

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Mariana J. Stanišić

**ALELOPATSKI POTENCIJAL
SEKUNDARNIH METABOLITA
TRANSFORMISANIH KORENOVA
JABUKE - EFEKAT FLORETINA I
FLORIZINA U KULTURI *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Mariana J. Stanišić

**ALLELOPATHIC POTENTIAL OF APPLE
HAIRY ROOT SECONDARY
METABOLITES - THE EFFECT OF
PHLORETIN AND PHLORIDZIN IN *in vitro*
CULTURE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Nevena Banjac, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

dr Svetlana Radović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Slavica Ninković, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

dr Dušica Janošević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Tatjana Čosić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Datum odbrane:

Mojim roditeljima Jolandi i Jovanu

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom bih želela da se zahvalim svom mentoru dr Neveni Banjac na velikom poverenju koje mi je ukazala, važnim smernicama i korisnim savetima koji su mi bili od neprocenjivog značaja tokom izrade ove doktorske disertacije, a pre svega na neverovatnoj energiji i entuzijazmu da se svaki problem u nauci može rešiti.

Najiskrenije se zahvaljujem dr Slavici Ninković na pozivu i pruženoj prilici da budem njen saradnik, na podršci, razumevanju i pomoći koja nikad nije izostala, na prenesenom znanju i savetima, a pre svega uvek pozitivnoj energiji i srdačnosti.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Svetlani Radović i prof. dr Dušici Janošević na pomoći i korisnim savetima, predusretljivosti i angažovanju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu prilikom realizacije doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Tatjani Ćosić na svesrdnoj pomoći u realizaciji molekularno-genetičkih analiza, tumačenju rezultata i uobličavanju teze, a posebno na prijateljskoj pomoći u svakom trenutku koja mi je mnogo značila.

Veliku zahvalnost dugujem dr Dijani Krstić Milošević koja je rukovodila hemijskim analizama u okviru ove doktorske disertacije, na smernicama, konstruktivnim savetima i kritičkom čitanju teze. Dr Danijeli Mišić veliko hvala na značajnoj pomoći i angažovanju u realizaciji eksperimenata iz oblasti UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS analize.

Takođe se zahvaljujem dr Mariji Marin sa Katedre za biologiju ćelija i tkiva, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na saradnji i angažovanju u realizaciji ultrastrukturnih analiza koja su sprovedena u okviru centra za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta.

Iskrenu zahvalnost dugujem dr Jeleni Savić koja me je uvela u svet molekularno-genetičkih analiza, na velikoj pomoći oko realizacije, uobličavanja i tumačenja rezultata, kreativnim idejama, konstruktivnim savetima i smernicama koje su mi bile od neprocenjive vrednosti prilikom izrade ove doktorske disertacije i nepresušnom naučno-istraživačkom entuzijazmu koji je uzor svakom istraživaču koji ulazi u svet nauke.

Takodje bih želela da se zahvalim dr Branki Vinterhalter, šefu projekta "Biotehnologija in vitro, lekovite, gajene i ugrožene biljne vrste", koja mi je ukazala

poverenje i pružila priliku da budem deo njenog tima, na kritičkom čitanju teze i korisnim savetima, na dobroj volji i spremnosti da pomogne, razumevanju i čovečnosti.

Puno hvala dr Snežani Zdravković Korać, dr Angelini Subotić, dr Draganu Vinterhalteru i dr Milanu Dragičeviću čiji saveti i pomoć su mi mnogo značili.

Koleginici Sofiji Stupar veliko hvala na svesrdnoj pomoći oko prikupljanja uzoraka klijanaca arabidopsisa, prijateljstvu, pozitivnosti i optimizmu.

Zahvalnost dugujem i dr Slavici Dmitrović koja mi je svojom ljubaznošću ustupila semena arabidopsisa i time znatno ubrzala izradu eksperimenata ove teze.

Svim mojim koleginicama i kolegama sa Instituta za bioloska istraživanja "Siniša Stanković" na kolegijalnosti i pomoći u svakodnevnom eksperimentalnom radu, kao i uvek vedroj i pozitivnoj atmosferi koji je svaki radni dan činila lakšim i bogatijim.

Svojim kumovima i prijateljima koji su svojom prisutnošću, dobrotom i pozitivnošću obogatili moj život i obojili ga najlepšim bojama.

Mojoj dragoj kolegini Mileni Trajković, na toplini, dobroti i iskrenom prijateljstvu koje mi je podarila, nesebičnoj pomoći i savetima koji su mi značili u izradi ove doktorske disertacije i životu uopšte.

Mojoj najmilijoj kumi Vesni Bukvić na svakom trenutku koje smo provele zajedno proteklih 26 godina, jer je svaki od njih jedan mali ali, suštinski deo svega onoga sto čini moj život vrednim.

Mom dragom prijatelju Radoju Avramoviću, treneru zlatne vaterpolo reprezentacije Srbije, na velikom požrtvovanju, želji, upornosti i vremenu koje je uložio da bi mi pomogao onda kada oni od kojih se to očekivalo nisu umeli, na iskrenim savetima i beskrajnom strpljenju i razumevanju.

Mojim divnim roditeljima Jolandi i Jovanu kojim posvećujem ovu doktorsku disertaciju, na beskonačnoj ljubavi, brizi i žrtvi koju su podneli da bi me izveli na dobar put, svemu što su me naučili, ogromnoj pozitivnoj energiji, snazi i optimizmu bez kojih mi ništa od ovoga ne bi bilo moguće.

Mojim najmilijim momcima Darku i Andreju, na bezuslovnoj ljubavi i nemerljivoj radosti koju su uneli u moj život, na beskrajnom požrtvovanju, trpljenju i strpljenju, jer su oni bili, jesu i biće moja nada, snaga i smisao svega sto radim.

*"Ако језике човјечије и анђеоске говорим, а љубави немам, онда сам као звоно
које јечи, или кимвал који звечи.*

*И ако имам дар пророштва и знам све тајне и све знање, и ако имам сву вјеру
да и горе премјештам, а љубави немам, ништа сам."*

(1.Kor. 13)

Alelopatski potencijal sekundarnih metabolita transformisanih korenova jabuke - efekat floretina i florizina u kulturi *in vitro*

Sažetak

Ograničenja u izučavanju potencijala i mehanizama alelopatskog delovanja glavnih sekundarnih metabolita korena jabuke, floretina i florizina, usled kompleksnosti interakcija u rizosferi, mogu biti prevaziđena upotrebom kulture transformisanih korenova *in vitro*. Odabranim načinom inokulacije regenerisanih izdanaka jabuke sa *Agrobacterium rhizogenes* 15834, efikasno su indukovani transformisani korenovi kod sorti Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster. Smenom hranljivih podloga sa i bez auksina, po prvi put je uspostavljena permanentna *in vitro* kultura izolovanih transformisanih korenova jabuke. UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS analizom je utvrđeno da genetička transformacija nije dovela do promena u sadržaju glavnih sekundarnih metabolita korena jabuke. U eksudatu transformisanih korenova, sadržanom u tečnoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni, kvantifikovani su isključivo florizin, floretin, hlorogena i kafeinska kiselina. Tretman ovim eksudatom je prouzrokovao značajnu inhibiciju rastenja i razvića izdanaka i korenova klijanaca *Arabidopsis thaliana*. Sličan inhibitorni efekat ispoljili su čist florizin u koncentraciji od 500 μM , kao i floretin u svim testiranim koncentracijama (125-500 μM), izazivajući krupne promene u morfologiji tretiranih klijanaca, posebno korena. Velike sličnosti su zapažene u obrascu promena ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, kao i biosintezu auksina i giberelina u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke, sa onim detektovanim kod klijanaca tretiranih 500 μM floretinom. To ukazuje na mogućnost da je floretin u eksudatu korena jabuke metabolit koji je odgovoran za alelopatske efekte, a koji bi se mogli zasnivati na promenama nivoa auksina i giberelina, kao i na interakciji ove dve grupe hormona.

Ključne reči: *Agrobacterium rhizogenes*, alelopatija, *Arabidopsis thaliana*, auksini, ekspresija gena, floretin, florizin, giberelini, *in vitro* kultura, *Malus domestica*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

Allelopathic potential of apple hairy root secondary metabolites - the effect of phloretin and phloridzin in *in vitro* culture

Abstract

The investigation of allelopathic potential and mode of action of the main apple root secondary metabolites, phloridzin and phloretin is difficult to perform due to high complexity of rhizosphere interactions. Therefore, the generation of *in vitro* hairy root cultures could be an alternative system for allelopathic studies of apple. The efficient induction of hairy roots in apple cvs. Melrose, Golden Delicious, Čadel and Gloster was obtained using the appropriate mode of inoculation of regenerated shoots by *Agrobacterium rhizogenes* 15834. Permanent *in vitro* culture of apple autonomous hairy roots was established for the first time by cultivation on alternating growth media with and without auxins. UHPLC(+/-)HESI-MS/MS analysis confirmed that genetic transformation did not lead to changes in the content of the main secondary metabolites of apple roots. Dihydrochalcones phloridzin and phloretin, chlorogenic and caffeic acids were detected as only putative allelochemicals exuded into the growth medium in which hairy roots were grown. Apple hairy root exudates significantly affected development and growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings. Pure phloridzin at 500 μM and phloretin in all tested concentrations (125-500 μM) had similar effects as apple hairy root exudates inducing significant alterations in morphology of seedlings, especially roots. High similarities in the expression patterns of genes involved in polar auxin transport and auxin and gibberellin biosynthetic pathways in roots of arabidopsis seedlings treated with either apple hairy root exudates or 500 μM phloretin were observed. This indicates that phloretin in hairy root exudates could be at least partly responsible for the apple root allelopathic properties, that were most likely based on auxin and gibberellin cross-talk and their altered homeostasis in arabidopsis roots.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, allelopathy, *Arabidopsis thaliana*, auxin, gene expression, gibberellin, *in vitro* culture, *Malus domestica*, phloretin, phloridzin.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant physiology

SADRŽAJ

SKRAĆENICE

1. UVOD.....	1
1.1. Jabuka (<i>Malus × domestica</i> Borkh.).....	2
1.2. Fenolna jedinjenja kao najzastupljeniji sekundarni metaboliti jabuke	6
1.2.1. Fenolne kiseline i flavonoidi	7
1.2.2. Dihidrochalkoni - florizin i floretin	9
1.2.2.1. Biosintetički put floretina i florizina	11
1.2.2.2. Varijacije u sadržaju florizina i floretina u tkivima jabuke	13
1.2.2.3. Pretpostavljene fiziološke uloge florizina i floretina u jabuci	13
1.2.2.4. Prisustvo florizina kod drugih biljnih vrsta	16
1.3. Alelopatija.....	16
1.3.1. Alelohemikalije kao bioherbicidi	17
1.3.2. Eksudati korena kao izvor jedinjenja sa alelopatiskim delovanjem.....	19
1.3.3. Uloga fenolnih jedinjenja u alelopatiji	20
1.3.4. Mehanizmi delovanja alelohemikalija	21
1.3.5. Alelopatisko delovanje fenolnih jedinjenja jabuke	28
1.4. Biotehnologija u službi proučavanja alelopatije	30
1.4.1. Transformacija biljaka posredstvom <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30
1.4.1.1. Geni Ri plazmida <i>A. rhizogenes</i>	31
1.4.1.2. <i>In vitro</i> kultura transformisanih korenova i njihova primena.....	33
1.4.1.3. Primena <i>in vitro</i> kulture transformisanih korenova u cilju proučavanja alelopatije i proizvodnje alelohemikalija.....	34
1.4.1.4. Genetička transformacija jabuke pomoću <i>A. rhizogenes</i> vektora	36
1.4.2. Regeneracija jabuke u kulturi <i>in vitro</i> - organogeneza <i>de novo</i>	37

2. CILJ RADA	40
3. MATERIJAL I METODE	42
3.1. Morfogeneza jabuke <i>in vitro</i>	43
3.1.1. Uspostavljanje aseptične kulture izdanaka jabuke	43
3.1.2. Sterilizacija hranljivih podloga i uslovi za gajenje kultura	44
3.1.3. <i>De novo</i> organogeneza	45
3.1.3.1. Uticaj svetlosnog režima kao predtretmana	45
3.1.3.2. Uticaj agensa za učvršćivanje podloge	46
3.1.3.3. Uticaj genotipa (sorte), tipa i orijentacije eksplantata	46
3.1.3.4. Uticaj β -laktamskih antibiotika	47
3.1.4. Umnožavanje izdanaka	47
3.1.5. Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka u uslovima staklene bašte	48
3.1.6. Statistička obrada podataka koji se odnose na morfogenezu <i>in vitro</i>	48
3.2. Genetička transformacija jabuke	50
3.2.1. Konstrukt <i>Agrobacterium rhizogenes</i> korišćen za genetičku transformaciju	50
3.2.3. Uspostavljanje kulture netransformisanih (kontrolnih) korenova jabuke	52
3.2.4. Molekularna karakterizacija potencijalno transformisanih korenova jabuke	52
3.2.4.1. Izolacija ukupne RNK	53
3.2.4.2. Provera kvaliteta i kvantifikacija izolovane RNK	54
3.2.4.3. Prečišćavanje uzoraka RNK od DNK kontaminacije	55
3.2.4.4. Reverzna transkripcija (RT)	55
3.2.4.5. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)	56
3.2.5. Optimizacija uslova za gajenje transformisanih korenova	58
3.2.5.1. Efekat hranljivih podloga različitog mineralnog sastava	58
3.2.5.2. Efekat egzogeno dodatih auksina	60
3.3. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u transformisanim korenovima linije ZD12 i u hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni	61
3.3.1. Priprema uzoraka za fitohemijske analize	61
3.3.2. UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS analiza metanolnih ekstrakta	62

