstavlja mlađe tkivo bolji izbor eksplantata za regeneraciju izdanaka u odnosu na odsečak hipokotila koji je bliži korenu. Kod *V. cornuta* gornji odsečak hipokotila koji je najbliži epikotilu klijanca imao je najveći regenerativni potencijal, gde je i dobijen najveći prosečan broj izdanaka po eksplantatu (**Tabela 22**). Srednji i donji odsečak hipokotila imali su manji potencijal za regeneraciju izdanaka koji se ogledao i u značajno manjem broju izdanaka po eksplantatu. Različit morfo-genetski odgovor eksplantata hipokotila može biti posledica variranja koncentracije endogenih regulatora rastenja u majci biljci (George, 1993; Debnath, 2003).

U kulturi *in vitro* regenerativni potencijal se najčešće proučava na nivou kultivara sa ciljem razvijanja protokola koji bi bio primenljiv kod što većeg broja genotipova (Wang i Bao, 2007). U literaturi ima malo podataka o uticaju genotipa na regenerativni potencijal jediniki u okviru populacije istog kultivara (Chen i sar., 1987; Molina i Nuez, 1995; Mishra i sar., 2003). Molina i Nuez (1995) su pokazali da kod dinje postoje značajne razlike u učestalosti regeneracije izdanaka iz eksplantata listova biljaka koje vode poreklo iz iste populacije semena. Prisustvo varijabilnosti u potencijalu za regeneraciju biljaka dokumentovano je kod spanaća (Milojević i sar., 2011) i luka šalota (Tubić i sar., 2014). Genotip je najznačajniji faktor za regeneraciju ovih biljnih vrsta, pri čemu se učestalost regeneracije izdanaka i broj pupoljaka po eksplantatu značajno razlikuju između pojedinačnih linija (Tubić i sar., 2014). Utvrđeno je da i klijanci *V. cornuta* imaju različit potencijal za regeneraciju izdanaka. Kod nekih klijanaca svi ispitivani segmenti hipokotila su regenerisali izdanke *de novo*, dok je kod pojedinih klijanaca na svim segmentima hipokotila regeneracija izdanaka izostala (**Slika 12**), što ukazuje da je kod *V. cornuta* efikasnost regeneracije izdanaka zavisi i od genotipa klijanaca. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da individualna varijabilnost u regenerativnom potencijalu između klijanaca može značajno uticati na ukupnu efikasnost regeneracije izdanaka kod *V. cornuta*. Te razlike mogu predstavljati veliki problem u procesu mikropropagacije i genetičke transformacije biljnih vrsta (Hill i Schaller, 2002). Unutar svake biljke, ćelije mogu imati različit nivo endogenih hormona, pa usled toga morfo-genetski odgovor u kulturi *in vitro* varira u okviru jednog genotipa (Bhaskaran i Smith, 1990). Između jedinki postoje prirodne razlike u sposobnosti sinteze citokinina i sposobnosti biljnih ćelija da odgovore na njihovo dejstvo, tako da jedinke koje akumuliraju više endogenih citokinina imaju i veći potencijal za regeneraciju izdanaka *in vitro* (Catterou i sar., 2002). Smatra se da razlike u genotipu mogu biti posledica kvantitativnih i kvalitativnih genetičkih razlika (Henry i sar., 1994), a da je regenerativni potencijal genetički determinisana osobina koja se može preneti sa roditelja na potomstvo (Milojević i sar., 2011).

Prema dosadašnjim literaturnim podacima u vezi regeneracije izdanaka u kulturi *in vitro*, vrste roda *Viola* su najčešće regenerisane procesom organogeneze, a izdanci su formirani procesima direktne i/ili indirektno organogeneze *de novo* (Slazak i sar., 2015; Zabicki i sar., 2019). Formiranje izdanaka putem organogeneze u značajnoj meri zavisi od prisustva regulatora rastenja u hranljivoj podlozi, a njihova koncentracija umnogome može uticati na način formiranja izdanaka. Histološka analiza indukcije adventivnih pupoljaka u kulturi *Viola sp.* do sada je rađena iz odsečaka lisnih drški *V. uliginosa* (Slazak i sar., 2015) i listova *V. stagnina* (Zabicki i sar., 2019) tokom gajenja na podlozi sa TDZ. Utvrđeno je da se kod *V. uliginosa* izdanci mogu formirati na oba načina, u zavisnosti od koncentracije TDZ u hranljivoj podlozi i tipa kulture. Tako je pokazano da se pri gajenju eksplantata lisnih drški *V. uliginosa* na nižoj koncentraciji TDZ (0,5 mg/l) izdanci formiraju

direktnom organogenezom iz meristemskih centara poreklom iz subepidermalnog parenhima. Kod eksplantata listova iste vrste gajenih na višim koncentracijama TDZ (1,0 mg/l) izdanci su regenerisani iz kalusa procesom indirektno organogeneze (Slazak i sar., 2015). Za razliku od *V. uliginosa* kod *V. stagnina* pokazano je da kod eksplantata listova gajenih na podlozi sa 0,5-1,0 mg/l TDZ adventivni izdanci formirani direktno iz eksplantata lista (Zabicki i sar., 2019). U ovoj disertaciji je histoanatomskom analizom po prvi put pokazano poreklo adventivnih izdanaka regenerisanih iz eksplantata hipokotila (**Slika 13**) kod vrste iz roda *Viola*.

Kod *V. cornuta*, nezavisno od svetlosnih uslova u kojima se eksplantati hipokotila gaje, kalusno tkivo se formira na mestima preseka odnosno ozlede biljnog tkiva. Prilikom izolacije eksplantata hipokotila dolazi do povrede tkiva koja indukuje ekspresiju specifičnih gena, *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1)* gena kao što je pokazano kod *Arabidopsis thaliana*. Epidermalne ćelije eksplantata hipokotila tada počinju intenzivno da proliferišu i stvaraju masu pluripotentnih ćelija koja čini kalusno tkivo (Iwase i sar., 2011). Praćenjem porekla izdanaka formiranih tokom prvih 30 dana gajenja eksplantata hipokotila *V. cornuta* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i BAP, pokazano je da se kod *V. cornuta* izdanci mogu formirati paralelno i putem direktne i putem indirektno organogeneze *de novo*. Izdanci se formiraju uglavnom na krajevima hipokotila, gde su mesta preseka odnosno povrede, nakon deset do petnaest dana gajenja, direktno na eksplantatu ili indirektno na kalusu.

### 5.3. Genetička transformacija *V. cornuta*

Sa razvojem biotehnoških postupaka u protekle četiri decenije stvoreni su uslovi za manipulaciju genetičkim materijalom u cilju poboljšanja postojećih ili uvođenja novih željenih osobina kod biljaka (Verma, 2013). U oblasti hortikulture važan segment čine ukrasne biljne vrste, gde postoji stalna potreba za novim kultivarima sa izmenjenim karakteristikama (Azadi i sar., 2016; Noman i sar., 2017). Boja cveta se metodama genetičkog inženjerstva modifikuje preko 30 godina. Genetičke transformacije posredovane agrobakterijama i dalje predstavljaju najjednostavniju i najkorišćeniju metodu za transformaciju biljaka. Drugačije, odnosno nove boje cvetova mogu se dobiti genetičkim manipulacijama uvođenjem gena koji kodiraju enzime kojih prirodno nema u genomu biljke, kao i preusmeravanjem biosintetskog puta biljnih pigmenata bilo povećanjem ili snižavanjem ekspresije gena koji u njemu učestvuju (Chandler i Brugliera, 2011).

U cilju promene boje cveta, najčešće je modifikovan put biosinteze antocijanina zbog toga što su ovi pigmenti najrasprostranjeniji (Suzuki i sar., 2000; Davies i sar., 2003; Boase i sar., 2010; He i sar., 2013; Nakamura i sar., 2015). Transgene linije karanfila i ruža sa promenjenom bojom cveta, koje se mogu naći u slobodnoj prodaji, dobijene su genetičkom modifikacijom biosinteze antocijanina (Holton, 1996; Katsumoto i sar., 2007).

Karotenoidi su pigmenti koji takođe određuju boju cvetova kod biljaka, ali su mnogo manje zastupljeni u odnosu na antocijanine (Ohmiya, 2011). Genetička modifikacija biosinteze karotenoida do sada je postignuta uvođenjem gena kojih prirodno nema u genomu biljke-domaćina (Mann i sar., 2000; Jeknić i sar., 2014). Pored toga, promena boje ne samo cvetova već i drugih biljnih organa postignuta je povećanjem ili sniženjem ekspresije postojećih gena ili njihovim utišavanjem. Povećana ekspresija *crtB* gena dovela do promene boje ne samo cvetova već i drugih biljnih organa *Fortunella hindsii* Swingle kao što su listovi i korenovi (Cao i sar., 2015). Sa druge strane, snižavanjem ekspresije gena za  $\beta$ -karoten hidroksilazu jarko žuta boja cvetova *Oncidium* promenjena je u svetlo žutu i belo žutu boju (Wang i sar., 2016). U cilju promene boje cveta endogeni karotenoidi,  $\beta$ -karoten i zeaksantin, su konvertovani u ketohidroksilne karotenoide, kao što su ehinenon i njegovi derivati, kantaksantin, 4-ketozeaksantin i astaksantin, nakon čega su cvetovi *Nicotiana glauca* promenili boju iz žute u crvenu (Mortimer i sar., 2017).

Prema dostupnim literaturnim podacima o genetičkoj transformaciji vrsta roda *Viola* do sada je transformisana samo *Viola diffusa* Ging. (Dai i sar., 2009). Uspešno su dobijene

transformisane biljke *V. diffusa* koje su eksprimirale gen za resveratrol sintazu koja ima ključnu ulogu u biosintezi resveratrola, polifenolnog jedinjenja koje se odlikuje brojnim biološkim aktivnostima (Zheng i sar., 2015). U ovoj disertaciji po prvi put su prikazani rezultati o genetičkoj transformaciji *V. cornuta*, koja je transformisana genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*ccs*), poreklom iz perijanta tigrastog ljiljana. Kapsantin-kapsorubin-sintaza (CCS) je enzim koji katalizuje sintezu dva crvena pigmenta, kapsantina i kapsorubina, iz žutih pigmenata, anteraksantina, odnosno violaksantina, koji daju žutu boju cvetovima *V. cornuta*. U disertaciji prvi put su predstavljeni rezultati o uspešnoj transformaciji kultivara sa žutim cvetovima 'Lutea Splendens', genom za CCS i dobijene transformisane biljke sa promenjenom bojom cvetova (**Slika 18**) (Trajković i sar., 2018).

Za transformaciju ukrasnih biljnih vrsta do sada su korišćeni: listovi (Kishimoto i sar., 2002), lisne drške (Orlikowska i Nowak, 1997), stablo (Zuker i sar., 1999), hipokotil (Payne i Lloyd, 1998), kotiledoni (Hirose i sar., 2002), ćelijske suspenzije (Jeknić i sar., 1999), kao i kalusi dobijeni iz različitih tipova eksplantata (ovula, odsečaka listova, cvetnih drški, listića lukovica i lisnih drški) (Chandler i Lu, 2005).

Za genetičku transformaciju *V. cornuta* pomoću *A. tumefaciens* najbolji rezultati su postignuti kada su korišćeni eksplantati hipokotila. Oni su bili početni eksplantati i prilikom transformacije brojnih biljnih vrsta, kao što su *Antirrhinum* (Cui i sar., 2004), *Campanula carpatica* (Sriskandarajah i sar., 2004), *Cyclamen persicum* (Boase i sar., 2002), *Delphinium* (Hirose i sar., 2002), *Mimulus aurantiacus* (Susić i sar., 2014) i *Euonymus alatus* (Chen i sar., 2006).

Pri genetičkoj transformaciji posredstvom *A. tumefaciens* inokulacija i kokultivacija eksplantata hipokotila neposredno nakon izolacije, često dovode do nekroze eksplantata. U literaturi je opisano da je gajenje eksplantata na podlozi za indukciju organogeneze izdanaka pre inokulacije sa agrobakterijama, kod mnogih biljaka imalo pozitivan uticaj na preživljavanje eksplantata nakon infekcije (Cortina i Culianez-Macia, 2004; Kumar i sar., 2010, Wu i sar., 2015; Maheshwari i Kovalchuk, 2016; Yan i sar., 2019). Prisustvo biljnih regulatora rasteња u podlozi za predtretman eksplantata podstiče deobe ćelija, a ćelije u fazi deobe su najpodložnije infekciji agrobakterijama (Mayavan i sar., 2013). Isto tako, gajenjem eksplantata pre inokulacije stvaraju se uslovi za bolju adheziju agrobakterija tokom kokultivacije (Piqueras i sar., 2010). Ispitivanjem dužine trajanja predtretmana, do 7 dana kod nekih biljnih vrsta, došlo se do podataka da se najveće preživljavanje eksplantata i potom najbolja efikasnost transformacije postižu kada se eksplantati gaje na podlozi za predtretman četiri dana pre inokulacije sa *Agrobacterium*-om (Kumar i sar., 2010; Maheshwari i Kovalchuk, 2016). Kraće trajanje predtretmana može dovesti do slabije regeneracije izdanaka, dok duže trajanje predtretmana može dovesti do regeneracije netransformisanih izdanaka (Kumar i sar., 2010). Kod pojedinih biljnih vrsta je otkriveno da su potrebne čak 2 nedelje predtretmana da bi se dobilo uspešno preživljavanje eksplantata nakon infekcije (Hayta i sar., 2018). Predtretman eksplantata hipokotila doprinosi većoj učestalosti regeneracije izdanaka i može povećati efikasnost transformacije, kao što je pokazano kod *Brassica rapa* (Baskar i sar., 2016). Slični rezultati dobijeni su kod *Solanum sp.* i *Vigna radiata* (Chakravarty i sar., 2010; Rai i sar., 2012; Yadav i sar., 2012). Predtretmanom se takođe prevazilaze stresni uslovi kojima su eksplantati izloženi tokom kokultivacije (Arcos-Ortega i sar., 2010). Eksplantati hipokotila *V. cornuta* koji su neposredno nakon izolacije inokulisani sa agrobakterijama i potom kokultivisani, uglavnom su nekrozirali. Gajenje hipokotila na predtretmanu u trajanju od 2, odnosno 7 dana povećalo je preživljavanje eksplantata, a iz kalusnog tkiva čija je inicijacija započeta tokom predtretmana regenerisani su izdanci (**Histogram 4**).

Pored predtretmana i drugi faktori, kao što su gustina bakterijske suspenzije, vreme inokulacije, prisustvo fenolnih jedinjenja u podlozi ili dužina trajanja faze kokultivacije, u značajnoj meri mogu uticati na uspešnost genetičke transformacije (Rout i sar., 2006; Kishi-Kaboshi i sar., 2018). Acetosiringon (AS) aktivira *vir* gene sa Ti plazmidu *Agrobacterium*-a i posredno utiče na povećanje infekcije (Baker i sar., 2005). Najveća efikasnost transformacije dobijena je kada je AS primenjen u koncentraciji od 100  $\mu$ M, kao što je to pokazano kod *Triticum aestivum* (Rashid i sar.,

2010) i *Pinus massoniana* (Maleki i sar., 2018). Obično se AS dodaje u bakterijsku suspenziju, međutim kod *Eustoma grandiflorum* je pokazano da se dodavanjem AS i u podlogu za kokultivaciju broj transformisanih kalusa značajno povećava (Nakano, 2017). Biotehnologija biljaka se bazira na prenošenju, integraciji i ekspresiji gena u biljnoj ćeliji iz koje će se formirati kompletna transformisana biljka. Efikasnost prenosa gena tokom transformacije nije visoka čak ni kod najuspešnijih sistema transfera. Najčešće, samo mali broj biljnih ćelija izloženih agrobakterijama bude zaista transformisan, integracijom transgena u genom domaćina (Sundar i Sakthiveli, 2008). U cilju razdvajanja transformisanih od netransformisanih biljnih ćelija, tkiva i organa, neophodni su selektivni marker-geni (Ramessar i sar., 2007). U tu svrhu najčešće se koriste geni koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotik (Waldron i sar., 1985) i na taj način omogućavaju transformisanim ćelijama da prežive na podlozi koja sadrži u svom sastavu selektivni agens dok netransformisane ćelije i tkiva nekroziraju (Brasiliero, 1998; Sundar i Sakthiveli, 2008). Higromicin je aminoglikozidni antibiotik koji produkuje *Streptomyces hygrosopicus* (Mann i Bromer, 1958). Higromicin inhibira sintezu proteina mitohondrija i hloroplasta (Brasiliero, 1998; Sundar i Sakthiveli, 2008), što za posledicu ima toksičan efekat na rastenje i razviće biljaka (Koetle i sar., 2015; Oung i sar., 2015). Za selekciju pri genetičkoj transformaciji biljaka, higromicin je najznačajniji agens posle kanamicina (Olhoft, 2003). Najčešće je korišćen za selekciju kod monokotiledonih vrsta, kao što su *Alstromeria* (Hoshino i sar., 2001), *Agapanthus* (Suzuki i sar., 2001), *Dendrobium* (Men i sar., 2003), *Oncidium* (Liau i sar., 2003) i *Phalenopsis* (Belarmino i Mii, 2000) (Tanaka i sar., 2005). Pored toga, njegova efikasnost pokazana je i kod dikotiledonih vrsta kao što su *Begonia semperflorens* (Hoshi i sar., 2003), *Arabidopsis thaliana* (Duan i Ding, 2007) i *Arachis hypogaea* (Amareshwari i sar., 2019). Biljne vrste su različito osetljive prema higromicinu, pa je za svaku od njih ponaosob neophodno utvrditi optimalnu koncentraciju za selekciju. Selektivne koncentracije higromicina se kreću u rasponu od 3 mg/l, kao što je na primer kod *Brassica* (Liu i sar., 2011), pa do 100 mg/l kao što je slučaj kod *Allium* (Eady i Lister, 1998). Relativno niske koncentracije higromicina (2,5 mg/l odnosno 7,5 mg/l), u zavisnosti od dužine trajanja predtretmana, bile su dovoljne za selekciju kod *V. cornuta* (Slika 17). Dai i saradnici (2009) su utvrdili da je za selekciju transformisanih od netransformisanih eksplantata lisnih drški *V. diffusa* Ging. potrebna koncentracija od 3 mg/l higromicina, što odgovara vrednostima higromicina utvrđenim za *V. cornuta*.