3.4. Efekat eksudata transformisanih korenova linije ZD12, florizina i floretina na klijanje, rastenje i razviće klijanaca <i>A. thaliana</i>	63
3.4.1. Efekat eksudata transformisanih korenova	63
3.4.2. Efekat dihidrohalkona florizina i floretina	64
3.4.3. Statistička analiza efekata eksudata transformisanih korenova jabuke, florizina i floretina na klijanje, rastenje i razvoj klijanaca <i>A. thaliana</i>	65
3.5. Analiza ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina, transkripcioni faktor WOX7 i kontrolu ćelijskog ciklusa kod klijanaca <i>A. thaliana</i> tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom	65
3.5.1. Biljni materijal.....	65
3.5.1.1. Uticaj eksudata transformisanih korenova linije ZD12 na ekspresiju odabranih gena <i>A. thaliana</i>	66
3.5.1.2. Uticaj floretina na ekspresiju odabranih gena <i>A. thaliana</i>	66
3.5.2. Izolacija ukupnih RNK.....	67
3.5.3. Priprema standarda za kvantitativnu PCR metodu (qPCR)	67
3.5.3.1. Ekstrakcija produkata PCR amplifikacije analiziranih gena iz agaroznog gela	69
3.5.3.2. Kvantifikovanje ekstrahovanih produkata PCR amplifikacije	70
3.5.4. Kvantitativna PCR metoda.....	71
3.6. Ultrastruktorna analiza ćelija mezofila listova klijanaca <i>A. thaliana</i> tretiranih floretinom.....	73
3.6.1. Biljni materijal.....	73
3.6.2. Priprema biljnog materijala za elektronsku mikroskopiju	73
4. REZULTATI	75
4.1. Morfogeneza jabuke <i>in vitro</i>	76
4.1.1. Uspostavljanje kulture izdanaka jabuke <i>in vitro</i>	76
4.1.2. Optimizacija uslova za regeneraciju izdanaka jabuke.....	76
4.1.3. Uticaj β -laktamskih antibiotika na regeneraciju izdanaka jabuke.....	82
4.1.4. Umnožavanje izdanaka	88
4.1.5. Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka u uslovima staklene bašte.....	89
4.2. Genetička transformacija jabuke.....	90

4.2.1. Genetička transformacija jabuke sa <i>A. rhizogenes</i> 15834.....	90
4.2.2. Uspostavljanje permanentne kulture potencijalno transformisanih korenova jabuke <i>in vitro</i>	94
4.2.3. Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture netransformisanih (kontrolnih) korenova jabuke	94
4.2.4. Molekularna karakterizacija potencijalno transformisanih korenova jabuke	96
4.2.5. Optimizacija uslova za gajenje transformisanih korenova <i>in vitro</i>	102
4.2.5.1. Efekat hranljivih podloga različitog mineralnog sastava	102
4.2.5.2. Efekat egzogeno dodatih auksina na rast transformisanih korenova jabuke	103
4.3. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u transformisanim korenovima linije ZD12 i u hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni	104
4.4. Efekat eksudata transformisanih korenova linije ZD12 na klijanje, rastenje i razviće klijanaca <i>A. thaliana</i>	109
4.5. Efekat dihidrohalkona florizina i floretina na klijanje, rastenje i razviće klijanaca <i>A. thaliana</i>	111
4.5.1. Efekat florizina	112
4.5.2. Efekat floretina	114
4.6. Analiza ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina, transkripcioni faktor WOX7 i kontrolu ćelijskog ciklusa kod klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom	119
4.6.1. Ekspresija gena uključenih u polarni transport auksina (<i>PIN</i> , <i>AUX1</i> , <i>LAX3</i> i <i>ABCB</i>).....	122
4.6.2. Ekspresija gena uključenih u biosintezu auksina (<i>TAA1</i> , <i>YUC3</i> , <i>YUC4</i> i <i>YUC6</i>)	126
4.6.3. Ekspresija gena uključenih u biosintezu giberelina (<i>GA3ox1</i> i <i>GA20ox2</i>) i gena za transkripcioni faktor WOX7	128
4.6.4. Ekspresija gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa (<i>CDKA;1</i> , <i>CDKB2;1</i> , <i>CYCA3;1</i> i <i>CYCB2;4</i>).....	130
4.7. Ultrastruktura ćelija mezofila	134
5. DISKUSIJA	137

5.1. Morfogeneza jabuke <i>in vitro</i>	138
5.1.1. Optimizacija uslova za regeneraciju jabuke sorti Zlatni Delišes i Melrouz iz odsečaka listova.....	139
5.1.2. Uticaj β -laktamskih antibiotika	143
5.1.3. Umnožavanje regenerisanih izdanaka	147
5.1.4. Ožiljavanje izdanaka	148
5.2. Genetička transformacija	150
5.2.1. Genetička transformacija sa <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 15834.....	150
5.3. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u transformisanim korenovima jabuke i u hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni	156
5.4. Efekat eksudata transformisanih korenova linije ZD12 na klijanje, rastenje i razviće klijanaca <i>A. thaliana</i>	159
5.5. Efekat dihidrohalkona florizina i floretina na klijanje, rastenje i razviće klijanaca <i>A. thaliana</i>	161
5.6. Analiza ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina, transkripcioni faktor WOX7 i kontrolu ćelijskog ciklusa kod klijanaca <i>A. thaliana</i> tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom.....	164
5.7. Ekspresija gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa kod klijanaca <i>A.thaliana</i> tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke i floretinom.....	170
5.8. Uticaj floretina na ultrastrukturu ćelija mezofila listova klijanaca <i>A. thaliana</i>	174
6. ZAKLJUČCI	179
7. LITERATURA.....	182
BIOGRAFIJA AUTORA	243
Izjava o autorstvu	244
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	245
Izjava o korišćenju	246

SKRAĆENICE

Ab	abaksijalna površina
ABA	abscisinska kiselina
ABCB	eng. <i>ATP-BINDING CASSETTE-B</i>
ACT7	eng. <i>ACTIN</i>
Ad	adaksijalna površina
ANOVA	analiza varijanse
$\arcsin\sqrt{x}$	angularna transformacija
ATP	adenozin-trifosfat
AUX1	eng. <i>AUXIN RESISTANT 1</i>
B5	hranljiva podloga prema Gamborg i sar. (1968)
BA	6-benzil-aminopurin
BOA	2(3H)-benzokzazolinonom
BvSTI	eng. <i>Beta vulgaris Serin-Type proteinase Inhibitor</i>
C4H	cinamat-4-hidroksilaza
CAK	eng. <i>CDK Activating Kinase</i>
CAT	katalaza
CDBR	reduktaza dvogube veze
CDK	kinaze zavisne od ciklina (eng. <i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
cDNK	komplementarni lanac DNK
Cef	cefotaksim
CHI	halkon-izomeraza
CHS	halkon-sintaza
CTAB	heksadecitrimetil-amonium bromid
CYC	ciklin (eng. <i>cyclin</i>)
DEPC	dietil pirokarbonat

DIBOA	2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleniska kiselina
DW	suva masa (eng. <i>dry weight</i>)
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EK	eksudat korenova
ENRL	enoil reduktazi-sličan protein (eng. <i>Enoil Reductase-Like protein</i>)
FW	sveža masa (eng. <i>fresh weight</i>)
GA20ox2	eng. <i>GIBBERELLIN 20-DIOXYGENASE 2</i>
GA3ox1	eng. <i>GIBBERELLIN 3-BETA-DIOXYGENASE 1</i>
GFP	zeleni fluorescentni protein (eng. <i>Green Fluorescent Protein</i>)
Glc	glukoza
GLUT	transporter glukoze (eng. <i>glucose transporter</i>)
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPPD	hidroksifenilpiruvat-dioksidogenaza
HR	eng. <i>hairy root</i>
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
ICL	izocitrat-liaza
KRP	eng. <i>Kip-Related Protein</i>
LAX3	eng. <i>AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN3</i>
LSD	najmanja statistički značajna razlika (eng. <i>Least Significant Difference</i>)
MAD	malondialdehid
MBOA	6-metoksi-2-benzoksazolinon
MdPGT	floretin glikoziltransferaza jabuke
Mer	meropenem

MS	hranljiva podloga prema Murashige i Skoog (1962)
NAA	1-naftalen-sirćetne kiselina
NMR	nuklearno-magnetna rezonanca (eng. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NTC	negativna kontrola (eng. <i>Non Template Control</i>)
ORF	otvoren okvir čitanja (eng. <i>Open Reading Frame</i>)
ORI	početak replikacije (eng. <i>Origin of Replication</i>)
PAL	fenilalanin amonijum liaza
PCR	reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	eng. <i>Polymerase Chain Reaction-Random Fragment Length Polymorphism</i>
PGT	fenil- β -glikozil-transferaza
PIN	eng. <i>PIN-FORMED</i>
POD	peroksidaza
PT	potencijalno transformisani korenovi
PVP	polivinilpolipirrolidon
Ri	eng. <i>Root-inducing</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR	eng. <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SARD	eng. <i>Specific Apple Replant Disease</i>
SFC	indeks koji opisuje kapacitet za formiranje izdanaka (eng. <i>the index of shoot-forming capacity</i>)
SGLT	Na-glukočni kotransporter (eng. <i>Sodium-Glucose Linked Transporter</i>)
SMM	podloga za umnožavanje izdanaka (eng. <i>Shoot Multiplication Medium</i>)
SOD	superoksid-dismutaza
SRM	podloga za regeneraciju (eng. <i>Shoot Regeneration Medium</i>)

TAA1	eng. <i>TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1</i>
TBA	Tris-boratni-EDTA pufer
T-DNK	deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom (eng. <i>transfer DNA</i>)
TDZ	tiazuron
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija (eng. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
Tim	timentin
TRIS	hidroksimetil-aminometan
UGT	florein uridin-difosfat-glikoziltransferaza
UHPLC/(+/-)	
HESI-MS/MS	tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa masenom spektrometrijom (eng. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry</i>)
WOX7	eng. <i>WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 7</i>
WPM	hranljiva podloga prema Lloyd i McCown (1980) (eng. <i>Woody Plant Medium</i>)
YEB	podloga za gajenje bakterija (<i>Yeast Extract Broth</i>)
YUC	eng. <i>YUCCA FLAVIN MONOOXYGENASE</i>
4CL	4-kumaroil-CoA-ligaza

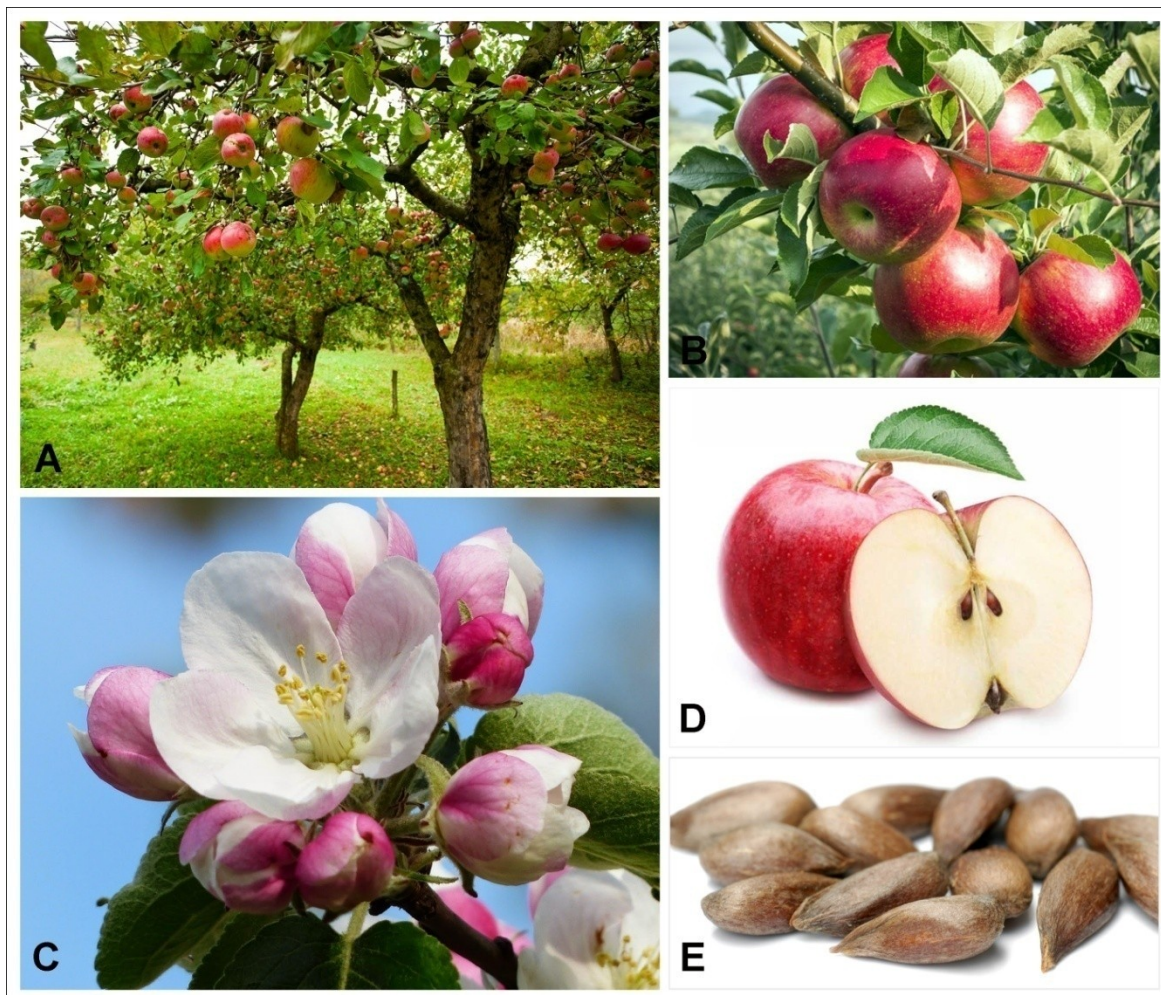
1. UVOD

1.1. Jabuka (*Malus × domestica* Borkh.)

Jabuka je listopadna drvenasta vrsta iz porodice Rosaceae sa karakterističnim krupnim i kvalitetnim plodom zahvaljujući kome je postala najmasovnije gajena voćna kultura (O'Rourke, 2003). Jabuka je jedna od najstarijih drvenastih vrsta koja je domestifikovana, a kvalitet njenih plodova je stotinama godina unapređivan putem selekcije. Od davnina je uzgajana na prostorima Azije i Evrope, a u 17. veku biva prenetu u Severnu Ameriku od strane evropskih doseljenika, a nešto kasnije i na teritoriju Australije. Stablo jabuke može da naraste i do 5 m visine kod gajenih sorti, a čak do 9 m u prirodi, gradeći relativno gustu, razgranatu i široku krošnju. Veličina, oblik i gustina krošnje selekcionisanih sorti pre svega zavisi od podloge za kalemljenje i načina orezivanja. Kora debla je tamna i ispucala (Slika 1A), dok su mladi izbojci crvenkasto-smeđi, obrasli dlačicama i prekriveni lenticelama, a kasnije postaju goli i sivosmeđi (Rieger, 2006). Listovi su sa peteljka, naizmenični i jednostavni, ovalnog oblika, dugi 4-13 cm, široki 3-7 cm, kratko ušiljeni, pravilno sitno nazubljenih rubova (Slika 1B). Sa lica su zeleni, malo sjajni, blago prekriveni dlačicama, dok su sa naličija sivkasto-zeleni sa većim brojem dlačica. Cvetovi su pravilni, dvopolni, veličine 3-4 cm (Slika 1C). Rastu pojedinačno ili po 2-3 u štitastim cvastima. Čašicu čine pet zelenih čašičnih listića, dok je krunica izgrađena od pet okruglastih belih latica koje su sa spoljašne strane rozikasto nijansirane. Prašnici su mnogobrojni, sa žutim prašnicama, dok je tučak građen od 5-6 međusobno sraslih plodnih listova. Jabuka cveta pre listanja od aprila do maja u zavisnosti od sorte, a cvetanje može trajati i do 20 dana. Plod je okruglast, jezgrast, najčešće veći od 5 cm, zelene, žućkaste ili crvenkaste boje (Slika 1D). Sadrži desetak smeđih semenki ovalnog oblika, suženog vrha, dugih oko 7 mm (Slika 1E). Plod jabuke dozreva leti ili u ranu jesen (Rieger, 2006).

Iako se u prirodi razmnožava putem semena, propagacija gajenih sorti se vrši kalemljenjem u cilju očuvanja željenih karakteristika. Razlog tome je pre svega veoma visoka heterozigotnost, usled čega se potomstvo može znatno razlikovati od roditelja. Takođe, iako je većina sorti diploidna, triploidne sorte imaju dodatnu reproduktivnu barijeru usled nemogućnosti podjednake raspodele hromozoma tokom mejoze što rezultuje pojavom aneuploidije. Ove prepreke se uspešno premošćavaju kalemljenjem na podloge

koje se selekcionišu kako bi obezbedile željenu veličinu i oblik krošnje ili povećanu otpornost na mrazeve, insekte ili bolesti.



Slika 1. Jabuka (*Malus domestica* Borgh.). Izgled biljke (A), grane sa plodovima (B), cveta (C), ploda (D) i semena (E).

Klasifikacija unutar roda *Malus* je veoma diskutabilna i veoma često podvrgavana promenama. Tako, Likhonos (1974) pominje osam, a Ponomarenko (1986) čak 78 vrsta ovog roda. Kasnije klasifikacije navode da rod *Malus* obuhvata od 25 do 47 vrsta u zavisnosti od kategorija koje su dodeljene nekim taksonima ili prihvatanja potencijalnih hibrida (Phipps i sar., 1990). Iako je domestifikovana jabuka jedna od najznačajnijih vrsta voća, veoma malo se zna o vremenu i mestu njene domestifikacije. Potencijalni preci

današnje jabuke su takođe često bili predmet debata, mada je danas najšire prihvaćeno mišljenje da je predeo Centralne Azije koevka današnjih kultivisanih sorti, a divlja kazahstanska vrsta *M. sieversii* njihov najdalji predak (Robinson i sar., 2001; Forte i sar., 2002; Harris i sar., 2002). Varijacije hloroplastne DNK, detektovane korišćenjem mikrosatelitskih markera i PCR-RFLP (eng. *Polymerase Chain Reaction-Random Fragment Length Polymorphism*) analize, ukazale su na značajan doprinos zapadno-evropske vrste *M. sylvestris* u formiranju današnjih gajenih sorti (Coart i sar., 2006).

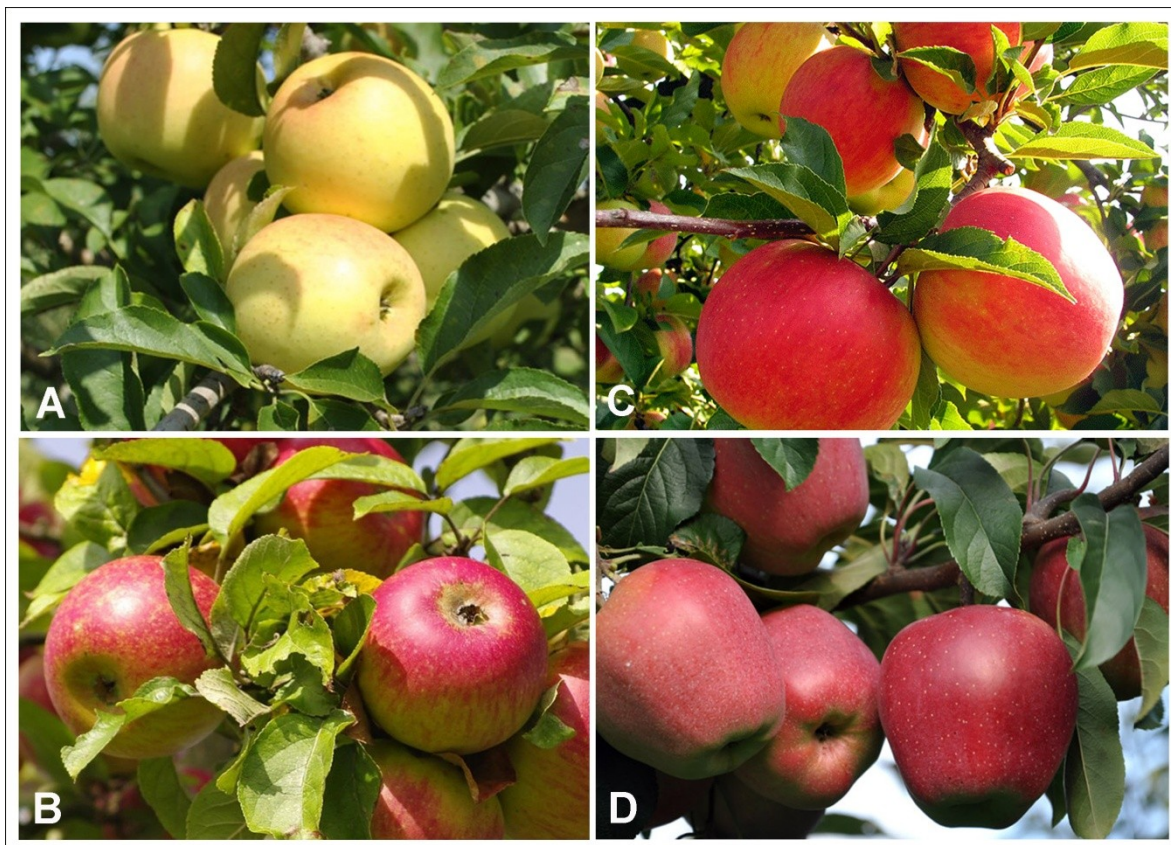
Iako američki radovi objavljeni u periodu od 1804. do 1904. godine navode preko 7000 varijeteta jabuke (Ragan, 1926), današnja svetska proizvodnja se zasniva na ograničenom broju sorti (Hokanson i sar., 2001).

Zlatni Delišeš je jedna od najmasovnije uzgajanih sorti jabuke u svetu (Slika 2A) (Moore i Ballington, 1991). Nastala je ukrštanjem sorti Grimes Golden i Golden Reinette u Zapadnoj Virdžiniji (SAD) 1914. godine. Zlatni Delišeš se danas odlikuje umereno bujnim stablom sa dobrom sposobnošću grananja. Rano prorodi i daje veliki broj zeleno- do zlatno-žutih kvalitetnih, sočnih plodova slatkog ukusa. Zbog svog izuzetnog ekonomskog značaja i širokog areala rasprostranjenja, ova stara američka sorta je izabrana za projekat sekvenciranja genoma jabuke (Velasco i sar., 2010).

Melrouz je nešto novija, takođe američka sorta jabuke, proizvedena u Ohaju (SAD) 1944. godine ukrštanjem Džonatana i Crvenog Delišeša (Slika 2B). Poznata je po svojim dosta krupnim, okruglastim sočnim plodovima, crveno-zelenkaste boje pokožice i čvrstog, bledo-žutog mesa, slatko-nakiselog ukusa. Sazreva krajem septembra.

Čadel je domaća sorta nastala u Institutu za voćarstvo Čačak (Srbija) ukrštanjem sorti Zlatni Delišeš i Jonagold, a priznata je 1984. godine (Slika 2C). Diploidna je sorta. Na slabo bujnim podlogama postiže dobre prinose i visok kvalitet ploda. Stablo je pravo, cilindrično, srednje debljine i visine. Krupa je okruglastokupasta i dovoljno retka. Plod je krupan, loptasto-kupastog oblika, sa tankom pokožicom žuto-zelene boje sa ružičastom prebojenošću koja je izraženija na delovima izloženim suncu. Meso je, čvrsto, sočno i

kiselo, sa vrlo izraženom i karakterističnom aromom. Sazreva krajem septembra i početkom oktobra.



Slika 2. Sorte jabuke. Zlatni Delišeš (A), Melrouz (B), Čadel (C) i Gloster (D).

Gloster je stara nemačka sorta nastala 1969. godine ukrštanjem Winterglockenapfel i Ričared Delišeš-a (Slika 2D). Poznata je po krupnim, rubin crveno-zelenkastim plodovima koničnog oblika, jake pokožice i čvrstog, sočnog mesa osvežavajućeg i aromatičnog ukusa.

1.2. Fenolna jedinjenja kao najzastupljeniji sekundarni metaboliti jabuke

Plod jabuke je poznat po svojim blagotvornim svojstvima po ljudsko zdravlje koja se zasnivaju na obilju vitamina, dijetetskih vlakana i fitonutrijenata. Pored njih, ovaj plod obiluje i različitim fenolnim jedinjenjima, grupom sekundarnih metabolita čiji je sadržaj značajno veći nego kod većine drugih vrsta voća (Schieber i sar., 2001; Treutter, 2001; Veberic i sar., 2005; Balasundram i sar., 2006; Soares i sar., 2008). Sánchez-Rabaneda i saradnici (2004) su u kaši ploda jabuke koja ostaje nakon pravljenja soka, korišćenjem tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom, identifikovali 60 različitih fenolnih jedinjenja uključujući fenolne kiseline i flavonoide.

Širenjem biljnog sveta iz vodenih ekosistema na kopno pre 400 miliona godina, biljke su se suočile sa novim, surovijim uslovima za život i razvile adaptacije koje su im omogućile preživljavanje na novim staništima. Neke od tih adaptacija su i sposobnost sinteze velikog broja jedinjenja označenih kao sekundarni metaboliti, koji nisu neophodni za primarne procese rasta i razvića, ali su od suštinskog značaja za interakciju biljnog organizma sa okruženjem, reproduktivnu strategiju biljaka i mehanizme zaštite od patogena i herbivora. Značajnu grupu sekundarnih metabolita biljaka čine fenolna jedinjenja. Ova jedinjenja su izgrađena od aromatičnog prstena za koji su vezani jedan ili više hidroksilnih supstituenata. Na osnovu položaja i broja supstituenata u molekulu, fenolna jedinjenja strukturno variraju od prostih fenola do visoko-polimerizovanih jedinjenja (Bravo, 1998). Najčešće prisutna fenolna jedinjenja kod biljaka se javljaju kao konjugati sa mono- ili polisaharidima, vezani za jednu ili više fenolnih grupa ili kao funkcionalni derivati kao što su estri i metil-estri (Shahidi i Naczk, 1995). Uprkos velikoj strukturnoj različitosti, fenolna jedinjenja se mogu svrstati u nekoliko osnovnih grupa na osnovu građe ugljovodoničnog skeleta (Harborne i sar., 1999) (Tabela 1).

Tabela1. Klase fenolnih jedinjenja kod biljaka. Prilagođeno prema Balasundram i sar. (2006).