Selektivne koncentracije antibiotika mogu biti suviše jake i sprečiti regeneraciju transformanata (Boszoradova i sar., 2011). Iz tog razloga, kod pojedinih biljnih vrsta je pokazano da, bilo postupnim povećanjem ili smanjenjem koncentracije higromicina u podlozi može doći do povećanja efikasnosti selekcije (Metz i sar., 1995; Boszoradova i sar., 2011; Abou-Alaiwi i sar., 2012). Primena nižih koncentracija selektivnog agensa nakon transformacije ili čak odlaganje njegove primene za par dana omogućava transformisanim ćelijama da se dele, rastu i razvijaju se (Boszoradova i sar., 2011), što može značajno povećati efikasnost transformacije (Visser i sar., 1989). Ovakav način selekcije je pogodan za kulture koje se u uslovima *in vitro* veoma brzo regenerišu (Li i sar., 2013). Međutim, postoji verovatnoća da će netransformisane ćelije usled niskog selekcionog pritiska biti u mogućnosti da kompetiraju sa transformisanim ćelijama, pri čemu rast transformisanih ćelija može biti otežan ili čak eliminisan (Li i sar., 2013). Sa druge strane, visoke koncentracije higromicina pored eliminacije netransformisanih ćelija, mogu sprečiti regeneraciju izdanaka iz transformisanih ćelija sa niskom ekspresijom selektivnog marker gena, što za posledicu ima nisku efikasnost transformacije. Takođe, na taj način se favorizuje regeneracija iz ćelija u kojima je integrisano više kopija transgena, što može dovesti do utišavanja gena. Selekcija kod *V. cornuta* započeta je sa nižom koncentracijom higromicina kako bi bilo omogućeno preživljavanje i regeneracija izdanaka iz potencijalno transformisanih ćelija. Zatim je ona postepeno povećavana do koncentracije higromicina za koju je utvrđeno da inhibira regeneraciju izdanaka. Ovaj pristup se pokazao adekvatnim pri transformaciji *V. cornuta* jer je PCR analizom kod svih *Llccs*- potencijalno transformisanih linija potvrđeno prisustvo transgena, kao i kod 29 od 30 *35S-Llccs* potencijalno transformisanih linija.

Kod netransformisanih eksplantata hipokotila *V. cornuta* nakon 4 nedelje gajenja efikasnost regeneracije izdanaka dostigla je oko 30%, a izdanci su se pojavili oko petnaestog dana gajenja. Efikasnost regeneracije izdanaka iz inokuliranih eksplantata hipokotila *V. cornuta* nakon transformacije bila je drastično smanjena u odnosu na netransformisane eksplantate. Kod inokuliranih eksplantata hipokotila *V. cornuta* regeneracija izdanaka je bila redak događaj do koga je dolazilo tek između 15. i 20. dana od transformacije. Posle 2 meseca, efikasnost transformacije iznosila je od 0,3-2%, u zavisnosti od vektora koji je korišćen za transformaciju. Kod eksplantata lisnih drški *V. diffusa* Ging. efikasnost transformacije je iznosila 0,98% (Dai i sar., 2009), što na neki način predstavlja odraz sposobnosti vrsta roda *Viola* za transformaciju ovom metodom.

Pred uticaja genotipa i infekcije agrobakterijama, ne treba isključiti ni uticaj nosivnog pigmenta na smanjenje regenerativne sposobnosti transformisanog kalusa *V. cornuta*. Oko 10 puta manja efikasnost regeneracija izdanaka iz 35S-*Llccs* kalusa u odnosu na regeneraciju pri transformaciji sa "praznim vektorom", kao i izostanak regeneracije izdanaka kada su eksplantati transformisani vektorom gde je *Llccs* pod kontrolom "pojačanog" himernog promotora (*PchsA-Llccs*), upućuju na ovu mogućnost. Poznato je da introdukcija, ekspresija i produkt transgena mogu izazvati brojne, neočekivane promene, bilo na nivou ekspresije gena ili metabolizma biljke domaćina (Cellini i sar., 2004; Simó i sar., 2014; Ladics i sar., 2015). Ovaj plejotropni efekat transgena može se odraziti i na efikasnost regeneracije izdanaka iz transformisanog tkiva (Agarwal i sar., 2016). Pored toga, karotenoidi poseduju brojne biološke funkcije (Vershinin, 1999), od kojih je jedna od najvažnijih pravilno formiranje i funkcionisanje fotosintetičkog sistema (Domonkos i sar., 2013). Svetlost je faktor koji može značajno uticati na efikasnost regeneracije izdanaka, a potencijalni mehanizmi uključuju promene na nivou endogenih auksina (Nishimura i sar., 2006) i citokina (Smets i sar., 2005), fotoaktivaciju crvenim delom spektra (Qin i sar., 2005) ili fotooksidativna oštećenja (Dong i sar., 2006). Tako, na primer, mutacija enzima violaksantin-de-epoksidaze, koja dovodi do smanjene količine zeaksantina, za rezultat ima dramatičan pad regenerativne sposobnosti kod *A. thaliana* (Nameth i sar., 2013).

Izdanci koji su prvobitno indukovani na eksplantatima hipokotila *V. cornuta* nakon transformacije sa pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos vektorom nisu pokazivali pozitivnu GUS reakciju, iako je kalus bio GUS pozitivan. Razlog tome može biti to što su izdanci regenerisani iz kalusnog himernog tkiva koje se sastojalo od transformisanih i netransformisanih ćelija. Postepenim povećanjem koncentracije higromicina za selekciju omogućena je regeneracija izdanaka iz netransformisanih ćelija, što predstavlja jednu od mana ovakvog načina selekcije. Tek sa dodavanjem antibiotika u hranljivu podlogu, higromicina za selekciju (2,5 mg/l) i cefotaksima (200 mg/l), nakon dva meseca došlo je do ponovne indukcije izdanaka iz GUS pozitivnog kalusa. Pojava regeneracije nakon dodavanja higromicina i cefotaksima ukazuje da je bar jedan od ova dva antibiotika mogao imati induktivni efekat na regeneraciju izdanaka *V. cornuta* nakon transformacije.

Dve vrste induktivnih uslova koji dovode do morfogogenetskog odgovora biljnih tkiva su regulatori rastenja (njihov endogeni nivo ili egzogena primena) i različiti stresni faktori kao što su dehidracija, tretman povišenom ili niskom temperaturom, osmotski stres ili antibiotici (Coll i sar., 1998; Zavattieri i sar., 2010; Lee i sar., 2014; Haque i sar., 2017). Na molekularnom nivou, pokazno je da indukcija organogeneze izdanaka uključuje značajne promene transkriptoma, gde sticanje kompetentnosti ćelija kalusa za regeneraciju uključuje i povišenu ekspresiju gena koji se ekspimiraju u odgovoru na stres (Che i sar., 2006). Morfogogenetski odgovor biljne ćelije indukovani stresom podržuje inhibiciju njenog izduživanja, lokalizovanu stimulaciju ćelijskih deoba i promene statusa diferencijacije, pri čemu ovi odgovori biljne ćelije ne zavise od vrste stresa (Potters i sar., 2007). Tako su, na primer, osmotski stres ili higromicin u koncentraciji 5-10 mg/l odgovorni za diferencijaciju kalusnog tkiva *Camellia sinensis* (Aoshima, 2005). Sa druge strane, cefotaksim pripada grupi cefalosporina, koji su poznati kao  $\beta$ -laktamski antibiotici koji služe prvenstveno za eliminaciju *Agrobacterium*-a iz transformisanog tkiva (Liu i sar., 2011). Cefotaksim deluje tako što interaguje sa penicilin vezujućim proteinima u periplazmi bakterijske ćelije pri čemu dolazi do

inhibicije biosinteze peptidoglikana, specifične komponente ćelijskog zida bakterija, što za posledicu ima lizu bakterijske ćelije i njenu smrt (Nauerby i sar., 1997). Cefotaksim ne inhibira rast biljaka jer biljni ćelijski zid ne sadrži peptidoglikan (Shaikh i sar., 2015). U kulturi biljnih tkiva je pokazano da  $\beta$ -laktamski antibiotici mogu imati i pozitivan i negativan efekat na procese kalusogeneze, organogeneze i embriogeneze (Grzebelus i Skop, 2014; Wu i sar., 2015; Naderi i sar., 2016; Shahi i sar., 2017; Li i sar., 2019). Prema dostupnim literaturnim podacima cefotaksim može pozitivno uticati na indukciju izdanaka kada se primeni u niskim koncentracijama, od 100-300 mg/l (Liu i sar., 2011; Bernal i sar., 2013). U podlozi za regeneraciju izdanaka *Saccharum spp.* cefotaksim povećava učestalost formiranja zelenih i fiziološki zdravih izdanaka, zbog čega Kaur i saradnici (2008) smatraju da cefotaksim u somatskim ćelijama biljnog tkiva deluje na nivou biosinteze hlorofila. Pozitivan efekat na rastenje izdanaka u kulturi *in vitro* ogleđa se u konverziji cefotaksima u jedinjenje koje ispoljava aktivnost auksina, biljnog regulatora rastenja (Ogawa i Mii, 2007; Mahadev i sar., 2014). Swanberg i Dai (2008) su primetili da cefotaksim u koncentraciji 250 mg/l povećava učestalost regeneracije izdanaka *Catharanthus roseus* cv. 'Pacific Coral' sa 44% na 54,5%, dok kod kultivara *C. Roseus*, 'Sunstorm Rose', učestalost regeneracije izdanaka opada, sa 29% na 20%. Slični rezultati dobijeni su na odsečcima hipokotila *Cucumis melo* L., gde je pokazano da cefotaksim i egzogeno primenjeni regulatori rastenja kao što su BAP i IAA, imaju pozitivan sinergistički efekat na regeneraciju izdanaka i korenova, izduživanje izdanaka i rastenje kalusa (Naderi i sar., 2016).

Listovi izdanaka (35S-*Llccs*) koji su regenerisani nakon vraćanja antibiotika u hranljivu podlogu pokazivali su GUS pozitivnu reakciju (**Slika 19**). Nakon toga je i PCR metodom potvrđena integracija transgena - *Llccs*, *hpt* i *uidA* u listovima izdanaka *V. cornuta* (**Slika 21**). Jeknić i saradnici (2012) su isti ovaj vektor koristili za transformaciju *Iris germanica* cv. 'Hot Property', međutim, dobili su samo transformisano kalusno tkivo iz kog nije dobijena regeneracija izdanaka. Transformisani kalusi su promenili boju iz žute u različite nijanse narandžaste i crvene boje, a UHPLC metodom identifikovani su nosintetisani pigmenti kapsantin i kapsorubin (Jeknić i sar., 2012).

Transformacijom hipokotila *V. cornuta* sa pWBVec10a/E35S-PchsA::*Llccs*::TNos vektorom dobijeno je kalusno tkivo (PchsA-*Llccs*) koje je pokazivalo ekspresiju *uidA* gena. PCR analizom potvrđena je integracija *Llccs*, *hpt* i *uidA* gena, kod dve transformisane linije kalusa (**Slika 22**). Transformisani kalus je u uslovima dugog dana bio u različitim nijansama zelene, braon i narandžaste boje, ali kada je gajen u uslovima konstantnog mraka, odnosno odsustva svetlosti, uočena je promena u boji kalusa. On je dobio svetlo roze boju, što je verovatno posledica akumulacije nosintetisanog pigmenta koji daje crvenu boju, kao što je opisano u radu Jeknića i saradnika (2012). Istim vektorom transformisani su hipokotili *Solanum lycopersicum* L. cv. 'Moneymaker' (Jeknić, 2015), iz kojih su uspešno regenerisane transformisane biljke u čijim cvetovima su akumulirani kapsantin i kapsantinu-sličan pigment koji su cvetovima dali različite nijanse narandžaste boje.

### 5.3.1. Ekspresija *Llccs* gena u transformisanim biljkama

Potpuna regeneracija transformisanih biljaka *V. cornuta* postignuta je pri transformaciji sa vektorom kod koga je *Llccs* gen bio pod kontrolom CaMV 35S, konstitutivnog promotora. CaMV 35S je najčešće korišćen promotor za transformaciju biljnih vrsta jer obezbeđuje visok nivo konstitutivne ekspresije transgena u različitim tkivima (Dutt i sar., 2014). Međutim, pokazano je da se ekspresija transgena pod kontrolom 35S promotora može razlikovati između transformanata određene populacije transgenih biljaka koje nose isti vektor (De Buck i sar., 2013). Tako je kod *A. thaliana* pokazano da *GUS* gen pod kontrolom 35S kod 80% nezavisnih transformanata ima nisku ekspresiju, a kod 20% transformanata visoku ekspresiju (De Bolle i sar., 2003). Nivo ekspresije transgena regulisan 35S promotorom može varirati od tkiva do tkiva, uglavnom kao posledica pozicionog efekta (van Leeuwen i sar., 2001). T-DNK se nasumično ugrađuje u biljni genom pri

čemu svaki transformant sadrži isti transgen, ali se on integriše na različitim mestima na hromozomu i u različitom broju kopija (Windels i sar., 2008). Na jednom mestu na hromozomu može biti insertovan veći broj kopija transgena pod kontrolom 35S. Višestruke kopije T-DNK se tada mogu insertovati u vidu direktnih ili invertovanih ponovaka. Insercijom T-DNK u invertovanoj formi (glava-glava ili rep-rep) može doći do smanjene ekspresije transgena (Muskens i sar., 2000). Pošto T-DNK ponovci nisu pronađeni u bakterijama, smatra se da se orijentacija kopija T-DNK uspostavlja u biljnoj ćeliji pre ili tokom integracije T-DNK u biljni genom (De Buck i sar., 2001).

RT-PCR analizom je pokazano da se *Llccs* gen ekspirira i u listovima i u cvetovima transgenih linija *V. cornuta* (**Slika 24**). Metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR) određen je nivo ekspresije transgena u genomu *V. cornuta*. Između transformisanih linija postojale su razlike u ekspresiji *Llccs* gena u cvetovima i listovima. Čak i u unutar jedne transformisane linije utvrđeni su različiti nivoi ekspresije *Llccs* gena u cvetovima i listovima (**Histogram 9**).

Analizom ekspresije gena biosintetskog puta karotenoida i količine akumuliranih pigmenata, ustanovljeno je da u kruničnim listićima cvetova veći nivo transkripata za enzime biosintetskog puta karotenoida dovodi i do povećanja sadržaja karotenoida u hromoplastima (Ohmiya, 2013). Povećan nivo ekspresije *psy* i *zds* gena kod *Gentiana lutea* (Zhu i sar., 2002), i *pds* i *chyb* kod *Sandersonia aurantiaca* (Nielsen i sar., 2003) doveo je do povećanja akumulirane količine karotenoida. Moehs i saradnici (2001) su pokazali da u narandžastim cvetovima *Tagetes erecta* *psy* i *dxs* imaju veću ekspresiju nego kod žutih cvetova. Kod azijskog hibridnog ljiljana je ustanovljeno da je veća količina karotenoida u žutim i crvenim cvetovima povezana sa transkripcijom gena biosintetskog puta karotenoida (Yamagishi i sar., 2010). Svi dobijeni rezultati pokazali su da je količina akumuliranih karotenoida u cvetovima biljaka proporcionalna ekspresiji gena biosintetskog puta karotenoida (Moehs i sar., 2001; Yamagishi i sar., 2010; Ohmiya, 2013). Ekspresija *ccs* u cvetovima regulisana je takođe na ovaj način (Jeknić i sar., 2012). Sa sazrevanjem cveta ljiljana dolazi do povećanja ekspresije *ccs* gena. Količina akumuliranih karotenoida sve više raste, a cvetovi dobijaju tamnije nijanse narandžaste boje (Jeknić i sar., 2012). Intenzitet narandžaste boje cvetova transformisanih linija *V. cornuta* takođe odgovara ekspresiji transgena i količini novosintetisanog pigmenta kapsantina koja je određena HPLC metodom (**Slika 30**).

Isti mehanizam regulacije ekspresije gena i akumulacije karotenoida utvrđen je i kod plodova paprike (*Capsicum annuum*), kod kojih je *ccs* dominantni gen koji kodira sintezu crvenih pigmenata, kapsantina i kapsorubina (Bouvier i sar., 1994). Odsustvo ili smanjena količina kapsantina u žutim ili narandžastim plodovima paprike rezultat su gubitka ili niže ekspresije *ccs* gena (Guzman i sar., 2010; Rodriguez-Urbe i sar., 2012). Iako su kapsantin i kapsorubin glavni pigmenti paprike koji joj daju crvenu boju, pokazano je da boja ploda paprike ne zavisi samo od aktivnosti *CCS* već i od ekspresije uzvodnih gena biosintetskog puta karotenoida, *psy*, *lcyb* i *crtZ* (Tian i sar., 2014; Tian i sar., 2015). Utišavanje jednog ili više gena biosintetskog puta istovremeno, dovodi do redukcije sadržaja kapsantina i samim tim do promene boje ploda paprike iz crvene u narandžastu ili žutu boju (Tian i sar., 2014).

### 5.3.2. Akumulacija karotenoida u cvetovima biljaka transformisanih biljaka

Ksantofili se u hromoplastima nalaze u esterifikovanoj formi, ali se malo zna o mehanizmima njihove akumulacije u cvetovima biljaka. Mutacija u *PALE YELLOW PETAL 1* genu *S. lycopersicum* dovela je do gubitka estara ksantofila, što se odrazilo na smanjenje ukupne količine karotenoida u cvetovima i nepravilan razvoj hromoplasta. Ovaj podatak je ukazao da esterifikacija ksantofila dejstvom ksantofil-esteraze pospešuje akumulaciju karotenoida i da je akumulacija estara važna za normalan razvoj hromoplasta (Ariizumi i sar., 2014). Poređenjem svetlo žutih cvetova petunije i tamno žutih cvetova *Calibrachoa* potvrđen je značaj esterifikacije ksantofila u cilju povećanja količine akumuliranih karotenoida (Kishimoto i sar., 2019). Nizak nivo ksantofil esteraze u cvetovima petunije je ključni faktor zbog koga oni nisu tamnije žute boje, što ukazuje da aktivnost ksantofil-esteraze utiče na količinu i sastav karotenoida u cvetovima biljaka



(Ohmiya i sar., 2019). U transformisanim cvetovima *Ipomoea nil* HPLC metodom identifikovano je prisustvo dva novosintetisana pigmenta, zeaksantina i neoksantina (Watanabe i sar., 2017). Pošto se hromatogrami nesaponifikovanih i saponifikovanih ekstrakata cvetova nisu razlikovali, autori su pretpostavili da se pigmenti u cvetovima *I. nil* nalaze u neesterifikovanoj formi. Samo akumulacija novosintetisanih pigmenta nije bila dovoljna za promenu boje cveta (Watanabe i sar., 2017).