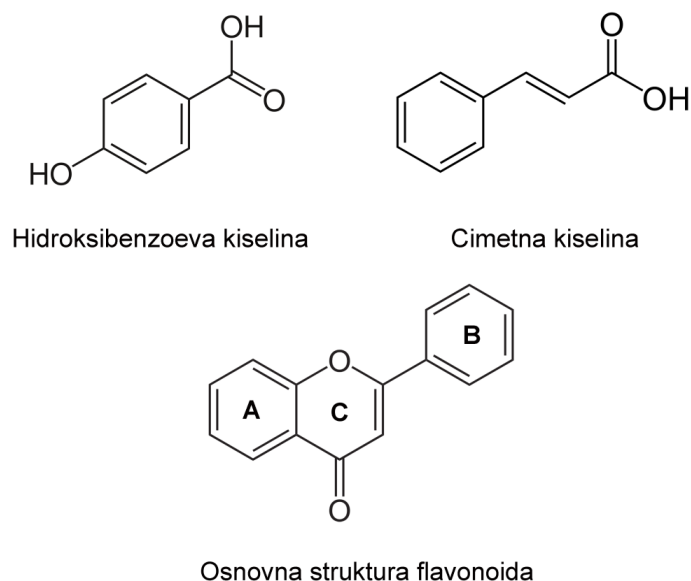
Klasa	Struktura
Jednostavni fenoli, benzokvinoni	C ₆
Hidroksibenzoeva kiselina i derivati	C ₆ -C ₁
Acetofenoni, fenilacetatne kiseline	C ₆ -C ₂
Cimetna kiselina i derivati, fenilpropanoidi	C ₆ -C ₃
Naftohinoni	C ₆ -C ₄
Ksantoni	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbeni, antrahinoni	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoidi, izoflavonoidi	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignani, neolignani	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoidi	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Lignini	(C ₆ -C ₃) _n
Kondenzovani tanini (proantocijanidini ili flavolani)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

1.2.1. Fenolne kiseline i flavonoidi

Fenolne kiseline su velika grupa fenolnih jedinjenja koju čine derivati hidroksibenzoeve i cimetne kiseline (Slika 3). U derivate hidroksibenzoeve kiseline se ubrajaju galna, *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska, gentistinska, elaginska i siringinska kiselina koje poseduju karakterističnu C₆-C₁ strukturu. Cimetne kiseline su aromatična jedinjenja sa bočnim lancem od tri C atoma (C₆-C₃) kao npr. kafeinska, ferulinska, *p*-kumarna, sinapinska kiselina i češće su zastupljene u biljkama od hidroksibenzoeve kiseline (Bravo, 1998).

Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku, dok je većina vezana estarskom, etarskom ili acetatnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom) ili sa manjim organskim molekulima (glukoza, kvinska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni). Kafeinska i kininska kiselina formiraju hlorogenu kiselinu. Fenolne kiseline su veoma česti konstituenti plodova ali i drugih biljnih organa: korena, stabla, lišća i semena (Häkkinen i sar., 1999;

Simonovska i sar., 2003; Memon i sar., 2010). Njihov sadržaj često varira među biljnim tkivima i tokom različitih faza razvića (Sikorska i sar., 2000). Prvenstveno su poznate po svojoj antioksidativnoj sposobnosti jer sprečavaju oksidaciju različitih jedinjenja, naročito masnih kiselina i lipida (Rice-Evans i sar., 1996; Kähkönen i sar., 1999; Zheng i Wang, 2001).



Slika 3. Prekursori u sintezi fenolnih kiselina, hidroksibenzoeva i cimetna kiselina i osnovni ugljovodonični skelet flavonoida.

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja u biljkama sa preko 10 000 strukturnih varijacija (Williams i Grayer, 2004; Ferrer i sar., 2008). To su molekuli male molekulske mase koji se sastoje od 15 ugljenikovih atoma uređenih u $C_6-C_3-C_6$ konfiguraciju koju čine dva aromatična prstena (A i B) povezana mostom od tri ugljenikova atoma koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten C (Slika 3). Aromatični prsten A je derivat acetatnog/malonatnog puta sinteze, dok prsten B potiče od fenilalanina nastalog u šikimatnom biosintetičkom putu (Merken i Beecher, 2000). Vezivanjem različitih supstituenata za troatomski ugljovodonični lanac nastaju glavne klase flavonoida npr.

flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, katehini, izoflavoni, halkoni, dihidrohalkoni, auron, antocijanidini itd. (Hollman i Katan, 1999). Supstitucijom aromatičnih prstenova A i B nastaju različita jedinjenja u okviru određene klase flavonoida (Pietta, 2000). Pomenute supstitucije mogu uključivati oksidaciju, alkilovanje, glikozilaciju, acilaciju i sulfataciju (Hollman i Katan, 1999).

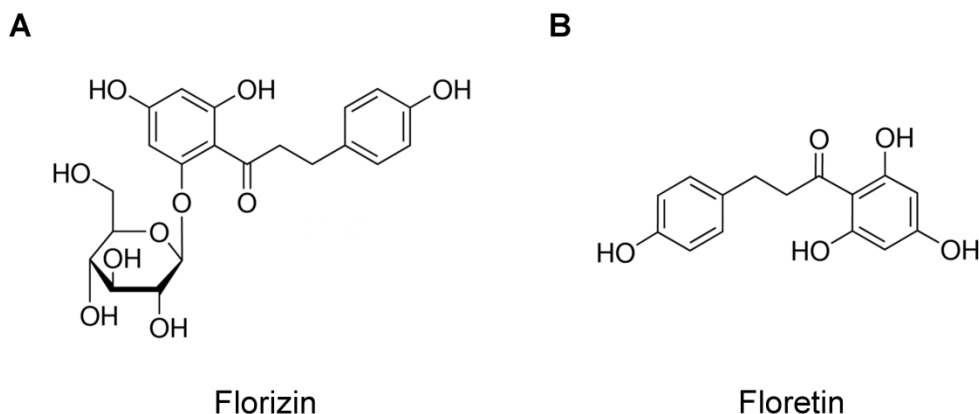
Zahvaljujući svojim fizičkim i biohemijskim osobinama, flavonoidi mogu da stupaju u interakciju sa mnogobrojnim subcelularnim ciljnim molekulima učestvujući u mnogim procesima kod mikroorganizama, biljaka i životinja (Taylor i Grotewold, 2005; Buer i sar., 2010). Flavonoidi imaju veliki broj značajnih uloga u biljnom organizmu kao što je učešće u regulaciji polarnog transporta auksina (Brown i sar., 2001; Wasson i sar., 2006; Peer i Murphy, 2007), učešće u antioksidativnoj zaštiti ćelije (Taylor i Grotewold, 2005; Agati i sar., 2012) i razvoju izdanaka i korenova (Buer i Đorđević, 2009), obezbeđivanje obojenosti različitih tkiva uključujući i cvetove (Davies i sar., 2012). Flavonoidi imaju i mnogobrojne ekološke implikacije koje uključuju alelopatske interakcije biljaka sa drugim biljkama i mikroorganizmima (John i Sarada, 2012), kao i simbiotskim bakterijama (Đorđević i sar., 1987; Zhang i sar., 2009a).

1.2.2. Dihidrohalkoni - florizin i floretin

Dihidrohalkon florizin je dominantni sekundarni metabolit jabuke koji čini više od 90% solubilnih fenolnih jedinjenja u listovima jabuke (Gosch i sar., 2009) (Slika 4A). Nastaje vezivanjem molekula glukoze za njegov aglikon floretin (Slika 4B).

Osim u listovima i plodu, florizin se u znatnim količinama javlja i u korenu, stablu ili kori iz koje je prvi put i izolovan davne 1835. godine (De Koninck, 1835). Ubrzo nakon toga, započela su i prva istraživanja vezana za efekat florizina u organizmu sisara, a značajniji rezultati vezuju se za nemačkog fiziologa Joseph von Mering-a koji je izazvao eksperimentalnu glikozuriju kod pasa ubrizgavanjem čistog florizina (von Mering, 1886). Nakon jednog stoleća istraživanja mehanizma delovanja florizina, Alvarado i Crane (1962) ga definišu kao inhibitora glukoznog transporta, a Vick i Deidrich (1973) utvrđuju da je

afinitet renalnog glukoznog transportera prema florizinu i do 3000 puta veći nego prema molekulu glukoze. Danas je poznato da florizin specifično inhibira SGLT1 Na-glukozni kotransporter glodara i SGLT2 kotransporter u apikalnom domenu epitelnih ćelija renalnih tubula čoveka (Panayotova-Heiermann i sar., 1995). Zbog sposobnosti da snizi nivo glukoze u krvi nezavisno od insulina, florizin je našao primenu u lečenju dijabetesa tipa 2 (Gaisano i sar., 2002; McCrimmon i sar., 2002). Inhibicija usvajanja glukoze u crevima i reasorpcije u bubrežnim tubulama omogućava smanjenje telesne mase pacijenata i čini ga veoma privlačnim prirodnim terapeutikom i u lečenju gojaznosti (Van den Berghe i sar., 2001).



Slika 4. Struktura dihidrohalkona florizina i floretina.

Za razliku od florizina, njegov aglikon floretin nema afinitet prema SGLT transporterima, ali može da blokira GLUT transportere glukoze i olakšava difuziju uree i glicerola, a blokira transport hlorida, bikarbonata i litijuma u eritrocitima sisara (Lefevre, 1961; Macey i Farmer, 1970). Krajem 20. veka je eksperimentima u kulturi HeLa ćelija pokazano da floretin ispoljava estrogenu aktivnost (Miksicek, 1993; Garrett i sar., 1999), kao i da utiče na celularni metabolizam trijodotironina (T3) (Movius i sar., 1989) i prevođenje tiroksina (T4) u T3 u hepatocitima pacova (Auf'mkolk i sar., 1896).

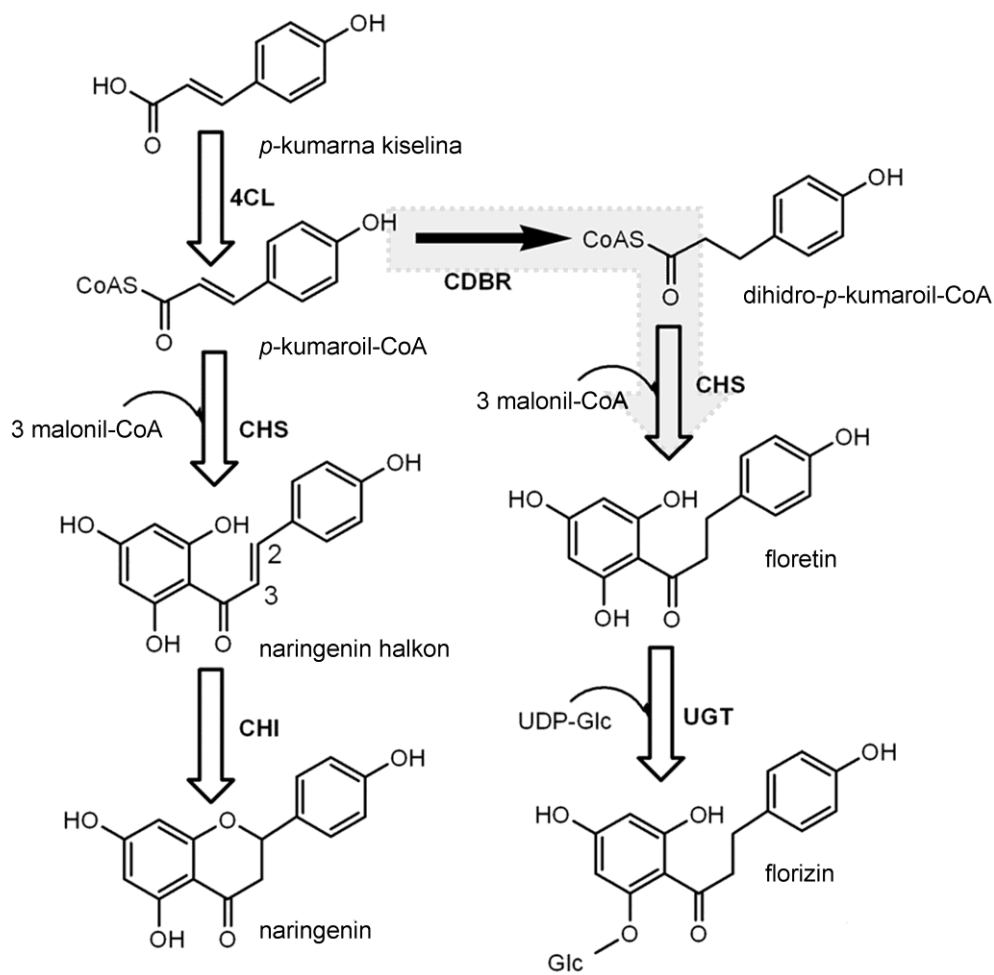
1.2.2.1. Biosintetički put floretina i florizina

Smatra se da osnovni prekursori floretina i florizina potiču iz fenilpropanoidnog puta, kao osnovnog puta sinteze široke lepeze fenolnih metabolita, nazvanog po primarnom prekursoru fenilalaninu. Deaminacijom fenilalanina pomoću enzima fenilalanin amonijum liaze (PAL) nastaje cinamična kiselina kao posledica formiranja dvostruke veze između C2 i C3 atoma bočnog lanca. Drugi enzim, cinamat-4-hidroksilaza (C4H), pripadnik citohrom P450 familije mono-oksigenaza, katalizuje dodavanje hidroksilne grupe na fenolni prsten cinamične kiseline u *para* položaju, rezultujući formiranjem *p*-kumarne kiseline. Finalni korak osnovnog fenilpropanoidnog puta jeste formiranje aktiviranog tioestra *p*-kumaroil CoA, pomoću enzima 4-kumaroil CoA ligaze (4CL) u prisustvu ATP-a i koenzima A (Ferrer i sar., 2008). Aktivirani tioestar je ključni supstrat za mnogobrojne bočne sintetičke puteve ali i za ostatak fenilpropanoidnog puta koji rezultuje formiranjem flavonoida.

Svi flavonoidi nastaju modifikacijama halkonske strukture koju formira enzim halkon sintaza (CHS) ponovljenim kondenzacijama tri malonil CoA na *p*-kumaroil-CoA prekursor (Ferrer i sar., 2008) (Slika 5). Ovom reakcijom dolazi do formiranja naringenin halkona koji podleže rapidnoj intra-molekulskoj ciklizaciji od strane halkon izomeraze (CHI), dajući naringenin. Ova reakcija se može odigrati spontano pri normalnim fiziološkim uslovima, ali prisustvo CHI obezbeđuje stereospecifičnost i nastanak biološki aktivnog naringenina (Jez i Noel, 2002). Najveći broj bočnih grana sinteze metabolita polazi upravo od prekursora *p*-kumaroil-CoA ili naringenina.

Biosintetički put koji vodi do produkcije floretina i florizina je samo delimično proučen. Rana istraživanja u ovoj oblasti ukazuju da su *p*-kumarna kiselina i *p*-kumaroil-CoA intermedijeri u sintezi ovih dihidrohalkona (Avadhani i Towers, 1961). Nekih 48 godina kasnije, dokazana je konverzija *p*-kumaroil-CoA u dihidro *p*-kumaroil-CoA, koji gradi floretin uz pomoć halkon sintaze i malonil CoA (Gosch i sar., 2009) (Slika5). Ključno mesto granjanja polipropanoidnog puta i puta sinteze floretina je najverovatnije nastanak dihidro *p*-kumaroil-CoA pomoću još uvek neidentifikovanog enzima koji redukuje C2-C3 dvogubu vezu *p*-kumaroil-CoA. Funkcionalni skrining šest gena za enoil reduktaza-slične

proteine jabuke (eng. *Enoil reductase-like*, ENRL) pokazala je da ENRL-3 i ENRL-5 mogu doprineti biosintezi florizina u jabuci (Dare i sar., 2013).



Slika 5. Polipropenoidni put sa pretpostavljenim putom sinteze dihidrohalkona floretina i florizina od *p*-kumaroil-CoA (crna strelica). Enzimi su označeni pored strelica reakcija koje katalizuju: 4CL = 4-kumaroil CoA-ligaza; CHS = halkon-sintaza; CHI = halkon-izomeraza; UGT = floretin uridin-difosfat-glikoziltransferaza; CDBR = reduktaza dvogube veze; Glc = glukoza. Modifikovano prema Dare i saradnici (2013).

Možda najbolje proučen korak u sintezi florizina jeste finalna glikozilacija floretina u florizin. Prva izolovana i okarakterizovana glikoziltransferaza koja prevodi floretin u florizin kodirana je genom *MdPGT-1* koji se eksprimira u različitim tkivima jabuke sa najvišim nivoom u vrhovima korena (Jugd  i sar., 2008). Testovima *in vitro* je potvrđena specifičnost MdPGT-1 isključivo za floretin. Dve godine kasnije, izolovana su dve nove glikoziltransferaze iz jabuke koje su imale sposobnost glikozilacije većeg broja flavonoida i fenolnih jedinjenja, uključujući i floretin (Gosch i sar., 2010a).

1.2.2.2. Varijacije u sadržaju florizina i floretina u tkivima jabuke

Primećeno je da sadržaj florizina u listovima i plodovima jabuke varira među sortama (Hunter i Hull, 1993; Łata i sar., 2009), vrstama tkiva (Gosch i sar., 2010b), razvojnim stadijumima (Zhang i sar., 2007a), područjima uzgajanja (McGhie i sar., 2005), kao i da opada sa odmicanjem vegetacione sezone (Hunter i Hull, 1993). Interesantno, nivo floretina je bio znatno podložniji variranju između sorti nego nivo florizina (Hunter i Hull, 1993). Takođe, kod sorte sa oporijim plodovima zabeležen je veći sadržaj florizina nego kod onih koje se odlikuju slatkim plodovima (Sanoner i sar., 1999; Kathrin i sar., 2005).

1.2.2.3. Pretpostavljene fiziološke uloge florizina i floretina u jabuci

Uprkos izuzetno velikom sadržaju florizina u jabuci, pogotovo u listovima i korenu, fiziološka uloga florizina je jako malo poznata. Istraživanja sprovedena tokom prošlog stoleća su ukazivala na inhibiciju formiranja cvetnih pupoljaka jabuke pod dejstvom florizina (Grochowska, 1963; 1964), kao i supresiju izduživanja koleoptila ovsu (Hancock i sar., 1962).

U uslovima kulture *in vitro* je primećeno da florizin dovodi do povećanja broja aksilarnih pupoljaka kod jabuke (Jones, 1976), kao i do povećanja broja korenova kod podloge za kalemljenje jabuke M9 (James i Thurbon, 1979). Egzogeno dodavanje florizina dovelo je takodje do stimulacije procesa somatske organogeneze kod uljane palme (Hanower i Hanower, 1984).

U literaturi postoje oskudni podaci i o ulozi florizina u dormanciji semena. Poznato je da semena jabuke, kao i semena brojnih vrsta iz familije Rosaceae, ne mogu da klijanja nakon sazrevanja, već zahtevaju specifične uslove koji moraju biti zadovoljeni da bi došlo do prekida dormancije. Tri osnovna preduslova neophodna za otpočinjanje procesa klijanja su: imbibicija, period hladne stratifikacije (0-4 °C) i dotok kiseonika do embriona koji bi omogućio započinjanje metaboličkih procesa. Smatra se da visoka koncentracija florizina, kao dominantnog fenolnog jedinjenja u semenu, pogotovo semenjači, nakon imbibicije, onemogućava dotok kiseonika do embriona i time sprečava početak klijanja (Bewley i Black, 1994). Pri niskim temperaturama, više kiseonika može da se rastvori u vodeno/fenolnoj barijeri, a manji deo biva vezan od strane polifenola, što dovodi do njegovog olakšanog dopremanja do embriona i otpočinjanja klijanja (Come i Tissaoui, 1973).

Histohemijska lokalizacija florizina u ćelijama palisadnog tkiva listova ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u zaštiti tkiva od štetnog UV zračenja (Gaucher i sar., 2013), koja je potkrepljena i rezultatima ispitivanja njegovog antioksidativnog potencijala (Dugé de Bernonville i sar., 2010).

Najveći broj autora govori o ulozi florizina u odbrani jabuke od insekata i patogena. Smatra se da je florizin uključen u odbranu jabuke od gljive *Venturia inaequalis*, koja izaziva ekonomski najznačajniju bolest jabuke - čađavu pegavost lista i krastavost plodova. Infekcija venturijom dovodi do kolapsa ćelije i oksidacije njenih metabolita, među kojima i florizina, aktivnošću enzima polifenol oksidaze. Oksidovani produkti florizina inaktiviraju pektinaze gljive i time onemogućavaju patogenu širenje koje se zasniva na razgradnji srednje lamele ćelijskog zida biljne ćelije (Raa, 1968). Sličan mehanizam je predložen i u slučaju infekcije sa gljivom *Phlyctaena vagabunda* u kome oksidacija florizina igra značajnu ulogu u ograničavanju širenja infekcije (Lattanzio i sar., 2001). Uprkos pretpostavljenoj ulozi florizina u odbrani od *V. inaequalis*, Picinelli i saradnici (2002) nisu pronašli značajne razlike u nivoima florizina u listovima rezistentnih i osetljivih sorti jabuke, ali su pretpostavili da odnos sadržaja florizina i flavonola u mladim listovima može biti indikator rezistencije. Porast sadržaja florizina u listovima Zlatnog Delišesa nakon

infekcije sa *V. inequalis*, kao i pad koncentracije floretina je zabeležen od strane slovenačke grupe autora (Petkovšek i sar., 2009). Međutim, povezanost između nivoa florizina *in vivo* i rezistencije prema čađavoj krastavosti jabuke je dosta nesigurna s obzirom na to da su druge grupe autora utvrdile veoma mali porast florizina nakon infekcije venturijom (Leser i Treutter, 2007).

Gaucher i saradnici (2013) su testovima *in vitro* ustanovili relativno nisku antimikrobnu aktivnost samog florizina, koja je bila značajno veća kada je u pitanju njegov aglikon floretin. Takođe, jasna povezanost nivoa florizina i otpornosti na plamenjaču izazvanu bakterijom *Erwinia amylovora* nije utvrđena na polju (Bell, 2004). Postoji mogućnost da produkti degradacije florizina, kao što su floretinska kiselina (dihidro-*p*-kumarinska kiselina) i floroglucinol koji poseduju antibakterijsku aktivnost *in vitro* mogu biti odgovorni za pojavu povećane otpornosti nekih sorti. Studije ukazuju da nastanak pomenutih produkata može biti posledica delovanja floretin-hidroksilaze koju proizvodi saprofitska bakterija *Erwinia herbicola* koja je često prisutna u lezijama tkiva (Bell, 2004).

Postoje kontradiktorni rezultati koji se odnose na status florizina kao repelenta ili atraktanta različitih insekata štetočina jabuke. Tako npr. florizin odbija vaši *Myzus persicae* i *Amphorophora agathomica* (Terra i sar., 1996), dok privlači *Rhopalosiphum insertum* i zelenu vaš jabuke (*Aphis pomi*) (Klingauf, 1971). Primećeno je da larve vrste *Spodoptera littoralis* izbegavaju ishranu već oštećenim listovima jabuke, što se dovodi u vezu sa povećanom količinom florizina koja je detektovana u oštećenim listovima nekoliko dana nakon nastanka oštećenja (Gutbrodt i sar., 2011). Procenat defolijacije i površina oštećenja na listovima izazvana adultnim jedinkama japanske bube (*Papillia japonica*) je bila obrnuto proporcionalna koncentraciji florizina u listovima 10 vrsta roda *Malus*, dok je dodatak florizina i floretina veštačkoj hrani značajno smanjio intenzitet ishrane (Fulcher i sar., 1998). U prilog podacima koji ukazuju na važnost florizina kao repelenta govori i činjenica da štetočina jabuke iz reda Diptera, *Rhagoletis pomonella*, može da toleriše florizin prisutan u eksudatima listova jabuke koji joj služe kao izvor hrane tako što unosi bakterije koje naseljavaju njen digestivni trakt i vrše razgradnju i detoksifikaciju florizina (Lauzon i sar., 2003).

1.2.2.4. Prisustvo florizina kod drugih biljnih vrsta

Produkcija većih količina florizina je karakteristična za rod *Malus*, dok srodne vrste kao npr. kruška (*Pyrus communis* L.) nisu sposobne da ga sintetišu. Dugi niz godina florizin je smatran specifičnošću ovog roda i korišćen je u prehrambenoj industriji kao marker za utvrđivanje prisustva ploda jabuke kao dodatka voćnim sokovima (Fernandez de Simon i sar., 2002). Skorašnji napredak u analitičkim metodama, naročito u oblasti masene spektrometrije, omogućio je detektovanje minimalnih količina ovog jedinjenja i u drugim biljnim familijama. Izvan familije Rosaceae, florizin je prvi put detektovan kod vrste *Flemengia strobilifera* iz familije Fabaceae (Saxena i sar., 1976). Kasnije su iz iste familije identifikovane još dve vrste koje sadrže florizin: *Lithocarpus litseifolius* (Rui-Lin i sar., 1982) i *Lithocarpus polystachyus* (Dong i sar., 2007), kao i vrste iz drugih familija kao što je brusnica (*Vaccinium oxycoccos*) (Turner i sar., 2005). Primena visoko ostljivih analiza kao npr. HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) analize sa masenom spektrometrijom i NMR (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*) detekcijom, omogućila je detekciju niskih količina florizina i kod drugih pripadnika familije Rosaceae izvan roda *Malus* kao što su jagoda (*Fragaria ananassa* Duch.) (Hilt i sar., 2003) i divlja ruža (*Rosa canina*) (Hvattum, 2002). Međutim, prisustvo izuzetno visoke količine florizina kod vrsta roda *Malus* još uvek nije dobilo adekvatno naučno objašnjenje.

1.3. Alelopatija

Pojava alelopatije je poznata kroz vekove. Još je grčki botaničar Teofrast 300. godina pre nove ere načinio zapise o delovanju leblebije (*Cicer arietinum*) na suzbijanje rasta korovskih biljaka (Rizivi i sar., 1992). Današnji naziv "alelopatija" potiče od grčkih reči "allelon" (uzajamno) i "pathos" (patiti ili nauditi) i uveden je od strane austrijskog fitofiziologa Hansa Moliša 1937. godine, a odnosi se na hemijsko, inhibitorno delovanje jednog organizma na drugi. Internacionalno aleopatsko udruženje je 1996. godine definisalo alelopatiju kao bilo koji proces sa negativnim ili pozitivnim efektima, koji uključuje sekundarne metabolite biljaka, mikroorganizama, virusa i gljiva koji utiču na rast i razvoj poljoprivrednih i bioloških sistema (uključujući životinje) (Torres i sar. 1996).

Uprkos definiciji, danas se pojam alelopatije najčešće razmatra u užem smislu sa aspekta delovanja jedne biljne vrste na drugu (Rice, 1984). Hemijska jedinjenja koja ispoljavaju alelopatske efekte nazivaju se alelohemikalijama. Većina alelohemikalija su sekundarni metaboliti koji nastaju kao nusprodukti primarnih metaboličkih puteva, dok neki od njih ostvaruju bitne funkcije u biljnom organizmu. Takvi su npr. intermedijeri u procesu lignifikacije ili jedinjenja koja imaju ulogu u odbrani od herbivora ili patogena (Niemeyer, 1988; Corcuera, 1993). Alelohemikalije su prisutne u većini biljnih tkiva (korenu, stablu, kori, listovima, cvetovima, plodovima ili semenu), ali se njihove koncentracije mogu značajno razlikovati među tkivima iste biljne vrste (Qasem i Foy, 2001). Ova jedinjenja najčešće dospevaju u zemljište eksudacijom korena, evaporacijom ili spiranjem sa listova ili stabla ili degradacijom izumrlih biljnih delova dospelih u zemljište aktivnošću mikroorganizama koji žive u zemljištu (Bertin i sar., 2003). Sinteza i izlučivanje alelohemikalija mogu biti pojačani u uslovima delovanja faktora stresa kao što je visoka temperatura, suša ili povećano UV zračenje (Rice, 1984; Pramanik i sar., 2000; Inderjit i Weston, 2003). Mikroorganizmi prisutni u zemljištu imaju veliki kapacitet da konvertuju, degraduju ili detoksifikuju sekundarne metabolite biljaka koristeći ih kao izvor neophodnog ugljenika i energije. Tim procesima mogu nastati nove alelohemikalije od jedinjenja koja nisu imala alelopatski potencijal ili može doći do razgradnje i inaktivacije postojećih alelohemikalija u netoksične produkte. Na taj način, mikroorganizmi aktivno menjaju kvantitet ili kvalitet alelohemikalija prisutnih u zemljištu (Inderjit, 2005).