Promena boje cveta kod aklimatizovanih transformisanih biljaka (35S-*Llccs*) *V. cornuta* bila je uočljiva, kao i kod cvetova *S. lycopersicum*, transformisanih istim vektorom (Jeknić, 2015). U odnosu na kontrolne cvetove (K i *Llccs*-) koji su bili žute boje, transgeni cvetovi (35S-*Llccs*) su bili u različitim nijansama narandžaste boje (**Slika 23**). Na osnovu posmatranja faze cvetanja *V. cornuta*, može se pretpostaviti da se u kruničnim listićima cvetnih pupoljaka svetlo zelene boje nalaze i karotenoidi i hlorofili, kao i kod cvetnih pupoljaka ljljana (Weston i Pyke, 1999; Robert i sar., 2004; Sadali i sar., 2019). Po otvaranju cvetova, razlike u boji između netransformisanih i transformisanih biljaka *V. cornuta* bile su sve izraženije. Na mikroskopskim preseccima 35S-*Llccs* transformisanih cvetova *V. cornuta*, bile su jasno vidljive epidermalne ćelije u čijoj osnovi su se nalazili brojni hromoplasti ispunjeni crvenim pigmentom. Razlike u obliku i veličini epidermalnih ćelija kod netransformisanih i 35S-*Llccs* transformisanih cvetova *V. cornuta* nisu uočene. Suzuki i saradnici (2007) su kod *L. japonicus* dobili slične rezultate u pogledu oblika i veličine epidermalnih ćelija kruničnih listića cvetova. HPLC metodom je u uzorcima cvetova transformisanih biljaka *V. cornuta* identifikovan pigment kapsantin koji je produkt enzimske aktivnosti CCS. Pošto kapsorubin nije identifikovan, a nastaje dejstvom istog enzima, pretpostavlja se da žuta boja cveta kontrolnih biljaka vodi poreklo od akumuliranog anteraksantina. Ekspresija transgena može dovesti do promene boje ne samo kruničnih listića cvetova već i drugih delova cveta. Kod *S. lycopersicum* pored kruničnih listića, i prašnici su promenili boju u narandžasto-crvenu (Jeknić, 2015). Kod *V. cornuta*, žig tučka transformisanih cvetova promenio je boju, iz svetlo zelene u narandžasto-braon (**Slika 28**).

Među mnoštvom transformisanih cvetova *V. cornuta* (35S-*Llccs*), bilo je i himernih cvetova narandžaste boje kod kojih su bile vidljive žute pruge. Himerne biljke se sastoje od genetički različitih ćelija, transformisanih i netransformisanih (McHuguen, 2002). Pojava himerizma zabeležena je kod dikotiledonih biljnih vrsta koje su transformisane pomoću *Agrobacterium* kao što su pamuk (Firoozabady i sar., 1987), duvan (Schmulling i Schell, 1993), soja (Christou, 1990) i *Vigna mungo* (Muruganatham i sar., 2007). Regenerisane transformisane biljke duvana iz eksplantata lisnih diskova imale su listove čiji su delovi bili i u svetlo zelenoj boji, ali i u tamno zelenoj boji koja odlikuje netransformisane biljke. Ovakva pojava je ukazala na različito klonalno poreklo regenerisanih biljaka koje kasnije može dovesti do stvaranja netransformisanih potomaka (Schmulling i Schell, 1993). Pojave himera kod biljnih vrsta mogu biti i rezultat viševićijskog porekla izdanaka (Poethig, 1989; Zhu i sar., 2007), naročito kada se na mestu povrede/preseka eksplantata formiraju nodule iz kojih se izdanci regenerišu indirektnom organogenezom (Gahan i George, 2008). Pored toga, do pojave himernih cvetova može dovesti i epigenetsko utišavanje gena (De Schepper i sar., 2001; Morita i Hoshino, 2018) koje predstavlja prirodni fenomen u kome je ekspresija gena regulisana modifikacijom DNK, RNK ili histonskih proteina. Ekspresija transgena u genomu domaćina može biti negativno regulisana od strane susednih DNK sekvenci ili jednostavno lokacijom integracije transgena na hromozomu (Matzke i sar., 2000). Utišavanje transgena u genomu domaćina može se odvijati na transkripcionom (TGS, eng. *Transcriptional Gene Silencing*) i post-transkripcionom nivou (PTGS, eng. *Post-Transcriptional Gene Silencing*) (Stam i sar., 1997; Rajeevkumar i sar., 2015). Transkripciono utišavanje gena je povezano sa inaktivacijom promotorskih sekvenci i metilacijom DNK (Park i sar., 1996). Sparivanjem blisko povezanih kopija transgena ili endogenih gena formiraju se sekundarne DNK strukture koje predstavljaju mesta metilacije DNK (Vaucheret i Fagard, 2001). U slučaju PTGS, promotori su aktivni, dolazi do transkripcije iRNK, ali se ona usled degradacije ne akumulira u citoplazmi ćelije, zbog čega ne dolazi do sinteze željenog produkta (Stam i sar., 1997). Ako su transgen i endogeni gen homologni, oni takođe mogu biti utišani na PTGS nivou. Mnoge transgene linije petunije su delimično ili

potpuno izgubile aktivnost oba gena, transgena i endogenog gena, procesom kosupresije (Van der Krol i sar., 1990). Ponekad je ekspresija gena na PTGS nivou razvojno regulisana. Na primer utišavanje transgena *uidA* duvana se dešava posle dve do šest nedelja nakon klijanja, u zavisnosti od nivoa ekspresije transgena (Elmayan i Vauchert, 1996). Utišavanje transgena se još može postići metilacijom i acetilacijom histona, kao i remodelovanjem hromatina. Transkripcioni pojačivači i DNK sekvence za koje se vezuje nuklearni matriks (MAR, eng. *Matrix-Attachment Regions*) regulišu transkripciju transgena putem acetilacije histona promotorskog i obližnjeg kodirajućeg regiona, dovodeći do promene u strukturi hromatina (Agaloti i sar., 2000; Fernandez i sar., 2001). Enzimi koji modifikuju histone i vrše remodelovanje hromatina koriste ATP koji utiče na njegovu strukturu i funkciju (Loidl, 2004).

U poslednje vreme istraživanja promene boje cveta metaboličkom modifikacijom biosinteze karotenoida se najčešće izvode na novom model sistemu *I. nil* koja ima cvetove u crvenoj, ružičastoj, ljubičastoj, braon i beloj boji, ali ne i u žutoj boji. Uvođenjem gena za enzime (GGPS, PSY, LCYB i CHYB) iz *I. obscura* var. *lutea* sa žutim cvetovima metodom genetičke transformacije nije promenjena boja cveta iako je došlo do sinteze pigmenata, zeaksantina i neoksantina, u cvetovima transgenih biljaka (Watanabe i sar., 2017). Primenom CRISPR/Cas9 sistema utišan je gen za *CCD4*, što je dovelo do raskidanja dvostrukih veza u polienskim lancima karotenoida. Kao rezultata toga, transformisani cvetovi su dobili žutu boju i količina karotenoida u kuničnim listovima cvetova povećana je za 20 puta u odnosu na kontrolne cvetove biljaka *I. nil*. Mala količina karotenoida u cvetovima ne zavisi samo od ekspresije gena koji učestvuju u biosintezi karotenoida već i od degradacije karotenoida koja je pod kontrolom *CCD4* (Watanabe i sar., 2018). Sadržaj karotenoida u cvetovima regulisan je balansom između biosinteze i degradacije karotenoida (Kishimoto i sar., 2018). Kod petunija sa svetlo žutim cvetovima nalazi se mala količina karotenoida koja daje žutu boju. Poređenjem ekspresije gena koji učestvuju u metabolizmu karotenoida kod biljaka sa belim i žutim cvetovima, ustanovljeno je da kod petunija sa žutim cvetovima dve mutacije u *CCD4a* genu snižavaju njegovu ekspresiju i uzrokuju pojavu cvetova žute boje. Upoređivanjem karotenoidnih profila *Petunia hybrida* sa svetlo žutim cvetovima i *Calibrachoa hybrida* sa tamno žutim cvetovima otkriveno je da se kod petunije nalazi mala količina akumuliranih karotenoida uglavnom kao posledica snižene ekspresije gena koji kodiraju enzime za sintezu violaksantina i neoksantina, povećane katalitičke aktivnosti karotenoid dioksigenaza i snižene stope esterifikovanih ksantofila (Kishimoto i sar., 2019). Ali da bi se utvrdilo na koji način esterifikacija ksantofila podstiče akumulaciju karotenoida, potrebno je još istraživanja u ovoj oblasti.

Metaboličke modifikacije biosinteze karotenoida ne dovode uvek do značajnih promena u količini akumuliranih karotenoida (Watanabe i sar., 2017). Jedan od razloga može biti postojanje faktora koji istovremeno utiče i na metabolizam karotenoida i na njihovu akumulaciju (Watanabe i sar., 2018). Metabolizam karotenoida je dobro proučen i skoro svi enzimi koji učestvuju u biosintetskom putu karotenoida su identifikovani i okarakterisani (Ohmiya, 2019). Međutim, sam mehanizam sinteze karotenoida je slabo poznat, u smislu regulacije biogeneze hromoplasta i metaboličkog puta karotenoida. U budućnosti bi trebalo posvetiti pažnju upravo regulatornim faktorima koji su odgovorni za navedene procese. Dobijena saznanja bi bila od koristi prilikom metaboličkog inženjeringa u cilju poboljšanja nutritivnih i estetskih karakteristika biljaka.

### 5.3.3. Fenotipske karakteristike transformisanih linija

Kod *V. cornuta* zabeležene su značajne razlike u morfološkim i fenotipskim karakteristikama između netransformisanih i transformisanih biljaka (**Tabela 33**). Dobijene razlike mogu biti posledica fizioloških, genetičkih ili epigenetičkih promena indukovanih gajenjem u kulturi *in vitro* ili u fazi regeneracije izdanaka tokom i nakon genetičke transformacije. Ipak, osim veličine cveta, za sve druge parametre morfoloških i fenotipskih karakteristika transformisanih biljaka nije postojala pravilnost u odstupanju od fenotipa netransformisanih biljaka. Sve *Llccs-*

transformisane linije imale su sitnije cvetove u odnosu na kontrolne biljke, što može predstavljati novu osobinu koja je posledica uvođenja *Llccs* gena u genom *V. cornuta*.

Gajenje biljaka u kulturi *in vitro* može dovesti do pojave fenotipskih promena kao rezultat somaklonalnih varijacija ili mutacija. Varijacije se obično dešavaju spontano i mogu biti ili privremene ili trajne (Kaepler i sar., 2000). Privremene promene su reverzibilne, dok su trajne promene nasledne i često predstavljaju odraz već postojeće varijacije ili su rezultat *de novo* varijacija (Larkin i Scowcroft, 1981). Postoji mnogo faktora koji doprinose somaklonalnoj varijabilnosti u kulturi *in vitro*, od kojih su najznačajniji tip eksplantata, zatim tip i koncentracija biljnih regulatora rastenja, broj subkultura i njihovo trajanje, genotip i uslovi gajenja. Poznato je da su meristemska tkiva daleko osetljivija po pitanju pojave varijacija od visoko diferenciranih tkiva kao što su list, stablo i koren (Sharma i sar., 2007). Izdanci koji kasnije regenerišu imaju veću verovatnoću za pojavu somaklonalnih varijacija. U procesima embriogeneze i regeneracije izdanaka prilikom diferencijacije ćelija može doći do promene u nivou metilacije DNK koja za posledicu ima već pomenuto utišavanje gena (Vaillant i Paszkowski, 2007). Često se te promene odražavaju na fenotip regenerisanih biljaka (Villota-Salazar i sar., 2016). Biljni regulatori rastenja, a naročito sintetički auksini kao što je 2,4-D, koji dovode do formiranja kalusa mogu uticati i na pojavu varijacija (LoSchiavo i sar., 1989). Takođe, ukoliko se kulture dugo gaje i ako subkultura dugo traje, mogu se javiti određene varijabilnosti između jedinki. Sam proces genetičke transformacije u kome se eksplantati inokuliraju bakterijama predstavlja jednu vrstu biotičkog stresa, koja za posledicu može imati nepravilno rastenje i razviće regenerisanih izdanaka. Pred toga, i antibiotici koji se koriste u procesu transformacije utiču na metilaciju DNK (Miguel i Marum, 2011). Prisustvo higromicina i cefotaksima u hranljivoj podlozi, u kulturi *in vitro Nicotiana tabacum* dovelo je do hipermetilacije DNK koja se negativno odrazila na ekspresiju gena, a potom i na razviće biljke (Schmitt i sar., 1997). Takođe, pomenuti mehanizmi epigenetske regulacije ekspresije gena mogu uticati na pojavu fenotipskih razlika između gajenih biljaka (Miguel i Marum, 2011). U literaturi je opisano da produkti razgradnje karotenoida mogu uticati na rastenje i razviće biljaka. Transformisane biljke *Chrysanthemum morifolium* 'Yellow Jimba' u kojima je dvostrukom transformacijom snižena ekspresija *CmCCD4* gena bile su niže u odnosu na netransformisane biljke, ali se veličina cvetova nije menjala (Ohmiya i sar., 2009). Karotenoid-dioksidaze, *AtCCD7* i *AtCCD8*, učestvuju u sintezi signalnog molekula strigolaktona (Gomez-Roldan i sar., 2008) koji reguliše grananje biljaka (Schwartz i sar., 2004). Utišavanje *PhCCD8* gena putem RNK interferencije dovelo je do povećanja grananja i formiranja sitnijih cvetova kod *Petunia hybrida* (Snowden i sar., 2005).

#### 5.4. Krioprezervacija transformisanih linija *V. cornuta*

Razvoj tehnik kulture *in vitro* i krioprezervacije, doprineli su stvaranju uslova za čuvanje retkih i ugroženih vrsta, lekovitih i elitnih genotipova (Kulus i Zalewska, 2014). Uspešnost krioprezervacije zavisi od brojnih faktora, među kojima su tolerancija biljaka na osmotski, hemijski, hladni stres i isušivanje najznačajniji. Saznanja o biologiji vrste su neophodna kako bi se odabrala odgovarajuća tehnika krioprezervacije kojom će se postići najveće preživljavanje. Održavanje transformisanog biljnog materijala samo u kulturi *in vitro* zahteva značajna materijalna sredstva jer se kulture moraju relativno često subkultivisati na svežu hranljivu podlogu. Pored toga, može doći do gubitka kultura usled kontaminacije. Još važnije od toga, postoji mogućnost da tokom vremena dođe do utišavanja transgena (Wang i sar., 2012). Krioprezervacija stoga predstavlja bezbedan način za dugotrajno čuvanje transformisanog materijala na ultra niskoj temperaturi (-196 °C) u tečnom azotu. Uspešnu regeneraciju transformisanih ćelijskih linija *Oryza sativa* L. nakon krioprezervacije prvi put su dobili Meijer i saradnici (1991). Transgene ćelijske linije *O. sativa* L. zadržale su otpornost na higromicin i sposobnost regeneracije nakon krioprezervacije kao i kulture koje nisu krioprezervirane (Meijer i sar., 1991). Od tada, opisane su metode krioprezervacije transgenih biljaka u kojima je integrisana željena polinukleotidna sekvenca (Tsai i sar., 2009; Wang

i sar., 2012; Li i sar., 2016). Svi rezultati koji su dobijeni do sada ukazuju da krioprezervacija biljnog materijala ne utiče na ekspresiju transgena (Spök i Karnar, 2008).

Krioprezervacija tehnikom vitrifikacije podrazumeva upotrebu posebnih rastvora za dehidraciju biljnog materijala, PVS. Rastvori PVS2 i PVS3 se razlikuju po sastavu. PVS2 sadrži glicerol i DMSO koji prodiru kroz ćelijske zidove i membrane, stvarajući pore u fosfolipidnom dvosloju kroz koji se odvija transport supstanci, dok PVS3 ne sadrži DMSO zbog čega ostaje u intercelularnom prostoru. Kod nekih biljnih vrsta vrhovi izdanaka su podjednako osetljivi prema PVS2 i PVS3, dok su kod nekih vrsta vrhovi izdanaka bili ekstremno osetljivi prema PVS3, posle čijeg tretmana nije bilo preživljavanja (Marković i sar., 2013). Osetljivost vrhova izdanaka na PVS2 i PVS3 može biti i podjednaka, kao što je kod vrste *C. rosea* (Da Silva Cordeiro i sar., 2015). Ispitivanjem osetljivosti vrhova izdanaka *V. cornuta* na PVS2 i PVS3, značajno veći procenat preživljavanja je dobijen nakon osmotske dehidracije pre potapanja u tečni azot sa PVS3 rastvorom (43,33%) nego sa PVS2 rastvorom (22,72%). Krioprotektanti koji ulaze u sastav PVS3 ne prodiru u ćelije, pa se pretpostavlja da je to razlog zbog koga je preživljavanje vrhova izdanaka *V. cornuta* nakon izlaganja PVS3 bilo veće nego na PVS2 (**Tabela 35**).

Hladan predtretman pre izlaganja rastvoru za dehidraciju doprinosi većem preživljavanju i boljem oporavku biljnog materijala nakon krioprezervacije (Matsumoto i sar., 1995; Geng i sar., 2011; Kulus i Zalewska, 2014; Folgado i sar., 2015). Izlaganje biljnog tkiva niskoj temperaturi predstavlja jednu vrstu abiotičkog stresa nakon čega dolazi do transdukcije signala i promena na nivou ekspresije gena kao odgovor biljaka na stres (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006; Folgado i sar., 2011). Tako je kod *Arabidopsis* otkriven transkripcioni faktor CBF/DREB1 koji kontroliše ekspresiju gena koji povećavaju toleranciju biljaka na hladnoću (Thomashow, 1999) i na taj način omogućavaju adaptaciju biljnog tkiva na stresne uslove sredine (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Izdanci *Viola pilosa* su imali veći procenat oporavka nakon otapanja iz LN, kada su bili na hladnom predtretmanu (4 °C) mesec dana pre osmotske dehidracije sa PVS2 i zamrzavanja (Soni i Kaur, 2014). Hladan predtretman pre krioprezervacije sa PVS3 rastvorom u trajanju od 2 nedelje pokazao se izuzetno pogodnim i kod *V. cornuta* (**Tabela 36**). Nakon krioprezervacije, preživljavanje vrhova izdanaka je bilo dva puta veće nakon izlaganja hladnom predtretmanu (86,67% u odnosu na 43,33%). Potpuni oporavak i rastenje vrhova izdanaka nakon krioprezervacije bio je takođe značajno veći posle primene hladnog tretmana (64,08%) za razliku od vrhova izdanaka koji nisu prošli hladani predtretman (39,72%).