1.3.1. Alelohemikalije kao bioherbicidi

Sposobnost biljaka da produkuju i oslobađaju jedinjenja sa alelopatskim svojstvima, kao i da tolerišu prisustvo alelohemikalija oslobođenih od strane drugih biljaka, određuje stopu preživljavanja i reprodukcije biljne vrste. Korovske vrste zahvaljujući velikom broju adaptacija koje su razvile tokom evolucije, kao što su veliki broj semena, brzo rastenje klijanaca i maturacija biljke, u agrarnim ekosistemima nadvladavaju gajene kulture dovodeći do smanjenja kvaliteta i kvantiteta prinosa i značajnih ekonomskih gubitaka (Kholi i sar., 2004). Uprkos merama koje se preduzimaju za njihovo suzbijanje, korovi zajedno sa patogenima i štetočinama dovode do smanjenja godišnje proizvodnje i do 42,1%

(Oerke i sar., 1995). Danas se koriste različite tehnike, mehaničke i hemijske, kako bi se postigao balans između troškova usled sprovođenja kontrolnih mera i gubitka useva. Kako je primena mehaničkih mera dosta zahtevna i skupa, najčešće se poteže za primenom različitih hemijskih jedinjenja za kontrolu korova. Upotreba sistemskih herbicida značajno doprinosi povećanju prinosa, a istovremeno smanjuje uloženi rad koji je najznačajniji faktor koji doprinosi visokoj ceni proizvodnje useva u razvijenim zemljama. Međutim, neselektivna primena herbicida dovela je do značajnog povećanja učestalosti pojave rezistencije nekih korovskih vrsta na herbicide, do zagađenja životne sredine i opasnosti po zdravlje čoveka i domaćih životinja (Macías i sar., 2006). Prekomerno korišćenje sintetičkih herbicida uticalo je na smanjenje kvaliteta vode, zemljišta i namirnica. Ekotipovi korova rezistentnih na herbicide predstavljaju ozbiljnu pretnju poljoprivrednoj proizvodnji. Do danas je zabeleženo 254 vrsta (148 dikotiledonih i 106 monokotiledonih) korova rezistentnih na herbicide koji su razvili rezistenciju na 23 od 26 poznatih mesta delovanja herbicida i 163 različitih hemijskih jedinjenja koja se koriste kao herbicidi (www.weedscience.com).

Alelopatske supstance prisutne u biljnim tkivima ili oslobođene u spoljašnju sredinu predstavljaju potencijal za razvoj ekoloških herbicida koji bi omogućili borbu sa vrstama otpornim na klasične herbicide. Pored toga, njihova primena stvorila bi uslove za smanjenje upotrebe hemijskih herbicida, što bi moglo imati za posledicu smanjenje zagađenja životne sredine i za ljudsko zdravlje sigurniju proizvodnju biljnih i životinjskih namirnica (Macias i sar., 2003; Khanh i sar., 2007; Han i sar., 2013). Primena alelopatije u cilju suzbijanja korova može podrazumevati zasejavanje biljaka sa alelopatskim potencijalom u vidu smene useva (eng. *crop rotation*) ili sadnje između useva (eng. *intrecropping*), malčiranje prostora između useva alelopatskim biljkama, kao i primenom izolovanih alelohemikalija kao prirodnih herbicida (Iqbal i sar., 2007; Uddin i sar., 2014; Jabran i sar., 2015; Wang i sar., 2015). Kreiranje novih transgenih sorti komercijalnih useva koji bi se karakterisali sposobnošću sinteze određenih alelohemikalija, smanjila bi se potreba za primenom hemijskih herbicida. Dodatno, proučavanja molekularnih osnova dejstva alelohemikalija omogućavaju definisanje novih ciljnih mesta delovanja bioherbicida, hemijsku

modifikaciju postojećih alelopatskih jedinjenja i kreiranje novih čije se dejstvo zasniva na istim ciljnim mestima. Tako npr. sorgolenon, između ostalog, inhibira enzim hidroksifenilpiruvat-dioksigenazu (HPPD), koja je mesto delovanja nove familije triketonskih herbicida (Nimbal i sar., 1996).

1.3.2. Eksudati korena kao izvor jedinjenja sa alelopatskim delovanjem

Korenov sistem ima izuzetnu sposobnost da oslobađa molekule male ili velike molekulske mase u rizosferu kao odgovor na različite biotičke ili abiotičke stimulse. Korenske dlačice, ali i aktivno rastući primarni i sekundarni korenovi, oslobađaju velike količine eksudata. Na osnovu funkcije koju poseduju, eksudati korenova se često dele na sekrete i ekskrate, odnosno smeše jedinjenja poznate ili nepoznate funkcije. Smatra se da su ekskreti uključeni u unutrašnje metaboličke funkcije kao što je respiracija, dok sekreti olakšavaju spoljašnje procese kao npr. usvajanje hranjivih materija (Uren, 2000). U sastav eksudata korenova u najvećoj meri ulaze jedinjenja ugljenika koja nastaju kao produkti procesa fotosinteze, ali i neorganske komponente kao što su voda, kiseonik i različiti joni (Uren, 2000). Kod klijanaca, eksudati korena čine između 30% i 40% fotosintetičke produktivnosti biljke (Sauerbeck i sar., 1981). Kod mladih biljaka, oslobađanje ovih jedinjenja je takođe veoma značajno i predstavlja i do 30% ukupne proizvodnje suve materije (Sauerbeck i sar., 1981). Kod većeg broja vrsta, među kojima su pšenica i sirak (*Sorghum bicolor*), količina eksudovanih materija opada sa starošću biljke, a raste usled suše, niske dostupnosti azota u zemljištu i drugih faktora koji deluju kao stresogeni faktori za korenov sistem (Brady i Weil, 1999; Brimecombe i sar., 2001).

Korenov sistem eksuduje i veliki broj organskih jedinjenja male molekulske mase kao što su šećeri i prosti polisaharidi (arabinoza, fruktoza, glukoza, maltoza, manoza, oligosaharidi), aminokiseline, organske kiseline (sirćetna, askorbinska, benzoeva, ferulinska itd.) i fenolna jedinjenja. Neke od ovih komponenti eksudata, pogotovo fenolna jedinjenja, ostvaruju značajan uticaj na rast i razviće zemljišnih mikroorganizama i biljaka u okruženju. Mnoga jedinjenja velike molekulske mase, koja predstavljaju produkte primarnog ili sekundarnog metabolizma biljaka (flavonoidi, enzimi, masne kiseline, tanini,

steroidi, terpenoidi, alkaloidi, poliacetileni i vitamini), mogu biti oslobođeni u znatnim količinama u zemljište (Truelove, 1986; Fan i sar., 1997; Uren, 2000). Veliki broj ovih jedinjenja takođe može ostvarivati alelopatski efekat na susedne biljne vrste ili druge organizme. Ovaj efekat može biti selektivan, tj. usmeren isključivo prema određenoj vrsti ili imati širok opseg delovanja na različite organizme (Rizvi i Rizvi, 1992). Mnoge vrste kao što su crni orah (*Juglans nigra*), pšenica i sirak su dobro poznati primeri biljaka sa potentnim alelopatskim delovanjem. Crni orah uzrokuje propadanje i nekrozu mnogih zeljastih i drvenastih vrsta u svom okruženju zahvaljujući prisustvu naftokvinona juglona (5-hidroksi-1,4-naftokvinon) (Willis, 2000). Koren, lišće i plodovi crnog oraha poseduju značajne količine redukovane forme juglona koji oslobađanjem u spoljašnju sredinu biva oksidovan i time preveden u toksičan oblik (Lee i Campbell, 1969; Segura-Aguilar i sar., 1992). Pšenica ima širok opseg delovanja na različite biljne vrste, insekte i patogene zahvaljujući prisustvu različitih alelopatskih supstanci kao što su fenolne kiseline, hidroksamična kiselina i masne kiseline kratkog lanca u stablu, korenu i eksudatu korena (Wu i sar., 2000, 2001). Eksudat korena sirka sadrži od 85 do 90% čistog sorgoleona, benzokvinona sa veoma potentnim alelopatskim dejstvom (Nimbal i sar., 1996). Sorgoleon već u koncentraciji od 10 μ M ispoljava snažno inhibitorno delovanje na širokolisne i uskolisne korove u hidroponičnoj kulturi (Einhellig i Souza, 1992).

1.3.3. Uloga fenolnih jedinjenja u alelopatiji

Fenolna jedinjenja predstavljaju značajnu grupu biljnih alelohemikalija. Prosti fenoli, hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati i aldehidi, derivati cimetine kiseline, kumarini, tanini i flavonoidi su najčešće pominjana fenolna jedinjenja sa alelopatskim delovanjem (Zeng i sar., 2008).

Hlorogena kiselina, 3,4-dihidrobenzoeva kiselina, galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzaldehid, *p*-hidroksibenzoeva kiselina i kafeinska kiselina kao glavna fenolna jedinjenja izolovana iz vodenog ekstrakta cvetova, listova i grančica ornamentalne drvenaste vrste *Delonix regia* imala su značajan alelopatski efekat na salatu i kineski kupus (*Brassica chinensis*) (Chou i Leu, 1992). Aleopatsko delovanje većine pomenutih fenolnih

jedinjenja je nagovešteno i u ranijim radovima (Chou i Muller, 1972; Chou i Lin, 1976; Chou i Lee, 1991; Tang, 1986). Fenolne kiseline kao što su *p*-kumarna kiselina, galna, ferulinska i *p*-hidroksibenzoeva u sastavu eksudata korena *Ageratum conyzoides* ostvarila su značajan inhibitorski uticaj na rast pirinča (*Oryza sativa*) (Batish i sar., 2008a).

Iako fenolne kiseline najčešće stoje u osnovi inhibitorskog delovanja mnogih biljnih izolata, flavonoidi su značajni medijatori alelopatskih interakcija u zemljištu, kako između biljaka tako i između biljaka i mikroorganizama. Kvercetin dihidrat, ramnetin, izoramnetin, 6-metoksi kemferol i kemferol-3-glukozid inhibiraju izduživanje korena klijanaca salate, dok naringenin, eridiktol i kvercetin-3,3-dimetil etar izazivaju njegov ageotropski rast (Levizou i sar., 2004). Naringenin inhibira rast jednogodišnjih biljaka među kojima su: *Spinacia oleracea*, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus*, *Lycopersicon esculentum*, *Daucus carota* (Chen i sar., 2004) i *Glycine max* (Colpas i sar., 2003; Bido i sar., 2010). Kemferol koji je izolovan iz zemljišta na kojima su bile prisutne biljke *Quercus mongolica* Fisch. ispoljavao je alelopatičko delovanje na zelenu salatu, *Amaranthus viridis*, pšenicu i *Phleum pratense* (Li i sar., 1993a).

1.3.4. Mehanizmi delovanja alelohemikalija

Alelohemikalije mogu indirektno da deluju na mnoge fiziološke procese, a fenotipski odgovor ciljnih organizama na specifično jedinjenje je češće rezultat sekundarnih efekata nego primarnih mehanizama delovanja (Dayan i sar., 2000). Uticaj na rastenje i razviće biljaka je najčešće posledica promena na molekularnom ili ultrastrukturnom nivou u ćeliji, kao i biohemijskih i fizioloških procesa. Poznavanje primarnih ciljnih mesta delovanja alelohemikalija je jedan od najbitnijih koraka u razvoju metoda u agroekologiji koje se mogu primeniti u organskoj proizvodnji.

Klijanje semena - Mnoge alelohemikalije ispoljavaju inhibitorsko dejstvo na klijanje semena, koje je češće posledica narušavanja normalnog ćelijskog metabolizma nego oštećenja organela u ćeliji. Mobilizacija rezervi semena, koja se intenzivno dešava u toku početnih faza klijanja, je najčešće usporena ili umanjena pod dejstvom

alelohemikalija. Klijanje žitarica najčešće zavisi od procesa razgradnje skroba pod dejstvom enzima α -amilaze kako bi se obezbedili supstrati za respiratorni metabolizam. Eksudati listova eukaliptusa smanjuju aktivnost α -amilaze semena afričkog prosa (*Eleusine coracanta*) inhibirajući njegovo klijanje (Padhy i sar., 2000). Sličan efekat ostvaruje 6-metoksi-2-benzoksazolinon (MBOA), često prisutan u žitaricama, na seme kres salate (*Lepidium sativum*) (Kato-Naguchi i Macias 2004).

U toku klijanja semena koja sadrže ulja kao rezervnu materiju, glioksilatni ciklus igra ključnu ulogu u mobilizaciji triglicerida. U toku početnih faza klijanja, enzimi glioksilatnog ciklusa, kao što je izocitrat-liaza (ICL), imaju povišenu aktivnost kako bi omogućili intenzivan metabolizam lipida u rezervnim tkivima klijavućeg semena (McLaughlin i Smith 1994). Inhibicija lipidne mobilizacije u prisustvu ferulinske i *p*-kumarne kiseline je primećena tokom ranih faza klijanja semena uljane repice (*Brassica napus*) (Baleroni i sar., 2000), kao i suncokreta (*Heliantus annuus*) u prisustvu alakaloida iz dature (*Datura stramonium*) (Levitt i sar., 1984). Izocitrat-liaza je najčešće inhibiran enzim usled dejstva alelohemikalija. Maffei i saradnici (1999) su ukazali da jedinjenja sa alelopatskim efektom deluju ne samo inhibirajući aktivnost samog enzima nego i snižavajući njegovu gensku ekspresiju.