Optimizacija vremena izlaganja vitrifikacionom rastvoru za dehidraciju je neophodna radi postizanja što boljeg oporavka vrhova izdanaka nakon krioprezervacije. Optimalno vreme izlaganja vrhova izdanaka PVS2 rastvoru najčešće varira između 15 i 25 minuta kada su izlagani na sobnoj temperaturi (Takagi i sar., 1997). Upotreba PVS3 najčešće podrazumeva duži period inkubacije u odnosu na PVS2, kao što je pokazano kod hrizantema (Kulus i Zalewska, 2014). Pored toga, aksilarni i apikalni vrhovi izdanaka hrizanteme zahtevaju različito vreme izlaganja PVS3 rastvoru. Za uspešnu regeneraciju izdanaka ove vrste nakon krioprezervacije apikalni vrhovi izdanaka zahtevaju 90 min inkubacije u PVS3 a aksilarni 60 min (Lee i sar., 2011). Najveći procenat preživljavanja i oporavka nakon krioprezervacije *Citrus limon* postignut je dehidracijom sa PVS3 u trajanju od 90 minuta (Yi i sar., 2018). Kod *V. cornuta* najveći procenat preživljavanja vrhova i potpune regeneracije izdanaka posle otapanja iz tečnog azota dobijen je nakon izlaganja PVS3 u trajanju od 45 minuta pre zamrzavanja (**Tabela 37**), što je duplo kraći vremenski period nego kod pomenutih biljnih vrsta.

V krio pločice se koriste kao naprednija tehnika vitrifikacije, koja obezbeđuje dobar oporavak nakon krioprezervacije baš kao i klasična vitrifikacija, uz minimalne manipulacije biljnim materijalom. U literaturi je opisano nekoliko primera da se primenom ove tehnike postiže viši procenat oporavka vrhova izdanaka nakon krioprezervacije, koji iznosi od 65-100% (Yamamoto i sar., 2011; Sekizawa i sar., 2011; Yamamoto i sar., 2012). Kod *V. cornuta* je ispitan potencijal obe tehnike, i klasične vitrifikacije sa PVS2 i vitrifikacije sa PVS3 rastvorom uz krio pločice (**Tabela 39, Slika 34**), na krioprezervaciju vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih biljaka.

Oporavak vrhova izdanaka nakon krioprezervacije primenom obe tehnike, bio je značajno veći kod netransformisanih biljaka (64,53% odnosno 77,12%) nego kod 35S-*Llccs* transformisanih biljaka (21,85% odnosno 21,78%). Za krioprezervaciju vrhova izdanaka *V. cornuta* mogu se koristiti i jedna i druga tehnika, jer se primenom obe tehnike postižu približne vrednosti u njihovom oporavku. Sve transformisane biljke *V. cornuta* regenerisane iz vrhova izdanaka koji su čuvani u tečnom azotu imali su pozitivnu GUS reakciju (**Slika 35**). Stabilna ekspresija *uidA* gena potvrđena je i kod transgenih biljaka *Pyrus pyrifolia* pomoću PCR analize i Southern blot-a (Hao i sar., 2005). Uspešnu krioprezervaciju transgene *Carica papaya* postigli su Tsai i saradnici (2009), međutim nije rađena analiza prisustva i ekspresije transgena u regenerisanim biljkama nakon krioprezervacije. Transgene biljke *Betula pendula* posle krioprezervacije imale su isti broj kopija *NPTII* gena kao i netransformisane biljke koje nisu krioprezervirane (Ryynänen i sar., 2002). Regenerisane transgene biljke nakon krioprezervacije zadržavaju fenotipske karakteristike koje su imale pre krioprezervacije (Li i sar., 2016). Takođe, promene fenotipskih karakteristika regenerisanih transformisanih biljaka *V. cornuta* nakon krioprezervacije nisu uočene. Primenom metoda vitrifikacije sa i bez krio pločica pokazano je da se uspešno može čuvati ne samo biljni materijal dobijen u postupku propagacije, već i transformisani biljni materijal.

#### 5.4.1. Nivo ploidnosti regenerisanih biljaka *V. cornuta*

Genetička identičnost regenerisanih biljaka u kulturi *in vitro* je od velikog značaja za očuvanje genskog fonda odabranih biljnih vrsta. Kao posledica brojnih faktora kulture *in vitro* može doći do genetičkih i fenotipskih varijacija kod regenerisanih biljaka. Najbezbedniji način za očuvanje genetičke identičnosti regenerisanih biljaka u kulturi je putem multplikacije aksilarnih izdanaka. Indukcija regeneracije izdanaka *V. cornuta* postignuta je na oba načina organogeneze, i direktne i indirektno. Analizom broja hromozoma kod regenerisanih netransformisanih i transformisanih biljaka utvrđeno je da nije bilo razlika na nivou ploidnosti (**Slika 36**). Jedan od razloga može biti to što su indukovani izdanci kratko gajeni na podlozi sa 2,4-D a zatim izolovani sa početnog eksplantata i potom gajeni na drugim podlogama bez 2,4-D. Transformisane biljke *V. cornuta* imale su isti broj hromozoma kao i netransformisane biljke. Uspešnost krioprezervacije ogleda se i u održanju genetičke stabilnosti krioprezerviranog biljnog materijala. Smatra se da čak i ako postoje razlike između kontrolnih i krioprezerviranih genotipova, one su pre svega posledica uslova kulture *in vitro* i regenerativnog procesa a ne same krioprezervacije (Harding, 2004). Kod *V. cornuta* nakon krioprezervacije, regeneracija netransformisanih i transformisanih biljaka je uspostavljena direktnom organogenezom, bez formiranja kalusa, što takođe doprinosi očuvanju ploidnosti regenerisanih biljaka.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Razvijen je protokol za *in vitro* regeneraciju izdanaka *V. cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens' putem *de novo* organogeneze.

- ◆ Na klijanje semena u uslovima *in vitro* utiče dužina gajenja, koncentracija mineralnih soli u hranljivoj podlozi kao i temperatura gajenja. Semena su najbolje klijala nakon 12 nedelja gajenja na podlogama sa razblaženi MS rastvorom ( $\frac{1}{4}$ MS i  $\frac{1}{2}$ MS), kao i na MS hranljivoj podlozi kada su semena gajena na sniženim temperaturama (10 i 4 °C).
- ◆ Najuspešnija regeneracija adventivnih izdanaka dobijena je gajenjem odsečaka hipokotila na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D i 2 mg/l BAP.
- ◆ Najveći regenerativni potencijal pokazali su delovi hipokotila koji su najbliži epikotilu klijanca kada su gajeni u uslovima dugog dana.
- ◆ Indukcija adventivnih izdanaka odvija se paralelno procesom direktne i indirektno *de novo* organogeneze.
- ◆ Citokinini derivati fenilureee (TDZ i CPPU) pokazali su veći potencijal za indukciju i umnožavanje izdanaka nego citokinini derivati adenina (BAP i KIN).
- ◆ Ožiljavanje izdanaka je bilo uspešno na  $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez regulatora rasteanja kao i na  $\frac{1}{2}$ MS podlozi uz dodatak 0,1 mg/l NAA.

2. Razvijen je protokol za genetičku transformaciju *V. cornuta* L. 'Lutea Splendens' genom za kapsantin-kapsorubin-sintazu (*Llccs*) posredstvom *Agrobacterium tumefaciens*.

- ◆ Korišćenjem "praznog vektora" (*Llccs*-) i pWBVec10a/CaMV 35S::*Llccs*::TNos (35S-*Llccs*) vektora dobijeni su transformisani izdanci, dok je korišćenjem pWBVec10a/PchsA-*Llccs*::TNos (PchsA-*Llccs*) vektora dobijen transformisani kalus.
- ◆ Efikasnost genetičke transformacije za *Llccs*- iznosila je 2%, za 35S-*Llccs* 0,3%, dok je za PchsA-*Llccs* ona iznosila 2,22%.
- ◆ Potvrđeno je prisustvo *Llccs*, *hpt* i *uidA* gena u genomu *V. cornuta*, kao i nivo ekspresije *Llccs* gena u kruničnim listićima i listovima 35S-*Llccs* transformisanih biljaka.
- ◆ Nivo ekspresije *Llccs* gena se razlikovao u kruničnim listićima cvetova i listova 35S-*Llccs* transformisanih biljaka. Neujednačena ekspresija je postojala kako između transformisanih linija, tako i unutar iste linije.
- ◆ Boja kruničnih listića cvetova i žiga tučka 35S-*Llccs* transformisanih biljaka promenjena je iz žute u različite nijanse narandžaste boje, odnosno iz svetlo zelene u narandžasto-braon boju, usled akumulacije nosintetisanog crvenog pigmenta u hromoplastima.
- ◆ Pokazano je da je nosintetisani crveni pigment kapsantin, čija je akumulacija bila proporcionalna nivou ekspresije *Llccs* gena u kruničnim listićima 35S-*Llccs* transformisanih biljaka.
- ◆ Fenotip transformisanih biljaka se značajno razlikovao od fenotipa netransformisanih biljaka, pri čemu su cvetovi transformisanih biljaka (35S-*Llccs*) bili značajno manjih dimenzija nego kod kontrolnih transformisanih biljaka (*Llccs*-) i kontrolnih netransformisanih biljaka.

3. Razvijen je protokol za dugotrajno čuvanje vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih biljaka *V. cornuta* L. cv. 'Lutea Splendens'.

- ◆ Najveće preživljavanje vrhova izdanaka netransformisanih i transformisanih linija (*Llccs*-) postignuto je kada su vrhovi tretirani PVS3 rastvorom u trajanju od 45 minuta pre potapanja u tečni azot.
- ◆ Pretretman vrhova izdanaka u trajanju od 2 nedelje na 4 °C značajno je doprineo boljem preživljavanju, oporavku i potpunoj regeneraciji vrhova izdanaka nakon otapanja iz tečnog azota.

- ◆ Potpuna regeneracija biljaka transformisanih linija (*Llccs*- i 35S-*Llccs*) posle krioprezervacije bila je značajno manja u odnosu na oporavak vrhova netransformisanih izdanaka.
- ◆ Potvrđeno je prisustvo *uidA* gena u uzorcima listova transformisanih linija (*Llccs*- i 35S-*Llccs*) regenerisanih posle krioprezervacije.
- ◆ Nivo ploidnosti biljaka *V. cornuta* regenerisanih u kulturi *in vitro*, transformisanih linija kao i biljaka regenerisanih posle krioprezervacije ostao je nepromenjen ( $2n=22$ ).

## 7. LITERATURA

- Abou-Alaiwi WA, Potlakayala SD, Goldman SL, Josekutty PC, Karelia DN, Rudrabhatla SV (2012) *Agrobacterium*-mediated transformation of the medicinal plant *Centaurea montana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109: 1–8.
- Afshari RT, Angoshtari R, Kalantari S (2011) Effect of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics 4: 60-67.
- Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. Cell 103: 667-78.
- Agarwal P, Dabi M, More P, Patel K, Jana K, Agarwal PK (2016) Improved shoot regeneration, salinity tolerance and reduced fungal susceptibility in transgenic tobacco constitutively expressing PR-10a gene. Frontiers in Plant Science 7: 217.
- Aida R, Yoshida T, Ichimura K, Goto R, Shibata M (1998) Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating ACC oxidase transgene. Plant Science 138: 91-101.
- Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, Shibata M (2000) Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. Plant Science 153: 33-42.
- Akasaka Y, Daimon H, Mii M (2000) Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. Plant Science 156: 169–175.
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S (2012) The path from  $\beta$ -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. Science 335: 1348-1351.
- Amareshwari P, Venkatesh K, Roja Rani A (2019) Effect of hygromycin on peanut germination and its application in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8: 263-267.
- Amasino RM, Cheung AY, Dresselhaus T, Kuhlemeier C (2017) Focus on flowering and reproduction. Plant Physiology 173: 1-4.
- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary vectors. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds), Plant Molecular Biology Manual, pp. A3/1-19. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- An J, Song A, Guan Z, Jiang J, Chen F, Lou W, Fang W, Liu Z, Chen S (2014) The over-expression of *Chrysanthemum crassum* CcSOS1 improves the salinity tolerance of chrysanthemum. Molecular Biology Reports 41: 4155-4162.
- Anami S, Njugna E, Coussens G, Aesaert S, Van Lijsebettens M (2013) Higher plant transformation: principles and molecular tools. The International Journal of Developmental Biology 57: 483-494.
- Antonić D, Trajković M, Cingel A, Subotić A, Jevremović S (2017) Plant regeneration from *in vitro*-derived leaf and petiole explants of *Viola cornuta* L. 'Lutea Splendens'. Propagation of Ornamental Plants 17: 95–102.
- Aoshima Y (2005) Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. Plant Biotechnology 22: 277-280.
- Arcos-Ortega GF, Chan-Kuuk RA, González-Kantún WA, Souza-Perera R, Nakazawa-Ueji YE, Avilés-Berzunza E, Godoy-Hernández G, Lawton MA, Aguilar JJZ (2010) *Agrobacterium tumefaciens*-transient genetic transformation of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) leaf explants. Electronic Journal of Biotechnology 13.
- Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, Maoka T, Hirakawa H, Suzuki Y, Shirasawa K, Bernillon S, Okabe Y, Moinq A, Asamizu E, Rothan C, Ohmiya A, Ezura H (2014) Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). The Plant Journal: for cell and molecular biology 79: 453-465.



- Aryan A, Poonam R (2016) Augmentation of ornamental plants using micropropagation. *International Journal of Research in Biosciences* 5: 25-31.
- Azadi P, Bagheri H, Nalouisi AM, Nazari F, Chandler SF (2016) Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances* 34: 1073-1090.
- Babber S, Sharma K (1991) Study of anatomy of vitrified structure in *Viola tricolor* L. *Annals of Biology Hissar* 7: 93-96.
- Bai C, Capell T, Berman J, Madina v, Sandmann G, Christou P, Zhu C (2016) Bottleneck in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor product balance. *Plant Biotechnology Journal* 14: 195-205.
- Baker CJ, Mock NM, Whitaker BD, Roberts DP, Rice CP, Deahl KL, Aver'yanov AA (2005) Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328: 130-136.
- Baldermann S, Kato M, Kurosawa M, Kurobayashi Y, Fujita A, Fleischmann P, Watanabe N (2010) Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrance* Lour. *Journal of Experimental Botany* 61: 2967-2977.
- Ballard HE, Sytsma KJ, Kowal RR (1999) Shrinking the violets: phylogenetic relationships of infrageneric groups in *Viola* (Violaceae) based on internal transcribed spacer DNA sequences. *Systematic Botany* 23: 439-458.
- Ballard HE, Paula-Souza J, Wahlert GA (2014) Violaceae. In: Kubitzki K (ed), *The families and genera of vascular plants*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 303-322.
- Banta LM, Montenegro M (2008) *Agrobacterium* and plant biotechnology. In: Tzfira T, Citovsky V (eds), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer Science and Business Media, Berlin, 73-147.
- Bashandy H, Teeri T (2017) Genetically engineered orange petunias on the market. *Planta* 246: 277-280.
- Baskar V, Gangadhar BH, Park SW, Nile SH (2016) A simple and efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. *3 Biotech* 6: 88.
- Becker W (1925) *Viola* L. In: Engler A (ed) *Die natürlichen Pflanzenfamilien. Parietales und Opuntiales*. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 363-376.
- Belarmino MM, Mii M (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Reports* 19: 435-442.
- Bernal MP, Remedios DA, Pérez OV (2013) Effective  $\beta$ -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in indica rice calli. *Revista Colombiana de Biología* XV: 89-96.
- Bhaskaran S, Smith RH (1990) Genotypic differences in morphogenesis may be due to differences in endogenous hormone levels. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science* 30: 1328-1337.
- Bian W, Barsan C, Egea I, Purgatto E, Chervin C, Zouine M, Latché A, Bouzayen M, Pech JC (2011) Metabolic and molecular events occurring during chromoplast biogenesis. *Journal of Botany* 2011, article ID 289859.
- Blidar CF, Ilea C (2014) Rapid initiation of *in vitro* cultures at *Viola wittrockiana* Matrix F1 'Red Blotch'. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie* 21: 74-78.
- Blidar CF, Ilea C, Tripton IM (2016) The use of filter paper bridges for initiating *in vitro* culture of *Viola wittrockiana* F1 Matrix 'Blue Blotch'. *Romanian Biotechnological Letters* 22: 12088-12096.
- Boase MR, Lewis DH, Davies KM, Marshall GB, Patel Deepa, Schwinn KE, Derolles SC (2010) Isolation and antisense suppression of *flavonoid 3',5'-hydroxylase* modifies flower pigments and colour in cyclamen. *BMC Plant Biology* 10: 107.

- Boase MR, Marshall GB, Peters TA, Bendall MJ (2002) Long-term expression of the *gusA* reporter gene in transgenic cyclamen produced from etiolated hypocotyl explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 27-39.
- Boszoradova E, Libantova J, Matusikova I, Poloniova Z, Jopick M, Berenyi M, Moravickova J (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 317-323.
- Bouman H, Tiekstra A, Petutschnig E, Homan M, Schreurs R (2003) Cryopreservation of *Lilium* species and cultivars. *Acta Horticulturae* 612: 147-154.
- Bouvier F, Huguency 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 Journal* 6: 45-54.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (2004) *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Brockington SF, Yang Y, Gandia-Herrero F, Covshoff S, Hibberd JM, Sage RF, Wong GKS, Moore MJ, Smith SA (2015) Lineage-specific gene radiations underline the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist* 207: 1170-1180.
- Brophy JAN, LaRue T, Dinneny JR (2018) Understanding and engineering plant form. *Seminars and Developmental Biology* 79: 68-77.
- Brugliera F, Kalc-Wright G, Hyland C, Webb L, Herbert S, Sheehan B, Mason JG (2000) Improvement of *Fusarium* wilt tolerance in carnations expressing chitinase. *International Plant Molecular Biology Reports* 18: 522-529.
- Brugliera F, Tao GQ, Tems U, Kalc G, Mouradova E, Price K, Stevenson K, Nakamura N, Stacey I, Katsumoto Y, Tanaka Y (2013) Violet/blue chrysanthemums metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant Cell Physiology* 54: 1696-1710.
- Burri BJ (2011) Evaluating sweet potato as an intervention food to prevent vitamin A deficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10: 118-130.
- Caboni E, Biasi R, Delia G, Tonelli M (2009) Effect of CPPU on *in vitro* axillary shoot proliferation and adventitious shoot regeneration in kiwifruit. *Plant Biosystems* 143: 456-461.
- Campbell R, Ducreux LJ, Morris WL, Morris JA, Suttle JC, Ramsay G, Bryan GJ, Hedley PE, Taylor MA (2010) The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato. *Plant Physiology* 154: 656-664.
- Cao H, Wang J, Dong X, Han Y, Ma Q, Ding Y, Zhao F, Zhang J, Chen H, Xu Q, Xu J, Deng X (2015) Carotenoid accumulation affects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *BCM Plant Biology* 15: 27.
- Cardoso JC, Teixeira da Silva J (2013) *Gerbera* micropropagation. *Biotechnology Advances* 31: 1344-1357.
- Cardoso JC, Habermann G (2014) Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andreanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 55: 56-62.
- Cassells AC, Minas G (1983) Plant and *in vitro* factors influencing the micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tip culture. *Scientia Horticulturae* 21: 53-65.
- Castillo B, Smith MAL (1997) Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Reports* 16: 385-388.
- Catterou M, Dubois F, Smets R, Vaniet S, Kichey T, Van Onckelen H, Sangwan-Norreel BS, Sangwan RS (2002) *hcc*: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high *in vitro* organogenic capacity. *The Plant Journal* 30: 273-287.
- Cazzonelli CI (2011) Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology* 38: 833-847.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15: 266-274.

- Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AM, Kärenlampi S, Kok EJ, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborn HP, Pedersen J, Smith M (2004) Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1089-1125.
- Cerabolini B, De Andreis R, Ceriani RM, Pierce S, Raimondi B (2004) Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*. *Biological Conservation* 117: 351-356.
- Chai C, Frang J, Liu Y, Tong H, Gong Y, Wang Y, Liu M, Wang Y, Qian Q, Cheng Z, Chu C (2011) ZEBRA2, encoding a carotenoid isomerase is involved in photoprotection in rice. *Plant Molecular Biology* 75: 211-221.
- Chakravarty B G, Wang-Pruski G (2010) Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation. *Advances of Bioscience and Biotechnology* 1: 409-416.
- Chalageri G, Babu UV (2012) *In vitro* plant regeneration via petiole callus of *Viola patrinii* and genetic fidelity assessment using RAPD markers. *Turkish Journal of Botany* 36: 358-368.
- Chandana BC, Kumari Nagaveni HC, Heena MS, Shashikala S, Kolakar, Lakshmana D (2018) Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* SP3: 246-251.
- Chandler SF, Lu CY (2005) Biotechnology in ornamental horticulture. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 41: 591-601.
- Chandler SF (2007) Practical lessons in the commercialisation of genetically modified plants-long vase life carnation. *Acta Horticulturae* 764: 71-82.
- Chandler SF, Brugliera F (2011) Genetic modification in floriculture. *Biotechnology Letters* 33: 207-214.
- Chandler SF, Sanchez C (2012) Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnology Journal* 10: 891-903.
- Chang C, Chen YC, Hsu YH, Wu JT, Hu CC, Chang WC, Lin NS (2005) Transgenic resistance to *Cymbidium* mosaic virus in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene. *Transgenic Research* 14: 41-46.
- Chayut N, Yuan H, Ohali S, Meir A, Saar U, Tzuri G, Zheng Y, Mazourek M, Gepstein S, Zhou X, Portnoy V, Lewinsohn E, Schaffler AA, Katzir N, Fei Z, Welch R, Li L, Burger J, Tadmor Y (2017) Distinct mechanisms of the ORANGE protein in controlling carotenoid flux. *Plant Physiology* 173: 376-389.
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiology* 141: 620-637.
- Chen JR, Lü JJ, Liu R, Xiong XY, Wang TX, Chen SY, Guo LB, Wang HF (2010) *DREB1C* from *Medicago trunculata* enhances freezing tolerance in transgenic *M. trunculata* and China rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Plant Growth Regulation* 60: 199-211.
- Chen THH, Marowitch J, Thompson BG (1987) Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 73-81.
- Chen WH, Hsu CY, Cheng HY, Chang H, Chen HH, Ger MJ (2011) Down regulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 30: 1007-1017.
- Chen Y, Lu L, Deng W, Yang X, McAvory R, Zhao D, Pei Y, Luo K, Duan H, Smith W, Thammina C, Zheng X, Ellis D, Li Y (2006) *In vitro* regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Euonymus alatus*. *Plant Cell Reports* 25: 1043-1051.
- Chiou CY, Pan HA, Chuang YN, Yeh KW (2010) Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. *Planta* 232: 937-948.

- Christou P (1990) Morphological description of transgenic soybean chimeras created by the delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. *Annals of Botany* 66: 379-386.
- Christou P (2013) Plant genetic engineering and agricultural biotechnology 1983-2013. *Trends in Biotechnology* 31: 125-127.
- Chu Y, Pan J, Wu A, Cai R, Chen H (2016) Molecular cloning and functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase gene from *Calibrachoa hybrida*. *Scientia Horticulturae* 165: 398-403.
- Clarke JL, Spetz C, Haugslie S, Xing S, Dees MW, Moe R, Blystad DR (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia* mosaic virus. *Plant Cell Reports* 27: 1027–1038.
- Clausen J (1929) Chromosome number and relationship of some North American species of *Viola*. *Annals of Botany* 43: 741-764.
- Coll Y, Pujol M, Castillo D, González A, Alfonso J, Armas R (1998) Improvement of indica rice (*Oryza sativa* L.) *in vitro* regeneration efficiency from callus mediated by stress. *Cereal Research Communications* 1: 153-160.
- Cortina C, Cullianez-Macia FA (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 269–275.
- Coste A, Vlase L, Halmagyi A, Deliu C, Coldea G (2011) Effects of plant growth regulators and elicitors on production of second-ary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 279–288.
- Cui ML, Ezura H, Nishimura S, Kamada H, Handa T (2004) A rapid *Agrobacterium*-mediated transformation of *Antirrhinum majus* L. by using direct shoot regeneration from hypocotyl explants. *Plant Science* 166: 873-879.
- Cunningham FX, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
- Cunningham FX, Gantt E (2001) One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 2905-2910.
- Cunningham FX, Gantt E (2005) A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant Journal* 41: 478-492.
- Da Costa Mello S, Angelotti-Mendonça J, Riboldi LB, Dall’Orto LTC, Suguino E (2016) Impact of indole-3-butyric acid on adventitious root development from cuttings of tea. *HortTechnology* 26: 599–603.
- Da Silva Cordeiro L, Simões-Gurgel C, Albarello N, Engelmann F (2015) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. *In vitro Cellular and Plant Biology-Plant* 51: 688-695.
- Dai RC, Lin RH, He WJ, Ma ZW, Chen YQ (2009) Studies on resveratrol synthase gene transformation for *Viola diffusa* Ging. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology* 04.
- Davies KM, Schwinn KE, Deroles SC, Manson DG, Lewis DH, Bloor SJ, Bradley JM (2003) Enhancing antocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica* 131: 259-268.
- De Bolle MFC, Butaye KMJ, Coucke WJW, Goderis IJWM, Wouters PFJ, van Boxel N, Broekaert WF, Cammue BPA (2003) Analysis of the influence of promoter elements and matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 165: 169–179.
- De Buck S, Van Montagu M, Depicker A (2001) Transgene silencing of invertedly repeated transgenes is released upon deletion of one of the transgenes involved. *Plant Molecular Biology* 46: 433-445.

- De Buck S, De Paepe A, Depicker A (2013) Transgene expression in plants, control of. In: Christou P, Savin R, Cosata-Pierce BA, Misztal I, Whitelaw CBA (eds), Sustainable Food Production. Springer, New York, NY.
- De Cáceres González FFN, Davey MR, Sanchez EC, Wilson ZA (2015) Conferred resistance to *Botrytis cinerea* in *Lilium* by overexpression of the *RCH10* chitinase gene. *Plant Cell Reports* 34: 1201–1209.
- De Hsie BS, Sales Bueno AI, Bertolucci SKV, De Carvalho AA, Martins ER, Pinto JEBP (2019) Growth regulators induced shoot regeneration and volatile compound production in *Lippia rotundifolia* Cham., a threatened medicinal plant. *Industrial crops and Products* 137: 401–409.
- De Schepper S, Leus L, Mertens M, Debergh P, Van Bockstaele E, De Loose M (2001) Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea. *Plant Cell Reports* 20: 583–590.
- Debnath S (2003) Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idea* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 39: 490–495.
- Dewir YH, Nurmansyah, Naidoo Y, Teixeira da Silva JA (2018) Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue culture. *Plant Cell Reports* 37: 1451–1470.
- Dinani ET, Shukla MR, Turi CE, Sullivan JA, Saxena PK (2018) Thidiazuron: Modulator of morphogenesis *in vitro*. In: Ahmad N, Faisel M (eds) Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulators, 1–36.
- Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B (2013) Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* 52: 539–561.
- Dong N, Montanez B, Creelman RA, Cornish K (2006) Low light and low ammonium are key factors for Guayule leaf tissue shoot organogenesis and transformation. *Plant Cell Reports* 25: 26–34.
- Dou H, Hiu G, Gu M, Masabni JG (2017) Effect of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. *Horticulturae* 3: 36.
- Duan H, Ding X (2007) Effects of hygromycin on growth and development of *Arabidopsis* seedlings roots. *Pakistan Journal of Botany* 39: 2167–2173.
- Duclercq J, Sangwan-Norreel B, Catterou M, Sangwan RS (2011) *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science* 16: 597–606.
- Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8: 1137–1148.
- Dudareva N, Pichersky E (2008) Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 181–189.
- Dulloo ME, Ebert AW, Dussert S, Gotor E, Astorga C, Vasquez N, Rakotomalala JJ, Rabemiafara A, Eira M, Bellachew B, Omondi C, Engelmann F, Anthony F, Watts J, Qamar Z, Snook L (2009) Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. *Crop Science* 49: 2123–2138.
- Dutt M, Dhekney SA, Soriano L, Kandel R, Grosser JW (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research* 1: 14047.
- Eady CC, Lister CE (1998) A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. *Plant Cell Reports* 18: 117–121.
- Egea I, Bian W, Barsan C, Jauneau A, Pech JC, Latché A, Li Z, Chervin C (2011) Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. *Annals of Botany* 108: 291–297.
- Einset JW, Kopperud C (1995) Antisense ethylene genes for begonia flowers. *Acta Horticulturae* 405: 190–196.
- El Aou-ouad H, Medrano H, Lamarti A, Gulías J (2014) Seed germination at different temperatures and seedling emergence at different depths of *Rhamnus spp.* *Central European Journal of Biology* 9: 569–578.

- Elliott EF (1970) Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora*. *Planta* 95: 183-186.
- Elmayan T, Vaucheret H (1996) A strongly-expressed 35S-driven transgene undergoes post-transcriptional silencing in all tobacco transformants irrespective of the copy number. *The Plant Journal* 9: 787-797.
- Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 47: 5-16.
- Fabre J, Dereuddre J (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters* 11: 413-426.
- Fan Q, Song A, Jiang J, Zhang T, Sun H, Wang Y, Chen S, Chen F (2016) *CmWRKY1* enhances the dehydration tolerance of *Chrysanthemum* through the regulation of ABA-associated genes. *PLoS One* 11: e0150572.
- Fehér A (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, and somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology. *Frontiers in Plant Science* 10: 536.
- Fernandez LA, Winkler M, Grosschedl R (2001) Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Molecular and Cellular Biology* 21: 196-208.
- Feyzabadi Z, Jafari F, Kamali SH, Ashayeri H, Aval SB, Esfahani MM, Sadeghpour O (2014) Efficacy of *Viola odorata* in treatment of chronic insomnia. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 16: e17511.
- Fiedor J, Burda K (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6: 466-488.
- Firoozabady E, DeBoer DL, Merlo DJ, Halk EL, Amerson LN, Rashka KE, Murray EE (1987) Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 10: 105-116.
- Fischhoff DA, Bowditch KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG, Fraley RT (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. *Nature Biotechnology* 5: 807-813.
- Fišer Pečnikar Ž, Balant M, Glasnović P, Surina B (2018) Seed dormancy and germination of the rare, high elevation Balkan endemic *Cerastium dinaricum* (Caryophyllaceae). *Biologia* 73: 937-943.
- Folgado R, Hausman JF, Renaut J, Sergeant K, Swennen R, Panis B (2011) Evaluation of dehydration stress response in potato and its use in cryopreservation. In: Grapin A, Keller ERJ, Lynch PT, Panis B, Revilla Bahillo MA, Engelmann F (eds), *Cryopreservation of Crop Species in Europe*. COST Action 871, Brussels, Belgium, 36-39.
- Folgado R, Panis B, Sergeant K, Renaut J, Swennen R, Hausman JF (2015) Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. *Cryobiology* 71: 432-441.
- Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 2367-2372.
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Frusciante S, Diretto G, Bruno m, Ferrante P, Pietrella M, Prado-Cabrero A, Rubio-Moraga A, Beyer P, Gomez-Gomez L, Al-Babili S, Giuliano G (2014) Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 111: 12246-12251.
- Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamagishi T, Saito N, Iida S (2000) Colouring-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407: 581.
- Fukusaki E, Kawasaki K, Kajiyama S, An C-I, Suzuki K, Tanaka Y, Kobayashi A (2004) Flower color modulations of *Torenia hybrida* by down regulation of chalcone synthase gene with RNA interference. *Journal of Biotechnology* 111: 229-240.

- Gahan PB, George EF (2008) Adventitious regeneration. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds), Plant propagation by tissue culture (3rd Edition), Springer, Dordrecht, Netherlands, 355-401.
- Galpaz N, Burger Y, Lavee T, Tzuri G, Sherman A, Melamed T, Eshed R, Meir A, Portnoy V, Bar E, Shimoni-Shor E, Feder A, Saar Y, Saar U, Baumkoler F, Lewinson E, Schaffer AA, Katzir N, Tadmor Y (2013) Genetic and chemical characterization of an EMS induced in *Cucumis melo* CRTISO gene. Archives of Biochemistry and Biophysics 539: 117-125.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.
- Gašić K, Hernandez A, Korban SS (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. Plant Molecular Biology Reporter 22: 437-437.
- Gaur RK, Verma RK, Khurana SMP (2018) Genetic engineering of horticultural crops: present and future. In: Genetic Engineering of Horticultural Crops, Elsevier, 23-46.
- Gelvin SB (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiological and Molecular Biology Reviews 67: 16-37.
- Geng X, Huang B, Luo F, Wu Z, Qui J (2011) A study on cryopreservation of Gladiolus pollens. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition) 35: 7-12.
- George F (1993) Plant propagation by tissue culture. Part I: the technology. Exegetics, UK, 1-574.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Peuch-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature 455: 189-194.
- Graham J, Gordon SC, Smith K, McNicol RJ, McNicol JW (2002) The effect of the cowpea trypsin inhibitor in strawberry on damage by vine weevil under field conditions. The Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology 77: 33-40.
- Grilli Caiola M, Canini A (2007) Ultrastructure of chromoplasts and other plastids in *Crocus sativus* L. (Iridaceae). Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology 138: 43-52.
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. Annual Review of Plant Biology 57: 761-780.
- Grzebelus E, Skop L (2014) Effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 50: 568-575.
- Guan ZY, Chen SM, Wang YY, Chen FD (2010) Screening of salt-tolerance concentration and comparison of salt-tolerance for chrysanthemum and its related taxa. Chinese Journal of Ecology 29: 467-472.
- Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei HY (2011) Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology 10: 8984-9000.
- Gupta R, Chakrabarty SK (2013) Gibberellic acid in plant. Still a mystery unresolved. Plant signaling and behavior 8: e25504.
- Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA (2010) Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum spp.* Plant Science 179: 49-59.
- Ha SH, Kim JB, Park JS, Lee SW, Cho KJ (2007) A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. Journal of Experimental Botany 58: 3135-3144.
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber Math –Naturwiss Kl Kais Akad Wiss 111: 454-461.
- Hai NTL, Masuda J, Miyajima I, Thien NQ, Mojtahedi N, Hiramatsu M, Kim JH, Okubo H (2012) Involvement of carotenoid cleavage dioxygenase 4 gene in tepal color change in *Lilium brownii* var. *colchesteri*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 81: 366-373.



- Halmagyi A, Fischer-Kluver G, Mix-Wagner G, Schumacher HM (2004) Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat) using different approaches. *Plant Cell Reports* 22: 371-375.
- Han SH, Lee JS, Kwon OC (1990) Callus induction from petiole segment of wild viola (*Viola patrinii* DC.). *Research Reports of Korea Agricultural Technology Research Institute-Dong-A Univ.* (Korea Republic).
- Han Y, Wang X, Chen W, Dong M, Yuan W, Liu X, Shang F (2014) Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans*. *Tree Genetics and Genomes* 10: 329-338.
- Han Y, Wu M, Cao L, Yuan W, Dong M, Wang X, Chen W, Shang F (2016) Characterization of OfWRKY3, a transcriptional factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene *OfCCD4* in *Osmanthus fragrans*. *Plant Molecular Biology* 91: 485-496.
- Hanny BW, Henson RD, Thompson AC, Gueldner RC, Hedin PA (1972) Identification of carotenoid constituents in *Hybiscus syriacus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 20: 914-916.
- Hao YJ, Cheng YJ, Deng XX (2005) Stable maintenance and expression of a foreign gene in transgenic pear shoots retrieved from *in vitro* conservation. *Journal of Plant Physiology* 162: 237-243.
- Haque M, Islam SS, Subramaniam S (2017) Effects of salt and heat pre-treatment factors on efficient regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *3 Biotech* 7: 63.
- Haralkar KV, Biradar SR (2016) Use of various concentrations of growth hormones for callogenesis of anti cancerous plant *Viola odorata* L. *Proceeding of National Conference on Environment and Development*, ISBN: 978-93-84663-10-0.
- Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *Cryo-Letters* 25: 3-22.
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Kandianis CB, Sowinski SG, Stapleton AE, Vallabhaneni R, Williams m, Wurtzel ET, Yan J, Buckler ES (2008) Natural genetic variations in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 319: 330-333.
- Haymes KM (1996) Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 280-284.
- Hayta S, Smedley MA, Li J, Harwood WA, Gilmartin PM (2018) *Agrobacterium*-mediated transformation systems of *Primula vulgaris*. *Plant Methods* 14: 93.
- He H, Ke H, Keting H, Qiaoyan X, Silan D (2013) Flower colour modification of *Chrysanthemum* by suppression of *F3'H* and overexpression of the exogenous *Senecio cruentus F3'5'H* gene. *PLoS ONE* 8: e74305.
- Henry Y, Vain P, Buyser JD (1994) Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica* 79: 45-58.
- Hieber AD, Mudalige-Jayawickrama RG, Kuehnle AR (2006) Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta* 223: 521-531.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 35: 205-218.
- Hill K, Schaller GE (2002) Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant Signaling and Behavior* 8: e25709.
- Hirai D, Shirai K, Shirai S, Sakai A (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101: 109-115.
- Hirose Y, Aida R, Shibata M (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Delphinium spp.* *Plant Biotechnology* 19: 377-382.
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210-218.