Fenolna jedinjenja ekstrahovana iz zemljišta prekrivenog biljnim materijalom poreklom od bukve (*Fagus sylvatica*) i bora (*Pinus laricio* spp. Calabria) značajno su inhibirala klijanje semena bora (Muscolo i sar., 2001). Testirana fenolna jedinjenja su snizila aktivnost glukoze-6-fosfat-dehidrogenaze, glukoze-fosfat-izomeraze i aldolaze – enzima uključenih u glikolizu i oksidativni put pentozo-fosfata koji obezbeđuju snabdevanje semena neophodnim količinama energije za anabolizam.

Ćelijski ciklus – Mladi biljni organi u kojima se odigravaju intenzivne ćelijske deobe često mogu biti pogođeni delovanjem alelohemikalija. Njihov uticaj na retardaciju proliferacije ćelija može biti posledica inhibicije sinteze DNK (Nishida i sar., 2005), poremećaja u formiranju citoskeleta (Rudrappa i sar., 2007; Soltys i sar., 2011) ili narušene ekspresije gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa – ciklina i kinaza zavisnih od

ciklina (Zhang i sar., 2010; Dmitrović i sar., 2015). Promene u ćelijskom ciklusu se najčešće manifestuju usporenim rastom radikule ili korena klijanaca. Tako su npr. isparljivi monoterpenoidi iz vrste *Salvia leucophylla* izazvali retardaciju rasta korenova biljke *Brassica campestris* inhibicijom proliferacije meristemskih ćelija apeksa korena i zaustavljanjem sinteze nukleusne i mitohondrijske DNK (Nishida i sar., 2005). Slično, rast korena belog luka je bio značajno usporen delovanjem cianamida, izolovanim iz maljave graorice (*Vicia villosa*), koji je doveo do poremećaja ćelijske deobe, modifikacija organizacije citoskeleta i smanjenja mitotičkog indeksa meristemskih ćelija (Soltys i sar., 2011). Sorgoleon, benzokvinon iz eksudata korena sirka, je delovao kao snažan inhibitor ćelijskih deoba u meristemu apeksa radikule pasulja, smanjivši broj ćelija u profazi, metafazi i anafazi mitoze (Hallak i sar., 1999), dok je tretman klijanaca salate sa 2(3H)-benzokzazolinom (BOA) značajno usporio ćelijski ciklus sprečavajući prelazak ćelija iz G2 u M fazu (Sánchez-Moreiras i sar., 2008). Alelohemikalije polena kukuruza su indukovale smanjenje mitotičke aktivnost meristemskih ćelija radikule *Citrullus lanatus*, kao i pojavu iregularnih i piknotičkih nukleusa (Cruz-Ortega i sar., 1988). Slično, eksudati listova i stabljike *Mirabilis jalapa* su poremetili mitotičku deobu u klijavućim semenima različitih useva: *T. aestivum*, *Z. mays* i pasulja (*Pisum sativum*) i različitih korovskih vrsta, smanjujući mitotički indeks za oko 31%, ali bez uticaja na dužinu ćelijskog ciklusa, što je za posedicu imalo povećanje prečnika korena i hipertrofiju korenske kape (Anaya i Pelayo-Benavides, 1997).

Alelohemikalije mogu inhibirati ciklus ćelijske deobe smanjenjem ekspresije gena za cikline (eng. *cyclins* - CYC) i kinaze zavisnih od ciklina (eng. *cyclin dependent kinase* - CDK) koji predstavljaju glavne regulatore ćelijskog ciklusa kod biljaka (Berckmans i De Veylder, 2009; Dong i sar., 2011). Kinaze zavisne od ciklina imaju centralnu ulogu u upravljanju toka ćelijskog ciklusa, a njihova aktivnost je regulisana u asocijaciji sa ciklinskim partnerom na različitim kontrolnim tačkama (Van Leene i sar., 2010). Smanjenje ekspresije *CYC* i *CDK* gena može usporiti prolazak ćelije kroz određene faze ćelijske deobe u kontrolnim tačkama koje su regulisane odgovarajućim kompleksom CYC i CDK. Izučavajući pojavu autoalelopatije kod krastavca, Zhang i saradnici (2010) su primetili da

je ekspresija *CycA*, *CycB* i *CDKB* gena, koji su uključeni u kontrolu prelaska ćelije iz G2 u M fazu, u vrhovima radikule klijanaca krastavca značajno snižena usled delovanja alelohemikalija iz vodenog ekstrakta korenova krastavca i njihovog hidrofobnog eksudata, dok je eksudat korenova krastavca delovao i na sniženje ekspresije *CDKA* i *CycD3;1* gena. Slično, eksudat korenova *Chenopodium murale* je snizio ekspresiju *CDKA;1* i četiri *CDKB* gena, kao i *CYCA3;1*, *CYCB2;4*, *CYCD4;2* i *CYCH1* gena u vrhovima izdanaka i korenova tretiranih klijanaca arabidopsisa, dok je nivo transkripta *CYCD2;1* gena bio povećan u izdancima, ali snižen u korenovima (Dmitrović i sar., 2015). *Ta-CDC2* i *Ta-CYCD2* geni pšenice u tretiranim klijancima su imali iste profile ekspresije kao i njihovi analozi *CDKA1;1* i *CYCD2;1* kod arabidopsisa, na osnovu čega je pretpostavljeno da je retardacija rasta klijanaca obe vrste bila jednim delom posledica identičnog mehanizma delovanja alelohemikalija prisutnih u eksudatu *C. murale* (Dmitrović i sar., 2015).

Ultrastruktura ćelije – Delovanje alelohemikalija se često ogleda i u promenama strukture ćelije čije su posledice poremećeno funkcionisanje i usporen rast biljnih tkiva i organa. Tako npr. neka fenolna jedinjenja mogu dovesti do povećane permeabilnosti ćelijske membrane, gubitka sadržaja ili lipidne peroksidacije, što vodi usporenom rastu ili izumiranju biljnog tkiva. Fenolna jedinjenja iz korenova *Phaseolus vulgaris* mogu povećati permeabilnost ćelijske membrane i dovesti do lipidne peroksidacije (Cruz i sar., 1998), dok derivati cimetine i benzoeve kiseline mogu sniziti aktivnost fenil- β -glikozil-transferaze (PGT) i dovesti do povećanja membranske propustljivosti ćelija korena krastavca (*Cucumis sativus*) (Politycka, 1997).

Redukcija rastenja usled delovanja alelohemikalija može biti posledica i narušavanja strukture organela, kao u slučaju mitohondrija meristemskih ćelija korena belog luka tretiranog kumarinom, koje postaju kondenzovane i sa gustim matriksom (Kupidłowska i sar., 1994). Takođe, Burgos i saradnici (2004) su zapazili da jedinjenja BOA i DIBOA mogu povećati vakuolizaciju citoplazme i smanjiti broj ribozoma i mitohondrija. Alelohemikalije sadržane u eksudatu korena *C. murale* izazivaju sniženje stope klijanja i morfofiziološke promene kod klijanca pšenice, koje su najverovatnije posledica strukturnih abnormalnosti ćelije kao što je povećan broj mitohondrija, promena u

izgledu vakuole i jedra, organizaciji i distribuciji hloroplasta i strukturi ćelijskog zida (Mitić i sar., 2018).

Fotosinteza i respiracija - Narušavanje fotosinteze je jedan od najčešćih fizioloških efekata uzrokovanih dejstvom različitih alelohemikalija. Sorgoleon, lipofilni benzokvinon iz eksudata *Sorgus bicolor*, deluje inhibitorno na proces fotosinteze slično triazinskim herbicidima kao što je npr. atrazin (Einhellig i sar., 1993; Rimando i sar., 1998; Czarnota i sar., 2001). On inhibira fotosintetički elektron transport fotosistema II (PSII) delujući na Q_B mesto D₁ proteina (Nimbal i sar., 1996). Meazza i saradnici (2002) su utvrdili da juglon, sorgoleon i druge alelohemikalije koje pripadaju benzokvinonima, naftokvinonima i triketonima, inhibiraju enzim za sintezu plastokvina – p-hidroksifenil piruvat dioksidazu. Inhibicija ovog enzima narušava biosintezu karotenoida, što uzrokuje prosvetljavanje listova. Snižen nivo hlorofila i karotenoida je detektovan kod klijanaca salate tretiranih artemizininom i njegovim seskviterpenskim analogima (Dayan i sar., 1999). Niži sadržaj hlorofila je zabeležen i kod male sočivice (*Lemna minor*) koja je rasla u prisustvu juglona. Međutim, on nije narušio odnos hlorofila a i b (Hejl i sar., 1993). Redukovan intenzitet fotosinteze u listovima slačice (*Sinapis alba*), koja je bila izložena dejstvu alelohemikalija iz suncokreta, bio je povezan sa smanjenjem stope transpiracije što je ukazalo na ograničenu difuziju CO₂ u hloroplaste usled zatvaranja stoma (Bernat i sar., 2004).

Modifikacija procesa respiracije u mitohondrijama koja vodi sniženju zaliha ATP-a može takođe stajati u osnovi poremećaja u rastanju i razviću biljaka usled delovanja alelohemikalija. Kumarini smanjuju mitohondrijalnu respiraciju u ćelijama korena belog luka (*Allium cepa*) (Kupidłowska i sar., 1994). Takahashi i saradnici (1998) su utvrdili da kvercetin utiče na respiratornu aktivnost izolovanih mitohondrija iz hipokotila soje inhibicijom oksidacije supstrata usled direktnog uticaja na lanac transporta elektrona. DIMBOA (2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on), izolovan iz klijanaca kukuruza, je redukovao transport elektrona u mitohondrijama kukuruza i inhibirao oksidativnu fosforilaciju (Massardo i sar., 1994).

Usvajanje jona i rastenje - Efekat alelohemikalija na respiraciju i fotosintezu, koji rezultuje smanjenom produkcijom ATP-a, može da poremeti druge energetske procese u ćeliji. Poznato je da su usvajanje jona i rastenje energetski najzahtevniji procesi u biljnoj ćeliji (Van der Werf i sar., 1988). Inhibicija rastenja kljanaca pod dejstvom alelohemikalija može nastati i kao rezultat poremećaja u usvajanju jona. Tako je veliko smanjenje nivoa ATP primećeno kod semena slačice tretiranih alelohemikalijama iz lista suncokreta (Bogatek i sar., 2002). Kako je koren biljni organ koji prvi dolazi u kontakt sa alelohemikalijama u rizosferi, efekat alelohemikalija na usvajanje jona je od posebne važnosti. Eksudati korena krastavca inhibirali su usvajanje NO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} jona od strane korena klijanaca krastavca (Yu i Matsui, 1997). Takođe je zabeležen i inhibični efekat *p*-hidroksicimetne, vanilinske i ferulinske kiseline na usvajanje H_2PO_4^- jona od strane korena krastavca (Lyu i sar., 1990).

Alelohemikalije mogu delovati i na membranske enzime kao što je protonska pumpa (H^+ -ATP-aza) lokalizovana u plazminoj membrani. Ova pumpa je odgovorna za stvaranje elektrohemijskog gradijenta (Michelet i Boutry, 1995) koji omogućava usvajanje i efluks jona i metabolita kroz plazminu membranu (Palmgren, 2001). Njena inhibicija dovodi do redukcije usvajanja vode i mineralnih materija od strane korena, što za posledicu ima snažan efekat na esencijalne funkcije u biljci kao što su fotosinteza, respiracija i sinteza proteina, što vodi usporavanju rasta biljke. Inkubacija klijanaca salate sa poligodialom – alelopatskom supstancom iz vrste *Polygonum hydropiper*, dovodi do inhibicije H^+ -ATP-azne aktivnosti (Fujita i Kubo, 2003).

Oksidativni stres - Jedan od čestih efekata alelohemikalija jeste nekontrolisana produkcija i akumulacija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), koja je praćena aktivacijom ćelijskog antioksidativnog sistema koji obuhvata povećanu aktivnost antioksidativnih enzima, kao i povećanu sintezu jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem (glutation, askorbat, tokoferol itd.). Tako npr. katehin iz eksudata vrste *Centaurea maculosa* inhibira klijanje semena i rastenje klijanaca *Festuca idahoensis*, *Koeleria micrantha* i *A. thaliana* povećanjem produkcije ROS (Bais i sar., 2003). Eksplozija reaktivnih kiseoničnih vrsta i kinetika njihove indukcije pokazivala je sličan obrazac kao i ćelijska smrt indukovana

katehinima. Primena askorbinske kiseline je blokirala porast ROS delujući kao antioksidant, dok je veliki broj gena koji učestvuju u odgovoru ćelije na oksidativni stres bio indukovan nakon izlaganja katehinu (Bais i sar., 2003). Izlaganje korenova krastavca ferulinskoj i *p*-kumarnoj kiselini povećalo je nivo vodonik-peroksida i peroksidaznu aktivnost (Politycka i sar., 2004). Vodeni ekstrakt korenova krastavca doveo je do povećanja aktivnosti katalaza (CAT), superoksid-dismutaze (SOD) i peroksidaze (POD) u korenovima krastavca (Yu i sar., 2003).

Ostaje pitanje da je li povećanje produkcije ROS samo primarni efekat alelohemikalija, koji vodi do aktivacije antioksidativnog sistema ili ROS mogu takođe delovati kao signalni molekuli u transdukcionalnoj signalnoj kaskadi. Sa druge strane, detoksifikacija i aktivacija antioksidativnih mehanizama može vremenom omogućiti biljkama otpornost na dejstvo alelohemikalija. Odabir između ova dva puta reagovanja na delovanje alelohemikalija može biti od presudnog značaja za opstanak biljne vrste (Gniazdowska i Bogatek, 2005).