- Holton TA, Brugliera F, Lester D, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JGT, Lu C-Y, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366: 276-279.
- Holton TA, Tanaka Y (1994) Transgenic flowering plants. Patent Publication Number WO/94/28140
- Holton TA (1996) Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same. Patent Publication number WO/96/36716
- Hong B, Tong Z, Ma N, Li J, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Gao J (2006) Heterologous expression of the *AtDREB1A* gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. *Science in China Series C: Life Sciences* 49: 436-445.
- Hoque A, Rahman SM, Arima S, Takagi Y (2001) Efficient *in vitro* germination and shoot proliferation of chilling-treated water chestnut (*Trapa japonica* Flerov) embryonal explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 369-374.
- Horn W (1956) Untersuchungen über die cytologischen und genetischen Verhältnisse beim Gartenstiefmütterschen (= *V. wittrockiana* Gams.); einer polyploiden Bastardart. *Züchter* 26: 241-262.
- Horner HT, Healy RA, Ren G, Fritz D, Klyne A, Seames C, Thornburg RW (2007) Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. *American Journal of Botany* 94: 12-24.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Hoshi Y, Kondo M, Kobayashi H (2003) Transformation of *Begonia semperflorens* by using *Agrobacterium*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 72: 373.
- Hoshino Y, Sato H, Murata N & Shinoda K (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Alstromeria*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 70: 291.
- Huang LC, Lai UL, Yang SF, Chu MJ, Kuo CI, Tsai MF, Sun CW (2007) Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with broccoli ACC synthase and ACC oxidase genes. *Postharvest Biology and Technology* 46: 47-53.
- Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
- Huh YS, Lee JK, Nam SY, Hong EY, Paek KY, Son SW (2016) Effect of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. *Journal of Plant Biotechnology* 43: 132-137.
- Ibdah M, Azulay Y, Portnoy V, Wasseerman B, Bar E, Meir A, Burger Y, Hirschberg J, Schaffer AA, Katzir N, Tadmor Y, Lewinsohn E (2006) Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* 67: 1579-1589.
- Ibrahim SH, Normah MN (2013) The survival of *in vitro* shoot tips of *Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by vitrification. *Plant Growth Regulation* 70: 237-246.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Isaacson T, Ohad I, Beyer P, Hirschberg J (2004) Analyses *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology* 136: 4246-4255.
- Ismagul A, Yang N, Maltseva E, Iskakova G, Mazonka I, Skiba Y, Bi H, Eliby S, Jatayev S, Shavrukov Y, Borisjuk N, Langridge P (2018) A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. *BMC Plant Biology* 18: 135.
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* 21: 508-514.

- Iwazaki Y, Kosugi Y, Waki K, Yoshioka T, Satoh S (2004) Generation and ethylene production of transgenic carnations harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientation. *Journal of Applied Horticulture* 6: 67-71.
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1817: 182-193.
- Jarvis BC, Yasmin S (1987) Plant growth regulators and adventitious root development in relation to auxins. *Biologia Plantarum* 29: 189-198.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6: 3901-3907.
- Jeknić S (2015) Alteration of flower color in *Solanum lycopersicum* through ectopic expression of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from *Lilium lancifolium*. A project submitted to Oregon State University.
- Jeknić Z, Lee SP, Davies J, Ernst RC, Chen THH (1999) Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 575-580.
- Jeknić Z, Morrè JT, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen THH (2012) Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from Tiger Lily (*Lilium lancifolium* Thunb. 'Splendens'). *Plant Cell Physiology* 53: 1899-1912.
- Jeknić Z, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen TH (2014) Alteration of flower color in *Iris germanica* L. 'Fire Bride' through ectopic expression of phytoene synthase gene (*crtB*) from *Pantoea agglomerans*. *Plant Cell Reports* 33: 1307-1321.
- Jensen WA (1962) Botanical histochemistry: principles and practice. Freeman WH, San Francisco, USA.
- Jevremović S, Subotić A, Benelli C, De Carlo A, Lambardi M (2011) Cryopreservation of *Iris pumila* shoot tips by vitrification. *Acta Horticulturae* 908: 355-359.
- Jia D, Fan L, Shen J, Qin S, Li F, Yuan Y (2019) Genetic transformation of the biosynthetic genes *bkt* and *crtR-B* into apple tree to increase photooxidation resistance. *Scientia Horticulturae* 243: 428-433.
- Jo YD, Kim YS, Ryu J, Choi HI, Kim SW, Kang HS, Ahh JW, Kim JB, Kang SY, Kim SH (2016) Deletion of *carotenoid cleavage dioxygenase 4a* (*CmCCD4*) and global up-chrysanthemum cultivar producing yellow petals. *Scientia Horticulturae* 212: 49-59.
- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131: 1-11.
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.
- Kaloo ZA, Akhtar R, Zafrul-Haq, Wafai BA (2013) Effect of growth regulators on the *in vitro* multiplication of *Viola odorata*. *International Journal of Medicinal Plant Research* 2: 187-189.
- Kamiishi Y, Otani M, Takagi H, Han DS, Mori S, Tatsuzawa F, Okuhara H, Kobayashi H, Nakano M (2011) Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Molecular Breeding* 30: 671-680.
- Karioti A, Furlan C, Vincieri FF, Bilia AR (2011) Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 1715-1723.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y (2007) Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hues flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiology* 48: 1589-1699.
- Kaur A, Gill MS, Ruma D, Gosal SS (2008) Enhanced *in vitro* shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime. *Sugar tech* 10: 60-64.

- Kaviani B (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science* 5: 778-780.
- Kaviani B, Zamirae F, Zanjani SB, Tarang A, Torakshvand AM (2014) *In vitro* flowering and micropropagation of *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)* in response to plant growth regulators (NAA and BAP). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 13: 145-155.
- Kende H (1989) Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology* 91: 1-4.
- Khajuria AK, Bisht NS, Krishan R (2017) Effect of 2,4-D and cytokinin on callus induction in different explants of *Viola canescens* Wall. ex, Roxb. *Plant Archives* 17: 833-838.
- Khajuria AK, Bisht NS (2018) Indirect *in vitro* regeneration of *Viola canescens* Wall. ex, Roxb. by using leaf calli. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 28: 215-222.
- Khaliluev MR, Bogoutdinova LR, Baranova GB, Baranova EN, Kharchenko PN, Dolgov SV (2014) Influence of genotype, explant type, and composition of culture medium on *in vitro* callus induction and shoot organogenesis of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Biology Bulletin* 41: 512-521.
- Khan S, Bi TB (2012) Direct shoot regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Dhakki as a means of micropropagation. *Pakistan Journal of Botany* 44: 1965-1971.
- Khan S, Anwar S, Yu S, Sun M, Yang Z, Gao ZQ (2019) Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations. *International Journal of Molecular Science* 20: 3350.
- Khodakovskaya M, Vankova R, Malbeck J, Li A, Li Y, McAvory R (2009) Enhancement of flowering and branching phenotype in chrysanthemum by expression of *ipt* under the control of a 0.821 kb fragment of the *LEACO1* gene promoter. *Plant Cell Reports* 28: 1351-1362.
- Kim JS, An CG, Park JS, Lim YP, Kim S (2016) Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes and cultivation methods. *Food Chemistry* 201: 64-71.
- Kim SW, Oh SC, In DS, Liu JR (2003) Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell derived protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 15-19.
- Kishi-Kaboshi M, Aida R, Sasaki K (2018) Genome engineering in ornamental plants: Current status and future prospects. *Plant Physiology and Biochemistry* 131: 47-52.
- Kishimoto S, Aida R, Shibata M (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Elatior Begonia (Begonia X hiemalis* Fotsch). *Plant Science* 162: 697-703.
- Kishimoto S, Maoka T, Nakayama M, Ohmiya A (2004) Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Phytochemistry* 65: 2781-2787.
- Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, Ohmiya A (2005) Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 65: 2781-2787.
- Kishimoto S, Ohmiya A (2006) Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Physiologia Plantarum* 128: 437-447.
- Kishimoto S, Oda-Yamamizo C, Ohmiya A (2018) Regulation of carotenoid pigmentation in corollas of petunias. *Plant Molecular Biology Reporter* 36: 632-642.
- Kishimoto S, Oda-Yamamizo C, Ohmiya A (2019) Comparison of petunia and calibrachoa in carotenoid pigmentation of corollas. *Breeding Science* 69: 117-126.
- Koetle MJ, Finnie JF, Balázs E, Van Staden J (2015) A review on factors affecting the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in ornamental monocotyledonous geophytes. *South African Journal of Botany* 98: 37-44.
- Korbin M, Podwyszynska M, Komorowska B, Wawrzynczak D (2001) Transformation of gerbera plants with tomato spotted wilt virus (tswv) nucleoprotein gene. *Acta Horticulturae* 572: 149-157.
- Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. *Scientia Horticulturae* 168: 88-107.

- Kumar N, Anand KGV, Pamidimarri DVNS, Sarkar T, Reddy MP, Radhakrishnan T, Kaul T, Reddy MK, Sopori SK (2010) Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Industrial Crops and Products* 32: 41-47.
- Kunisaki JT (1980) *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. *Hort Science* 15: 508-509.
- Lacroix B, Citovsky V (2019) Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annual Review of Phytopathology* 57: 231-251.
- Ladics GS, Bartholomaeus A, Bregitzer P, Doerrner NG, Gray A, Holzhauser T, Jordan M, Keese P, Kok E, Macdonald P, Parrott W, Privalle L, Raybould A, Rhee SY, Rice E, Romeis J, Vaughn J, Wal JM, Glenn K (2015) Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants. *Transgenic Research* 24: 587-603.
- Larkin P, Scowcroft W (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Lavy M, Zuker A, Lewinson E, Larkov O, Ravid U, Vainstein A, Weiss D (2002) Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Molecular Breeding* 9: 103-111.
- Lawlor DW (2013) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany* 64: 83-108.
- Lee HS, Castle WS, Coates GA (2001) High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *Journal of Chromatography* 913: 371-377.
- Lee ST, Huang WL (2014) Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. *Plant Growth Regulation* 73: 193-204.
- Lee YG, Popov E, Cui HY, Kim HH, Park SU, Bae CH, Lee SC, Engelmann F (2011) Improved cryopreservation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification. *Cryo Letters* 32: 487-497.
- Li J, Zhang D, Que Q, Chen X, Ouyang K (2019) Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of the miracle tree *Neolamarckia cadamba*. *Industrial Crops and Products* 130: 443-449.
- Li JT, Deng DM, Peng GT, Deng JC, Zhang J, Liao B (2010) Successful micropropagation of the hyperaccumulator *Viola baoshanensis* (Violaceae). *International Journal of Phytoremediation* 12: 761-771.
- Li JW, Li HH, Wang RR, Gao XX, Wang QC (2016) Cryopreservation for retaining morphology, genetic integrity, and foreign genes in transgenic plants of *Torenia fournieri*. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 8.
- Li L, Yuan H (2013) Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539: 102-109.
- Li L, Yuan H, Zeng Y, Xu Q (2016) Plastids and carotenoid accumulation. In: Stange C (ed) *Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry*, Springer, Cham 79: 273-293.
- Li X, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, Korban SS (2003) Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, *Ace-AMP1*, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta* 218: 226-232.
- Li X, Fan J, Gruber J, Guan R, Frentzen M, Zhu LH (2013) Efficient selection and evaluation of transgenic lines of *Crambe abyssinica*. *Frontiers in Plant Science* 4: 162.
- Liao LJ, Pan IC, Chan YL, Hsu YH, Chen WH, Chan MT (2004) Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of *Cymbidium Mosaic Virus* is a manifestation of RNA-mediated resistance. *Molecular Breeding* 13: 229-242.
- Liau CH, You SJ, Prasad V, Hsiao HH, Lu JC, Yang NS, Chan MT (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Reports* 21: 993-998.

- Lim KB, Kwon SJ, Lee SI, Hwang YJ, Naing AH (2012) Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of chrysanthemum. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 53: 329-335.
- Line K (1763) In: *Species plantarum. Editio secunda* 2: 1325.
- Liu H, Guo X, Naem MS, Liu D, Xu L, Zhang W, Tang G, Zhou W (2011) Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 143–151.
- Lloyd G, McCrown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators Society* 30: 421-427.
- Loidl P (2004) A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Science* 9: 84-90.
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orseli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 325-331.
- Lu C, Chandler SF, Mason JG, Brugliera F (2003) Florigene flowers: from laboratory to market. In: Vasil IK (ed), *Plant biotechnology 2002 and beyond*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 333-336.
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo Dj, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Küpper H, Earle ED, 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. *The Plant Cell* 18: 3594-3605.
- Lücker J, Bouwmeester HJ, Schwab W, Blaas J, van der Plas LH, Verhoeven HA (2001) Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl-beta-D-glucopyranoside. *The Plant Journal* 27: 315–324.
- Mahadev MD, Panathula CS, Naidu CV (2014) Influence of bavistin, cefotaxime, kanamycin and silver thiosulphate on plant regeneration of *Solanum viarum* (Dunal)—an important anticancer medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences* 5: 403-408.
- Maheshwari P, Kovalchuk I (2016) *Agrobacterium*-mediated stable genetic transformation of *Populus angustifolia* and *Populus balsamifera*. *Frontiers in Plant Science* 7: 296.
- Makara AM, Rubaihayo PR, Magambo MJS (2010) Carry-over effect of thidiazuron on banana *in vitro* proliferation at different culture cycles and light incubation conditions. *African Journal of Biotechnology* 9: 3079-3085.
- Maleki SS, Mohammadi K, Ji KS (2018) Study on factors influencing transformation efficiency in *Pinus massoniana* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133: 437-445.
- Mann RL, Bromer WW (1958) The isolation of a second antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of the American Chemical Society* 80: 2714-2716.
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nature Biotechnology* 18: 888-892.
- Marchant R, Power JB, Lucas JA, Davey MR (1998a) Biolistic transformation of rose (*Rosa hybrida* L.). *Annals of Botany* 81: 109-114.
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Power JB (1998b) Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding* 4: 187–194.
- Marcussen T, Karlsson T (2010) Violaceae. In: *Flora Nordica*, 6: 12-52.
- Marcussen T, Jakobsen KS, Danihelka J, Ballard HE, Blaxland K, Brysting AK, Oxelman B (2012) Inferring species networks from gene trees in high-ployploid North American and Hawaiian violets (*Viola*, Violaceae). *Systematic Biology* 61: 107-126.
- Marcussen T, Heier L, Brysting AK, Oxelman B, Jakobsen KS (2015) From gene trees to a dated allopolyploid network: Insights from the angiosperm genus *Viola* (Violaceae). *Systematic Biology* 64: 84-101.

- Marki-Fisher E, Eugster CH (1985) Das carotenoid spektrum der antheren und petalen von *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night'. Helvetica Chimica Acta 68: 1708-1715.
- Marković Z, Chatelet P, Sylvestre I, Karoglan J, Kontić JK, Engelmann F (2013) Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. Central European Journal of Biology 8: 993-1000.
- Matsumoto T, Sakai a, Yamada K (1995) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 237-241.
- Matsumoto T (2017) Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. Reviews in Agricultural Science 5: 13-20.
- Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. Plant Molecular Biology 43: 401-415.
- Mayavan S, Subramanyam K, Arun M, Rajesh M, Kapil Dev G, Sivanandhan G, Jaganath B, Manickavasagam M, Selvaraj N, Ganapathi A (2013) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. Plant Cell Reports 32: 1557-1574.
- Mayer L (1956) Wachstum und organbildung an *in vitro* kultivierten segmenten von *Pelargonium zonale* and *Cyclamen persicum*. Planta 47: 401-446.
- McHughen A (2002) Transgenic linseed flax. In: Khachatourians GC, Hui YH, Scorza R, Nip WK (eds), Transgenic Plants and Crops, Marcel Dekker, New York, Basel.
- Meijer EGM, Iren E, Schrijnemakers E, Hensgens LAM, van Zijderveld M, et al. (1991) Retention of the capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports 10: 171-174.
- Men S, Ming X, Wei C (2003) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 63-71.
- Metz TD, Dixit R, Earle ED (1995) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var *capitata*). Plant Cell Reports 15: 287-292.
- Meyer P, Heidemann 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.
- Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plants cells cultures *in vitro*: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany 62: 3713-3725.
- Mikuła A, Fiuk A, Rybczyński JJ (2005) Induction, maintenance and preservation of embryogenic competence of *Gentiana cruciata* L. cultures. Acta Biologica Craciviensia Botanica 47: 227-236.
- Milbus H, Sriskandarajah S, Serek M (2009) Genetically modified flowering potted plants with reduced ethylene sensitivity. Acta Horticulturae 847: 75-80.
- Milojević J, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Dragičević I, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Increased regeneration capacity in spinach lines obtained by *in vitro* self-fertilisation. Scientia Horticulturae 130: 681-690.
- Milošević S, Simonović A, Cingel A, Nikolić D, Ninković S, Subotić A (2013) Introduction of dsRNA-specific ribonuclease *pac1* into *Impatiens walleriana* provides resistance to *Tomato spotted wilt virus*. Scientia Horticulturae 164: 499-506.
- Miransari M, Smith DL (2014) Plant hormones and seed germination. Environmental and experimental botany 99: 110-121.
- Mishra R, Wang HY, Yadav NR, Wilkins TA (2003) Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype independent regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 21-35.
- Mitchell WC, Cornetto TM, nunez M, Patel M (2000) Analysis of horned violet, *Viola cornuta* seed germination. Bulletin of New Jersey Academy of Science 45: 1-5.
- Mithila J, Hall JC, Victor JMR, Saxena PK (2003) Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Plant Cell Reports 21: 408-414.



- Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, DellaPenna D (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology* 45: 281–293.
- Moges AD, Shilbli RA, Karam NS (2004) Cryopreservation of african violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 389-395.
- Mohamed MF, Read PE, Coyne DP (1992) Dark preconditioning, CPPU and thidiazurin promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *Journal of American Society of Horticultural Science* 117: 668-672.
- Mokhtari A, Otroshy M, Barekat T (2015) Plant regeneration through callus induction on medicinal herb *Viola odorata* – role of plant growth regulators and explants. *Agriculture & Forestry* 61: 161-170.
- Mokhtari A, Zarei M, Samsamzadeh B, Moradi K (2016) Interactive effects of plant growth regulators and explants on direct shoot regeneration of *Viola odorata*. *Bio Technologia* 97: 33–39.
- Molina RV, Nuez F (1995) Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 249-257.
- Morel G (1964) Tissue culture – A new means of clonal propagation in orchids. *American Orchid Society Bulletin* 33: 473-478.
- Mori S, Kobayashi H, Hoshi Y, Kondo M (2004) Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flowers color in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports* 22: 415-421.
- Morita Y, Hoshino A (2018) Recent advances in flower color variation and patterning of Japanese glory and petunia. *Breeding Science* 68: 128-138.
- Mortimer CL, Misawa N, Ducreux L, Campbell R, Bramley PM, Taylor M, Fraser PD (2016) Product stability and sequestration of mechanisms in *Solanum tuberosum* engineered to biosynthesize high value ketocarotenoids. *Plant Biotechnology Journal* 14: 140-152.
- Mortimer CL, Misawa N, Perez-Fons L, Robertson FP, Harada H, Bramley PM, Fraser PD (2017) The formation and sequestration of nonendogenous ketocarotenoids in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology* 173: 1617-1635.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Murashige T, Serpa M, Jones JB (1974) Clonal propagation of *Gerbera* through tissue culture. *Hort Science* 9: 175-180.
- Murch SJ, Victor JMR, Saxena PK (2003) Auxin, calcium and sodium in somatic embryogenesis of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cv. Benjamin. *Acta Horticulturae* 625: 201-209.
- Murthy BNS, Saxena PK (1994) Somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.): stimulation of direct differentiation of somatic embryos by forchlorfenuron (CPPU). *Plant Cell Reports* 14: 145-150.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34: 267-275.
- Muruganatham M, Amutha S, Selvaraj N, Vengadesan G, Ganapathi A (2007) Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vigna mungo* using immature cotyledonary-node explants and phosphinothricin as the selection agent. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43: 550-557.
- Muskens MWM, Vissers APA, Mol JNM, Kooter JM (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* 43: 243–260.
- Nadarjan J, Pritchard HW (2014) Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. *PLoS One* 9: e96169.
- Naderi D, Askari-Khorasgani O, Mahmoudi E (2016) Cefotaxime and benzyladenine improve melon regeneration. *Iranian Journal of Biotechnology* 14: 56-60.

- Naeem M, Naveed I, Naqvi SMS, Mahmood T (2013) Standardization of tissue culture conditions and estimation of free scavenging activity in *Viola odorata* L. Pakistan Journal of Botany 45: 197–202.
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Ishiguro K, Suzuki K, Tanaka Y (2010) Generation of red flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirection of the flavonoid pathway from delphinidin to pelargonidin. Plant Biotechnology 27: 375–383.
- Nakamura N, Katsumoto Y, Brugliera F, Demelis L, Nakajima D, Suzuki H, Tanaka Y (2015) Flower color modification in *Rosa hybrida* by expressing the S-adenosylmethionine: anthocyanin 3',5'-O-methyltransferase gene from *Torenia hybrida*. Plant Biotechnology 32: 109–117.
- Nakano Y (2017) Effect of acetosiringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eustoma grandiflorum* leaf disks. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ 51: 351–355.
- Nakatsuka T, Mishiba K, Kubota A, Abe Y, Yamamura S, Nakamura N, Tanaka Y, Nishihara M (2010) Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. Journal of Plant Physiology 167: 231–237.
- Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, Nishihara M (2011) Production of picotee type flowers in Japanese gentian by CRES-T. Plant Biotechnology 28: 173–180.
- Nakayama M, Miyasaka M, Maoka T, Yagi M, Fukuta N (2006) A carotenoid-derived yellow *Eustoma* screened under blue and ultraviolet lights. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 75: 161–165.
- Nalini R (2012) Micropropagation of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using shoot tip as explant. International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences 2: 62–66.
- Nameth B, Dinka SJ, Chatfield SP, Morris A, English J, Lewis D, Oro R, Raizada MN (2013) The shoot regeneration capacity of excised *Arabidopsis* cotyledons is established during the initial hours after injury and is modulated by a complex genetic network of light signalling. Plant, Cell and Environment 36: 68–86.
- Narayani M, Chadha A, Srivastava S (2017) Callus and cell suspension culture of *Viola odorata* as *in vitro* production platforms of known and novel cyclotides. Plant Cell Tissue and Organ Culture 130: 289–299.
- Narayani M, Sai Varsha MKN, Potunuru UR, Beaula WS, Rayala SK, Dixit M, Chadha A, Srivastava S (2018) Production of bioactive cyclotides in somatic embryos of *Viola odorata*. Phytochemistry 156: 135–141.
- Nauerby B, Billing K, Wyndaele R (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 123: 169–177.
- Netam N (2018) Improving ornamental's vase life through molecular approaches: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7: 1687–1691.
- Neuhaus G, Spangenberg G (1990) Plant transformation by microinjection techniques. Physiologia Plantarum 79: 213–217.
- Nielsen KM, Deroles SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, Manson D (2002) Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus. Molecular Breeding 9: 217–229.
- Nielsen KM, Lewis DH, Morgan ER (2003) Characterization of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook). Euphytica 130: 25–34.
- Niino T, Yamamoto S, Fukui K, Martinez CRC, Arizaga MV, Matsumoto T, Engelmann F (2013) Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. Cryo-Letters 34: 549–560.
- Nisar N, Li L, Shan I, Khin NC, Pogson BJ (2015) Carotenoid metabolism in plants. Molecular Plant 8: 68–82.
- Nishihara M, Nakatsuka T, Mishiba K, Kikuchi A, Yamamura S (2003) Flower color modification by suppression of chalcone synthase gene in gentian. Plant Cell Physiology 44: s159.

- Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S (2005) Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Letters* 579: 6074–6078.
- Nishimura T, Mori Y, Furukawa T, Kadota A, Koshiba T (2006) Red light causes a reduction in IAA levels at the apical tip by inhibiting *de novo* biosynthesis from tryptophan in maize coleoptiles. *Planta* 224: 1427–1435.
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matuzawa T (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91: 67-73.
- Nisler J (2018) TDZ: Mode of Action, Use and Potential in Agriculture. In: Ahmad N, Faisal M (eds), Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator. Springer, Singapore, 37-59.
- Noman A, Aqeel M, Deng J, Khalid N, Sanaullah T, Shuilin H (2017) Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 530.
- Ogawa Y, Mii M (2007) Meropenem and moxalactam: Novel  $\beta$ -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Science* 172: 564-572.
- Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S, Sumimoto K (2006) Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology* 142: 1193-1201.
- Ohmiya A, Sumitomo K, Aida R (2009) "Yellow Jimba": Suppression of carotenoid cleavage dioxygenase (*CmCCD4a*) expression turns white chrysanthemum petals yellow. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 78: 450-455.
- Ohmiya A (2011) Diversity of carotenoid composition in flower petals. *Japan Agriculture Research Quarterly: JARQ* 45: 163-171.
- Ohmiya A (2013) Qualitative and quantitative control of carotenoid accumulation in flower petals. *Scientia Horticulturae* 163: 10-19.
- Ohmiya A, Kato M, Shimada T, Nashima K, Kishimoto S, Nagata M (2019) Molecular basis of carotenoid accumulation in horticultural crops. *The Horticulture Journal* 88: 135-149.
- Ohtsubo (2011) Beyond of blue rose: modification of floral architecture with plant-specific chimeric repressors. *Plant Biotechnology* 28: 113-121.
- Okinaka Y, Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Kiyokawa S, Kikuchi Y (2003) Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67: 161-165.
- Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216: 723–735.
- Olsen A, Lutken H, Hegelund JN, Muller R (2015) Ethylene resistance in flowering ornamental plants – improvements and future perspectives. *Horticultural Research* 2: 15038.
- Orlikowska T, Nowak E (1997) Factors affecting transformation of gerbera. *Acta Horticulturae* 447: 619-621.
- Oung HM, Lin KC, Wu TM, Chandrika NNP, Hong CY (2015) Hygromycin B-induced cell death is partly mediated by reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 89: 577-588.
- Ozarowski M, Thiem B (2013) Progress in micropropagation of *Passiflora spp.* to induce medicinal plants: a mini-review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23: 937-947.
- Panis B, Piette B, Swennen R (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168: 45-55.
- Park HY, Kim DH, Sivanesan I (2017) Micropropagation of *Ajuga* species: a mini review. *Biotechnological Letters* 39: 1291-1298.
- Park YD, Papp I, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJM, Matzke MA (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in

- meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *The Plant Journal* 9: 183-194.
- Park YJ, Park SY, Arasu VA, Al-Dhabi NA, Ahn HG, Kim JK, Park SU (2017) Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules* 22: 313.
- Payne T, Lloyd A (1998) Transformation and regeneration of *Lobelia erinus* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 18: 308-311.
- Petty LM, Harberd NP, Carré IA, Thomas B, Jackson SD (2003) Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Science* 164: 175-182.
- Phua QY, Chin CK, Asri ZRM, Lam DYA, Subramaniam S, Chew BL (2016) The callugenic effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) on leaf explants of sabah snake grass (*Clinacanthus nutans*). *Pakistan Journal of Botany* 48: 561-566.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N (2006) Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.
- Pierik RLM (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers.
- Piqueras A, Alburquerque N, Folta KM (2010) Explants used for the generation of transgenic plants. In: Kole C, Michler CH, Abbott AG, Hall TC (eds), *Transgenic crop plants: principles and development*. Berlin, Springer 31-56.
- Plösch M, Reisinger V, Eichacker LA (2011) Proteomic comparison of etioplast and chloroplast protein complexes. *Journal of Proteomics* 74: 1256-1265.
- Poethig S (1989) Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends in Genetics* 5: 273-277.
- Popova EV, Kim HH, Yi JY, Choi YM, Sung JS, Jeon YA, Kang M (2010) Cryopreservation of chrysanthemum via droplet-vitrification method. *Cryobiology* 64: 1.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in Plant Science* 12: 98-105.
- Prathanturug S, Soonthornchareonnon N, Chuakul N, Phaidee Y, Saralamp P (2003) High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. *Plant Cell Reports* 21: 1054-1059.
- Pueschel AK, Schwenkel HG, Winkelmann T (2003) Inheritance of the ability for regeneration via somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 43-51.
- Qasemzadeh MJ, Sharifi H, Hamedanian M, Gharehbeqlou M, Heydari M, Sardari M, Akhlaghdoust M, Minae MB (2015) The effect of *Viola* flower syrup on the cough of children with asthma: a double blind randomized controlled trial. *Journal of evidence-based complementary and alternative medicine* 20: 287-291.
- Qin YH, Zhang SL, Asghar S, Zhang LX, Qin QP, Chen KS, Xu CJ (2005) Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. *Plant Science* 168: 1425-1431.
- Rafique T, Yamamoto S, Fukui K, Mahmood Z, Niino T (2015) Cryopreservation of sugarcane using V cryo-plate technique. *Cryo-Letters* 36: 51-59.
- Rai GK, Rai NP, Kumar S, Yadav A, Rathaur S, Singh M (2012) Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48: 565-578.
- Rajeevkumar S, Anunanthini P, Sathishkumar R (2015) Epigenetic silencing in transgenic plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 693.
- Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD (2004) Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant Journal* 39: 477-486.
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 38: 116-124.

- Ramessar K, Peremarti A, Gómez-Galera S, Naqvi S, Moralejo M, Munoz P, Capell T, Christou P (2007) Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Research* 16: 261-280.
- Rashid H, Afzal A, Khan MH, Chaudhry Z, Malik SA (2010) Effect of bacterial culture density and acetosyringone concentration on *Agrobacterium* mediated transformation in wheat. *Pakistan Journal of Botany* 42: 4183-4189.
- Reed BM (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryletters* 22: 97-104.
- Reverté S, Retana J, Gómez JM, Bosch J (2016) Pollinators show flower colour preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Annals of Botany* 118: 249-257.
- Robert B, Horton P, Pascal AA, Ruban A (2004) Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins *in vivo*. *Trends in Plant Science* 9: 385-390.
- Rodriguez-Urbe L, Guzman I, Rajapakse W, Richins RD, O'Connell MA (2012) Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany* 63: 517-526.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000) An alternative pathway to  $\beta$ -caroten formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 11102-11107.
- Roussos PA, Dimitriou G, Voloudakis AE (2011) Short communication. N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (4-CPPU) enhances *in vitro* direct shoot organogenesis of *Citrus aurantium* L. epicotyl segments compared to other commonly used cytokinins. *Spanish Journal of Agricultural research* 9: 504-509.
- Rout GR, Mohapatra A, Jain SM (2006) Tissue culture of ornamental pot plants: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.
- Royal Botanic Gardens, Kew (2017) <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:867953-1> (pristupljeno 18.10.2017.)
- Rubio-Moraga A, Ahrazem O, Rambla JL, Granell A, Gómez-Gómez L (2013) Crocins with high levels of sugar conjugation contribute to the yellow colours of early-spring flowering crocus tepals. *PLoS ONE* 8: e71946.
- Ruiz-Sola MÁ, Rodríguez-Concepción M (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colourful pathway. *The Arabidopsis book* 10: e0158.
- Ryynänen L, Sillanpää M, Kontunen-Soppela S, Tiimonen H, Kangasjärvi J, Vapaavouri E, Häggman H (2002) Preservation of transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth) lines by means of cryopreservation. *Molecular Breeding* 10: 143-152.
- Sadali NM, Sowden RG, Ling Q, Jarvis RP (2019) Differentiation of chromoplasts and other plastids in plants. *Plant Cell Reports* 38: 803-818.
- Saeed T, Shahzad A (2016) Basic Principles Behind Genetic Transformation in Plants. In: Shahzad A, Sharma S, Siddiqui S (eds), *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer, Cham.
- Sagawa JM, Stanley LE, laFountain AM, Frank HA, Liu C, Yuan YW (2016) An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers. *New Phytologist* 209: 1049-1057.
- Saint-Lary L, Roy S, Paris JP, Tournayre P, Berdagué JL, Thomas OP, Fernandez X (2014) Volatile compounds of *Viola odorata* absolutes: identification of odorant active markers to distinguish plants originating from France and Egypt. *Chemistry and Biodiversity* 11: 843-860.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9: 30-33.
- Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. *Cryo-Letters* 28: 151-172.

- Sakai A, Hirai D, Niino T (2008) Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, New York, USA, 33-57.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santi C, Svistoonoff S, Constans L, Auguy F, Duhoux E, Bogusz D, Franche C (2003) Choosing a reirter for gene expression studies in transgenic actinorhizal plants of the Casuarinaceae family. *Plant and Soil* 254: 229-237.
- Sato T, Kwon O, Miyake H, Taniguchi T, Maeda E (1995) Regeneration of plantlets from petiole callus of wild viola (*Viola patrini* DC). *Plant Cell Reports* 14: 768–772.
- Schmitt F, Oakeley EJ, Jost JP (1997) Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 1534-1540.
- Schmulling T, Schell J (1993) Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Molecular Biology* 21: 705-708.
- Schum A (2003) Mutation breeding in ornamentals: An efficient breeding method. *Acta Horticulturae* 612: 47-60.
- Schwartz SH, Qin X, Loewen M (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 46940–46945.
- Sekizawa K, Yamamoto S, Rafique T, Fukui K, Niino T (2011) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnology* 28: 401-405.
- Shabeena Y, Khan SJ, Kaloo ZA, Kumari S, Raut S, Singh N (2010) Callus induction in leaf and petiole explants of *Viola odorata*. *Advances in Plant Sciences* 23: 7-9.
- Shahi S, Izadi-Darbandi A, Ramshini H, Younessi-hamzekhanlu (2017) Rapid and high throughput regeneration in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) from embryo explants. *Journal of Plant Molecular Breeding* 5: 11-19.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22: 90-101.
- Sharma AK, Mitra GC (1976) *In vitro* culture of shoot apical meristem of *Petunia hybrida* for mass production of plants. *Indian Journal of Experimental Botany* 14: 348-350.
- Sharma HC, Sharma KK, Seetharna N, Ortiz R (2000) Prospects for using transgenic resistance to insets in crop improvement. *Electronic Journal of Biotechnology* 3: 76-95.
- Sharma S, Bryan G, Winfield M, Millam S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226: 1449-1458.
- Sharma S, Kumar N, Reddy MP (2011) Regeneration in *Jatropha curcas*: factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Industrial Crop and Products* 34: 943-951.
- Sheeja TE, mondal B, Rathore PKS (2004) Efficient plantlet regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Tissue Culture* 14: 45-54.
- Shibata M (2008) Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnology* 25: 3-8.
- Shillito R (1999) Methods of genetic transformation: electroporation and polyethylene glycol tretment. In: Vasil IK (ed), *Molecular Improvements of cereal crop*. Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 9-20.
- Shilpa P, Ravishankar KV, Shivashankara KS, Sadashiva AT, Kumar NS (2017) Molecular mechanisms involved in biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *Journal for Horticultural Science* 11: 91-103.
- Shinoyama H, Mochizuki A (2006) Insect resistant *Chrysanthemum* [*Dendranthema · grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. *Acta Horticulturae* 714: 177– 184.

- Shumskaya M, Wurtzel ET (2013) The carotenoid biosynthesis pathway: thinking in all dimensions. *Plan Science* 208: 58-63.
- Siddique AB, Islam SMS (2015) Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bangladesh Journal of Botany* 44: 643-651.
- Siegień I, Adamczuk A, Wróblewska K (2013) Light affects *in vitro* organogenesis of *Linum usitatissimum* L. and its cyanogenic potential. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 781-789.
- Simkin AJ, Underwood BA, Auldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E, Clark DG, Klee HJ (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology* 136: 3504-3514.
- Simó C, Ibáñez C, Valdés A, Cifuentes A, García-Cañas V (2014) Metabolomics of genetically modified crops. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 18941-18966.
- Singh A (2015) Micropropagation of plants. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K (eds), *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* 329-346.
- Singh SK, Syamal MM (2001) A short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. *Scientia Horticulturae* 91: 169-177.
- Slazak B, Sliwanska E, Saługa M, Ronikier M, Bujak J, Słomka A, Göransson U, Kuta E (2015) Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 179-190.
- Smets R, Le J, Prinsen E, Verbelen JP, Van Onckelen HA (2005) Cytokinin-induced hypocotyl elongation in light-grown *Arabidopsis* plants with inhibited ethylene action or indole-3-acetic acid transport. *Planta* 221: 39-47.
- Smith R (2013) Explant Preparation. In: *Plant Tissue Culture*. Third Edition. Elsevier 45-51.
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave, AP, Clark DG, Klee HJ (2005) The decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The Plant Cell* 17: 746-759.
- Snyman SJ, Meyer GM, Koch AC, Banasiak M, Watt MP (2011) Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47: 234-249.
- Somssich M (2019) A short history of the CaMV 35S promoter. *PeerJ Preprints* 7: e27096v3.
- Song A, Lu J, Jiang J, Chen S, Guan Z, Fang W, Chen F (2012) Isolation and characterisation of *Chrysanthemum crassum* *SOS1*, encoding a putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant Biology* 14: 706-713.
- Soni M, Kaur R (2014) Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20: 95-101.
- Spök A, Karnar S (2008) Plant molecular farming: Opportunities and challenges. JRC Scientific and Technical Reports.
- Sriskandarajah S, Frello S, Jorgensen K, Serek M (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Campanula carpatica*: factors affecting transformation and regeneration of transgenic shoots. *Plant Cell Reports* 23: 59-63.
- Stam M, Mol JNM, Kooter JM (1997) The silencing genes in transgenic plants. *Annals of Botany* 79: 3-12.
- Subramoni S, Nathoo N, Klimov E, Yuan ZC (2014) *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science* 5: 322.
- Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L (2018) Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular Plant* 11: 58-74.
- Sun W, Meng X, Liang L, Jiang W, Huang Y, He J, Hu H, Almqvist J, Gao X, Wang L (2015) Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from *Freesia hybrid* in flavonoid biosynthetic pathway. *PLoS ONE* 10: e0119054.



- Sunagawa H, Agarie S, Umemoto M, Makishi Y, Nose A (2007) Effect of urea-type cytokinins on the adventitious shoots regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Production Science* 10: 47-56.
- Sundar IK, Sakthivel N (2008) Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Journal of Plant Physiology* 165: 1698-1716.
- Susič N, Bohanec B, Murovec J (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of bush monkey-flower (*Mimulus aurantiacus* Curtis) with a new reporter gene ZsGreen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 116: 243-251.
- Suzuki K, Zue H, Tanaka Y, Fukui Y, Fukuchi-Matzutani M, Murakami Y, Katsumoto Y, Tsuda S, Kusumi T (2000) Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. *Molecular Breeding* 6: 239-246.
- Suzuki S, Supaibulwatana K, Mii M, Nakano M (2001) Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox ssp. orientalis* (Leighton) via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli. *Plant Science* 161: 89-97.
- 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 Reports* 26: 951-959.
- Swanberg A, Dai W (2008) Plant regeneration of periwinkle (*Catharanthus roseus*) via organogenesis. *Hort Science* 43: 832-836.
- Tadmor Y, King S, Levi A, Davis A, Meir A, Wasserman B, Hirschberg J, Lewinson E (2005) Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Research International* 38: 837-841.
- Tai D, Tian J, Zhang J, Song T, Yao Y (2014) *Malus* crabapple chalcone synthase gene, *McCHS*, regulates red petal color and flavonoid biosynthesis. *PLoS ONE* 9:e110570.
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*, 4th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takagi H, Tien Thinh NT, Islam OM, Senboku T, Sakai A (1997) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schoot) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports* 16: 594-599.
- Tanaka D, Niino T, Fujikawa S, Uemura M (2018) Freeze-substitution transmission electron microscopy of gentian shoot tips cryopreserved at ultra low temperatures. *Plant Biotechnology* 35: 335-340.
- Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T (1998) Metabolic engineering to modify flower colour. *Plant Cell Physiology* 39: 1119-1126.
- Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 1-24.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Bioynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54: 733-749.
- Tang J, Wang CK, Pan X, Yan H, Zeng G, Xu W, He W, Daly NL, Craik DJ, Tan N (2010) Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. *Peptides* 31: 1434-1440.
- Teixeira da Silva J, Dobránszki J, Winarto B, Zeng S (2015) *Anthurium in vitro*: A review. *Scientia Horticulturae* 186: 266-298.
- The American Violet Society (2007) <http://americanvioletsociety.org/> (pristupljeno 2.1.2019.)
- The flower expert (2017) <https://www.theflowerexpert.com> (pristupljeno 3.1.2019.)
- Thinh NT (1997) Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral Paper, Faculty of Agriculture, Kobe University, Japan.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 50: 571-599.
- Tian SL, Li L, Chai WG, Shah SNM, Gong ZH (2014) Effect of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits. *BMC Plant Biology* 14: 314.

- Tian SL, Li L, Shah SNM, Gong ZH (2015) The relationship between red fruit colour formation and key genes of capsanthin biosynthesis pathway in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum* 59: 507-513.
- Toguri T, Ogawa T, Kakitani M, Tukahara M, Yoshioka M (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) plants with a disease resistance gene (*pac1*). *Plant Biotechnology* 20: 121-127.
- Trabi M, Mylne JS, Sando L, Craik DJ (2009) Circular proteins from *Melicytus* (Violaceae) refine the conserved protein and gene architecture of cyclotides. *Organic and Biomolecular Chemistry* 7: 2378-2388.
- Trajković M, Jeknić Z, Antić D, Subotić A, Jevremović S, Cingel A (2018) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Viola cornuta* L. 'Lutea Splendens' with capsanthin-capsorubin synthase gene. 3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology (22<sup>nd</sup> SPPS Meeting), Belgrade, Serbia, June 9-12, Book of abstracts, p. 152.
- Trajković M, Antić D, Cingel A, Ghalawenji N, Subotić A, Jevremović S (2019) Advancement in protocol for *in vitro* seed germination, plant regeneration and cryopreservation of *Viola cornuta*. *3 Biotech* 9: 17.
- Tsai SF, Yeh SD, Chan CF, Liaw SI (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98: 157-164.
- Tsuda S, Fukui Y, Makamura N, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Ohira K, Ueyama Y, Ohkawa H, Holton TA, Kutsumi T, Tanaka Y (2004) Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology* 21: 377-386.
- Tubić Lj, Anačkov G, Milojević J, Ghalawenji N, Mitić N, Igić R, Zdravković-Korać S (2014) High variability in the tissue culture response of root-tips of *Allium ascalonicum* individuals and optimisation of the regeneration procedure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 101-110.
- Tulac S, Leljak-Levanic D, Krasnik-Rasol M, Jelaska S (2002) Effect of BAP, TDZ and CPPU on multiple shoot formation in pea (*Pisum sativum* L.) in culture *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 44: 161-168.
- Ulukan H (2009) The evolution of cultivated plant species: classical plant breeding versus genetic engineering. *Plant Systematics and Evolution* 280: 133-142.
- Umemoto N, Takano M, Shimada H, Mamiya K, Toguri T (2006) Flower color modification by xanthophyll biosynthetic genes in petunia. *Plant cell Physiology Suppl.*: S110.
- Vaillant I, Paszkowski J (2007) Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 528-533.
- van den Eede G, Aarts HJ, Buhk HJ, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, van der Vossen J, von Wright A, Wackernagel W, Wilcks A (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1127-1156.
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell* 2: 291-299.
- van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens AWM, van der Plas LHW, van der Krol AR (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 949-959.
- Vasil IK (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27: 1423-1440.
- Vauchert H, Fagard M (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics* 17: 29-35.
- Verma N, Shukla S (2015) Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2: 105-113.

- Verma SR (2013) Genetically modified plants: public and scientific perceptions. Hindawi Publishing Corporation, ISRN Biotechnology ID 820671.
- Vershinin A (1999) Biological functions of carotenoids-diversity and evolution. *Biofactors* 10: 99-104.
- Villota-Salazar N, Mendoza-Mendoza A, González-Prieto JM (2016) Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science* 9: 347-370.
- Vishwakarma UR, Garav AM, Sharma PC (2013) Regeneration of multiple shoots from petiole callus of *Viola serpens* Wall. *Pharmacognosy Research* 5: 86-92.
- Visser C, Qureshi JA, Gill R, Saxena PK (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant physiology* 99: 1704-1707.
- Visser RGF, Jacobsen E, Hesselings-Meinders A, Schans MJ, Witholt B, Feenstra WJ (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology* 12: 329-337.
- Volk GM, Walters C (2010) Preservation of genetic resources in the national plant germplasm clonal collections. In: Wiley J and sons (eds), *Plant Breeding Reviews*. Inc., Oxford, 291-344.
- Wakelin AM, Lister CE, Conner AJ (2003) Inheritance and biochemistry of pollen pigmentation in California poppy (*Eschscholzia californica* Cham.) *International Journal of Plant Science* 164: 867-875.
- Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SL, Malcolm SK (1985) Resistance to hygromycin B. *Plant Molecular Biology* 5: 103-108.
- Walter MH, Strack D (2011) Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports* 28: 663-692.
- Wang B, Zhang Z, Yin Z, Feng C, Wang Q (2012) Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. *Biotechnol Advances* 30: 604-612.
- Wang HM, To KY, Lai HM, Jeng ST (2016) Modification of flower colour by suppressing  $\beta$ -ring carotene hydroxylase in *Oncidium*. *Plant Biology* 18: 220-229.
- Wang J, Bao MZ (2007) Plant regeneration of pansy (*Viola wittrockiana*) 'Caidie' via petiole-derived callus. *Scientia Horticulturae* 111: 266-270.
- Wang MB, Waterhouse PM (2001) Application of gene silencing in plants. *Current opinion in plant biology* 5: 146-150.
- Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, Ohmiya A, Ono M (2017) Overexpression of carotenogenic genes in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Plant Biotechnology* 34: 177-185.
- Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, Ohmiya A, Ono M (2018) Alteration of flower colour in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research* 27: 25-38.
- Waters M, Pyke K (2005) Plastid development and differentiation. In: Møller SG (ed), Blackwell Publishing Ltd, Oxford. *Plastids* 13: 30-59.
- Welsch R, Beyer P, Huguency P, Kleining H, von Lintig J (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846-854.
- Weston E, Pyke K (1999) Developmental ultrastructure of cells and plastids in the petals of wallflower (*Erysimum cheiri*). *Annals of Botany* 84: 763-769.
- Wijowska M, Kota E, Przywara L (1999) *In vitro* culture of unfertilized ovules of *Viola odorata* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* 41: 95-101.
- Windels P, De Buck S, Depicker A (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: patterns of T-DNA integration into the host genome. In: Tzfira T, Citovsky V (eds), *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Springer, New York, 441-481.

- Winefield C, Lewis D, Arathoon S, Deroles S (1999) Alteration of *Petunia* plant form through the introduction of the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular Breeding* 5: 543-551.
- Wittrock VB (1895) *Viola-Studier - A contribution to the history of the pansies having special reference to their origin*. *Acta Horti Bergiani* 2: 441-522.
- Wu J, Liu C, Seng S, Khan MA, Sui J, Gong B, Liu C, Wu C, Zhong X, He J, Yi M (2015) Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Gladiolus hybridus* cv. 'Advance red'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 717-728.
- Xi-Ling W, Jin-Xing Z, Mao-De Y, Zhen-Gang L, Xiao-Yun J, Qi-You L (2011) Highly efficient plant regeneration and *in vitro* polyploid induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 47: 434-440.
- Yadav SK, Katikala S, Yellisetty V, Kannepalle A, Narayana JL, Maddi V, Mandapaka M, Shanker AK, Bandi V, Bharadwaja KP (2012) Optimization of *Agrobacterium* mediated genetic transformation of cotyledonary node explants of *Vigna radiata*. *Springer Plus* 1: 59.
- Yalcin MY, Comlekcioglu N, Ipek M, Kocaman E, Izgu T, Tekdal D, Curuk P (2010) The effect of different hormone concentrations and dark pretreatment on adventitious shoot regeneration in snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus*). *Romanian Biotechnological Letters* 15: 5392-5395.
- 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.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yamamoto C, Kishimoto S, Ohmiya A (2010) Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *Journal of Experimental Botany* 61: 709-719.
- Yamamoto S, Rafique T, Priyantha WS, Fukui K, Matsumoto T, Niino T (2011) Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *Cryo-Letters* 32: 256-265.
- Yamamoto S, Rafique T, Fukui K, Sekizawa K, Niino T (2012) V cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *Cryo-Letters* 33: 12-23.
- Yan R, Wang Z, Ren Y, Li H, Li N, Sun H (2019) Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 2920.
- Yi JY, Balaraju K, Baek HJ, Yoon MS, Kim HH, Lee YY (2018) Cryopreservation of *Citrus limon* (L.) Burm. f shoot tips using a droplet-vitrification method. *Korean Journal of Plant Research* 31: 684-694.
- Yoshida K, Kitahara S, Ito D, Kondo T (2006) Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry* 67: 992-998.
- Yoshida T (2002) Adventitious shoot formation from hypocotyl sections of mature soybean seeds. *Breeding Science* 52: 1-8.
- Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L (2015) Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2: 15036.
- Yuan Y, Ma X, Tang D, Shi Y (2014) Comparison of anthocyanin components, expression of anthocyanin biosynthetic structural genes, and *Tf3'HI* sequences between *Tulipa fosteriana* 'Albert heijn' and its reddish sport. *Scientia Horticulturae* 175: 16-26.
- Zabicki P, Sliwinska E, Mitka J, Sutkowska A, Tuleja M, Migdalek G, Zabicka J, Slomka A, Kwiatkowska M, Kuta E (2019) Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species?: comprehensive genetic studies of *in vitro* propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit. (Violaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136: 339-352.

- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: 12-13.
- Zhang B, Liu C, Wang Y, Yao X, Wang F, Wu J, King GJ, Liu K (2015) Disruption of a *carotenoid cleavage dioxygenase 4* gene converts flower color from white to yellow in *Brassica* species. *New Phytologist* 206: 1513-1526.
- Zhang J, Wang LS, Gao JM, Xu YJ, Li LF, Li CH (2011) Rapid separation and identification of anthocyanins from flowers of *Viola yedoensis* and *V. prionantha* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 23: 16-22.
- Zhao D, Tao J (2015) Recent advances on the developmental and regulation of flower color in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 261.
- Zhao H, Lovett B, Fang W (2016) Genetically engineering entomopathogenic fungi. *Advances in Genetics* 94: 137-163.
- Zheng C, Baum BJ (2008) Evaluation of promoters for use in tissue-specific gene delivery. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 434: 205-219.
- Zheng S, Zhao S, Li Z, Wang Q, Yao F, Yang L, Pan J, Liu W (2015) Evaluating the effect of expressing a peanut resveratrol synthase gene in rice. *PLoS One* 10: e0136013.
- Zheng ZL, Yang Z, Jang JC, Metzger JD (2001) Modification of plant architecture in chrysanthemum by ectopic expression of the tobacco phytochrome *BI* gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126: 19-26.
- Zhong J, Seki T, Kinoshita S, Yoshida T (1991) Effect of light irradiation on antocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 653-658.
- Zhou X, Welsch R, Yang Y, Alvarez D, Riediger M, Yuan H, Fish T, Liu J, Thannhauser TW, Li L (2015) *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoens synthase in controlling carotenoid biosynthesis. *Proceedings in National Academy of Science USA* 112: 3558-3563.
- Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G (2002) cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Molecular Biology* 48: 277-285.
- Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G (2003) cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1625: 305-308.
- Zhu C, Bai C, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Naqvu S, Shi L, Capell T, Christou P (2010) The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504: 132-141.
- Zhu H, Qin SS, Zhang Na, Yang DW, Han HR, Wei KH, Li MH (2015) Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Viola*. *Chemistry and biodiversity* 12: 1777-1808.
- Zhu XY, Zhao M, Ma S, Ge YM, Zhang MF, Chen LP (2007) Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports* 26: 1727-1732.
- Zuker A, Ahroni A, Tzfira T, Ben-Meir H, Vainstein A (1999) Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Molecular Breeding* 5: 367-375.
- Zuker A, Tzfira T, Ben-meir H, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Formann G, Martens S, Nata-Sharir I, Weiss D, Vaistein A (2002) Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavonone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding* 93: 33-41.
- Zvi MMB, Negre-Zakharov F, Masci T, Ovadis M, Shklarman E, Ben-Meir H, Tzfira T, Dudareva N, Vainstein A (2008) Interlinking showy traits: co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers. *Plant Biotechnology Journal* 6: 403-415.

Zvi MMB, Shklarman E, Masci T, Kalev H, Debener T, Shafir S, Ovadis M, Vainstein A (2012)  
PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent  
compounds in rose flowers. *New Phytology* 195: 335–345.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Milena Z. Trajković (rođena Lojić) rođena je 07. februara 1984. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu, Zemunsku gimnaziju i Srednju muzičku školu „Kosta Manojlović”, klavirski odsek. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine na studijskoj grupi Biologija, smer Fiziologija biljaka. Fakultet je završila 2011. godine, i iste godine upisala Doktorske studije, na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od januara 2012. Milena Trajković zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za Fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u junu 2015. godine.

U toku svog naučno-istraživačkog rada Milena Trajković je učestvovala u realizaciji nacionalnog projekta TR31019: „Razvoj i primena biotehnoških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka” finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Angeline Subotić.

Milena Trajković je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS), Srpskog biološkog društva (SBD) i Srpskog društva za molekularnu biologiju. Dobitnik je jedne od nagrada za najbolju poster prezentaciju na „2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Biology and 21<sup>st</sup> Symposium of the Serbian Plant Physiology Society”, u junu 2015. godine.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Милена Трајковић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3008/2011 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Регенерација биљака *in vitro* и генетичка трансформација *Viola cornuta*  
(Violaceae) геном за капсантин-капсорубин-синтазу”

---

- 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, 25.02.2020.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милена Трајковић

Број индекса Б3008/2011

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада „Регенерација биљака *in vitro* и генетичка трансформација

*Viola cornuta* (Violaceae) геном за капсантин-капсорубин-синтазу”

Ментор др Слађана Јевремовић

Потписани/а Милена Трајковић

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, 25.02.2020.

---

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Регенерација биљака *in vitro* и генетичка трансформација  
*Viola cornuta* (Violaceae) геном за капсантин-капсорубин-синтазу”

---

која је моје ауторско дело.

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

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

①. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.02.2020.

---

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.