Biljni hormoni - Podaci o delovanju alelohemikalija na biljne hormone su relativno oskudni i često suprotstavljani. Lee i Skoog (1965) su nagovestili da fenolna jedinjenja remete nivo IAA utičući na njegovu degradaciju. Tako npr. derivati benzoeve kiseline stimulišu degradaciju auksina (Lee i Skoog, 1965), a hidroksi-benzoeva kiselina degradaciju auksina i giberelina (He i sar., 2001). Alelohemikalija iz izdanaka kukuruza, 6-metoksi-2-benzoksazolinon (MBOA) ispoljava takođe anti-auksinski efekat (Hasegava i sar., 1992). Kafeinska i hlorogena kiselina su značajno povećale aktivnost IAA-oksidaze u korenu leblebije 10 dana nakon zasejavanja semena (Garg i Garg, 1989).

Sa druge strane, sugerisano je da endogena fenolna jedinjenja deluju protektivno dovodeći do akumulacije auksina, kao i da inhibiraju IAA-oksidazu (Mato i sar., 1994, Cvikrova i sar., 1996). Tretiranje klijanaca pšenice ferulinskom kiselinom je dovelo do porasta koncentracije IAA, giberelina, citokinina i abscisinske kiseline (ABA), što je uslovalo inhibiciju rasta klijanaca (Liu i Hu, 2001). Primenjena u visokim koncentracijama, 3,4-di-hidroksibenzoeva kiselina inhibirala je rast kalusa i korena duvana i regeneraciju

izdanaka, dok je u niskim koncentracijama stimulisala formiranje kalusa i proces ožiljavanja, delujući slično auksinima (Mucciarelli i sar., 2000).

1.3.5. Alelopatsko delovanje fenolnih jedinjenja jabuke

Potencijalnu autoalelopatsku ulogu florizina, floretina i drugih fenolnih jedinjenja iz jabuke sugerisao je Börner davne 1959. godine, smatrajući ih odgovornim za razvoj bolesti jabuke poznate kao „*Specific Apple Replant Disease*“ (SARD). Ova bolest se manifestuje usporenim i zakržljanim rastom stabla i korena, kao i slabim plodonošenjem sadnica jabuke posađenim na mestima prethodnih voćnjaka jabuke. Ispitivanje korenovog sistema voćaka obolelih od SARD je ukazalo na pojavu propadanja epidermalnih ćelija i kortikalnog tkiva korena i značajnu redukciju u razvoju lateralnih korenova (Savory, 1966; Hoestra, 1968). Takođe je primećen veoma mali broj funkcionalnih korenskih dlačica na obolelim korenovima (Caruso i sar., 1989). Iako je problem uspostavljanja zasada jabuke na mestima starih voćnjaka dokumentovan još pre dva stoleća, etiologija razvoja SARD je i danas ostala nepoznanica. Postoje mnogobrojne implikacije o učešću različitih zemljišnih organizama u razvoju SARD, kao što su parazitske nematode iz roda *Pratylenchus* (Jaffee i sar., 1982), aktinomicete (Wescott i sar., 1987) i veliki broj gljiva (Taylor i Wallace, 1970; Braun, 1995). Primena fungicida u predtretmanu zemljišta, kao i sterilizacija zemljišta koja je često dovodila do uspešnog suzbijanja razvoja simptoma bolesti, navela je na zaključak da su gljive najčešći uzročnici ove bolesti (Mazzola, 1998). Sa druge strane, mnogobrojni kontradiktorni rezultati, kao i činjenica da primena fungicida širokog spektra delovanja, iako menja sastav mikrobiotskih zajednica, ne utiče na bolji rast i povećanje prinosa jabuke (Yao i sar., 2006), bacaju dodatnu senku na problem SARD-a.

Iako je Börner (1959) godine ukazao na potencijalnu ulogu florizina, floretina i fenolnih jedinjenja na razvoj simptoma SARD, dugi niz godina njihovo autoalelopatsko delovanje nije razmatrano. Noviji literaturni podaci ukazuju da eksudati korena vrsta *Malus pumila* i *Malus prunifolia* mogu ispoljiti inhibitorno dejstvo na klijanje semena i razvoj klijanaca sopstvene vrste (Zhang i sar., 2007b; Bai i sar., 2009a). Ovi rezultati nagoveštavaju da bi fenolna jedinjenja koja dospevaju u zemljište eksudacijom korena

jabuke ili razgradnjom izumrlih biljnih delova (opalog lišća, plodova, kore ili korena), mogla biti ključni faktori u razvoju simptoma SARD (Yin i sar., 2016). Bai i saradnici (2009a) su ukazali da ftalna kiselina dovodi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta koje vode povećanju aktivnosti antioksidativnih enzima, celularnih oštećenja i usporenog rasta izdanaka i korenova mladih biljaka *M. prunifolia*, dok cimetna kiselina može dovesti do smanjenja stope respiracije i aktivnosti enzima fosfofruktokinaze, glukozo-6-fosfat-dehidrogenaze i malat-dehidrogenaze u korenovima *M. hupehensis* (Gao i sar., 2010).

Nicola i saradnici (2017) su primetili da je tretman klijanaca jabuke sorte Fuji mešavinom zemlje i usitnjenih korenova podloge za kalemljenje M26, nakon četiri meseca doveo do statistički značajnog smanjenja sadržaja hlorofila, mase korenova i ukupne mase biljaka. UHPLC analiza sa masenom spektrometrijom pokazala je značajan porast sadržaja isključivo florizina i floretina u poređenju sa drugim detektovanim fenolnim jedinjenjima u primenjenoj mešavini u odnosu na zemlju bez dodatka usitnjenih korenova jabuke. Tretman klijanaca *M. hupehensis* sa niskim koncentracijama florizina (1,0 μ M) je poboljšao njihov rast, dok su visoke koncentracije (od 1,0 mM i više) delovale inhibitorno (Jianghong i sar., 2007). Primećene su ultrastrukturne promene na hloroplastima i mitohondrijama ćelija listova i korena, kao i povećanje sadržaja indikatora lipidne peroksidacije membrane - malondialdehida (MAD) i aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD), peroksidaze (POD) i katalaze (CAT) na koncentraciji od 1,0 mM florizina. Takođe, pri višim koncentracijama uočeno je sniženje transpiracije i fotosinteze (Jianghong i sar., 2007). Sličan efekat florizina uočen je kod klijanaca vrste *M. micromalus* u čijim je korenovima zabeležen porast aktivnosti SOD, POD i CAT kao i nivo MAD i prolina, a koji je zavisio od primenjene koncentracije i dužine izloženosti tretmanu (Cui i sar., 2010). Stopa respiracije i aktivnost enzima uključenih u ciklus trikarboksilnih kiselina su bili inhibirani u korenovima *M. hupehensis* dejstvom 4,0 mM florizina (Wang i sar., 2012). Takođe, floretin, florizin i benzoeva kiselina primenjeni na klijance *M. hupehensis* Rehd. su izazvali povećanje nivoa ekspresije proteina uključenih u odbrambene mehanizme ćelija korena (Yin i sar., 2018).

1.4. Biotehnologija u službi proučavanja alelopatije

Izolacija i karakterizacija metabolita koji bivaju eksudovani iz korenova u rizosferu kao i procena njihovog alelopatskog potencijala može biti veoma komplikovana. Zbog neizbežnog uticaja mikroorganizama koji aktivno menjaju kvantitet i kvalitet jedinjenja izlučenih od strane biljaka u zemljište (Inderjit, 2005), proučavanje alelopatskog potencijala specifičnog jedinjenja ili izolata alelohemikalija određene biljne vrste može biti izuzetno komplikovano. Iz tog razloga, uspostavljanje sistema koji bi omogućio eksudaciju alelohemikalija od strane korenova direktno u tečnu sterilnu podlogu pod strogo kontrolisanim uslovima, kao i akumulaciju i identifikaciju potencijalnih alelohemikalija, može znatno olakšati proces proučavanja alelopatije. U tom smislu, dobijanje transformisanih korenova putem genetičke transformacije proučavanih biljnih vrsta pomoću bakterije *Agrobacterium rhizogenes* i uspostavljanje *in vitro* kulture transformisanih korenova koji se karakterišu sposobnošću konstantnog rasta, nezavisnog od nadzemnog dela biljke i egzogeno primenjenih regulatora rastenja, predstavlja pogodan ekperimentalni model koji bi znatno olakšao proučavanje alelopatskog potencijala mnogih biljnih vrsta.

1.4.1. Transformacija biljaka posredstvom *Agrobacterium rhizogenes*

A. rhizogenes je otkrivena tridesetih godina prošlog veka i definisana kao zemljišna, sa *A. tumefaciens* srodna gram-negativna bakterija koja kod biljaka uzrokuje bolest poznatu pod nazivom “*hairy roots*”, a koja se manifestuje razvojem neoplastičnog tkiva u vidu dlakavih korenova na mestima infekcije. Pokazano je da ovi korenovi imaju jedinstvenu sposobnost da rastu u kulturi *in vitro* bez egzogeno dodatih regulatora rastenja. Transformisani korenovi najčešće ne pokazuju velike strukturne razlike u odnosu na netransformisane korenove, ali ih karakteriše brz rast, izraženo bočno grananje, korenske dlačice koje su duže i brojnije, kao i plagiotropan rast (Tepfer, 1987). Ovaj fenotip je prouzrokovan transferom gena sa dela Ri (eng. *root-inducing*) plazmida, tzv. T-DNK (eng. *transfer DNA*), integracijom u genom biljne ćelije i njihovom ekspresijom (Chilton i sar., 1982). Zajedničke karakteristike Ri plazmida različitih sojeva *A. rhizogenes* su prisustvo jednog ili više T-DNK regiona, *vir* (eng. *virulence*) regiona, mesta početka replikacije (eng.

origin of replication - ORI), *tra* regiona koji omogućava konjugativni transfer i gena koji omogućavaju katabolizam opina (Lahners i sar., 1984).

A. rhizogenes (kao i *A. tumefaciens*) transformacijom primorava biljnu ćeliju da sintetiše opine, jedinjenja koja ovim bakterijama prvenstveno služe kao izvor energije, ugljenika, azota i u nekim slučajevima fosfora. Na osnovu tipa opina čiju sintezu indukuju u transformisanim biljnim ćelijama, sojevi *A. rhizogenes* se mogu svrstati u nekoliko grupa: (1) agropinski sojevi (A4T, 15834, TR105), kod kojih Ri plazmid sadrži dva odvojena T-DNK regiona, T_L-DNK i T_R-DNK, (2) manopinski sojevi (TR7, 8196) koji sadrže Ri plazmid sa T-DNK koja pokazuje visok stepen homologije sa T_L-DNK agropinskih plazmida, (3) mikimopinski sojevi (A5, A6) i (4) kukumopinski sojevi (2588, 2657) (Veena i Taylor, 2007).

1.4.1.1. Geni Ri plazmida *A. rhizogenes*

Poznato je da se T-DNK Ri plazmida agropinskog tipa sastoji od T_L-DNK (19-20 kb) i T_R-DNK (8-20 kb), koje su razdvojene intergenskim regionom od 16-18 kb (White i sar., 1985). Analizom kompletnog T_L-DNK dela identifikovana su četiri genska lokusa odgovorna za formiranje transformisanih korenova: *rolA*, *B*, *C*, i *D* (Taylor i sar., 1985). Biohemijske funkcije *rol* gena T_L-DNK nisu u potpunosti razjašnjene, a literaturni podaci su kontradiktorni. Poznato je da je aktivnost *rol* gena sinergistička, a produkti ovih gena povećavaju sposobnost transformisanog tkiva da odgovori na auksine.

Gen *rolA* (ORF10) kodira polipeptid RolA koji je lokalizovan na plazmalemi, ali njegova funkcija nije poznata (Vilaine i sar., 1998). Transformisani korenovi duvana koji su sadržali isključivo *rolA* gen su brže rasli *in vitro* od netransformisanih korenova, ali sporije u odnosu na korenove transformisane intaktnom T_L-DNK (Vilaine i sar., 1987).

Gen *rolB* (ORF11) je jedini *rol* gen koji je bio sposoban da izazove neoplastičan rast korenova kod svih testiranih biljaka (Cardarelli i sar., 1987; Spena i sar., 1987; Capone i sar., 1989). *RolB* gen značajno povećava osetljivost transformisanih ćelija prema

auksinima (Maurel i sar.,1990). Estruch i saradnici (1991a, b) su pretpostavili da *rolB*, kao i *rolC*, kodira enzim β -glukozidazu koji može osloboditi IAA i citokinine iz neaktivnih konjugata, ali takve pretpostavke nisu potvrđene (Nilsson i sar.,1996a, b). Ključno otkriće za razumevanje uloge *rolB* je otkriće tirozin fosfotransferazne aktivnosti RolB proteina i njegove lokalizacije na plazmalemi (Filippini i sar., 1996), što ukazuje da ima funkciju u transdukciji signala.

Gen *rolC* (ORF12) ima rizogeni potencijal samo kod duvana, kao vrste koja je najpodložnija genetičkoj transformaciji, ali u manjoj meri nego *rolB* (Spena i sar., 1987). RolC protein je lokalizovan u citosolu, ali njegova funkcija još uvek nije poznata (Estruch i sar., 1991c, Oono i sar., 1991).

RolD (ORF15) je jedini *rol* gen čija je funkcija poznata, a kodira ornitin ciklodeaminazu, enzim koji pretvara ornitin u prolin (Trovato i sar., 2001). Pretpostavlja se da promena odnosa ornitina i prolina doprinosi održavanju rasta transformisanih korenova i bujnom cvetanju regeneranata.

Ostali ORF-ovi na T_L-DNK (ORF2-ORF9 i ORF13-ORF18) nisu u stanju da indukuju bilo koji vid morfogeneze (rizogenezu ili kaulogenezu) ili pojavu kalusa na diskovima listova duvana, čak ni kad su pod kontrolom jakog konstitutivnog promotora kao što je 35SCaMV (Lemcke i Schmülling, 1998).

T_R-DNAsadrži onkogene značajne za produkciju auksina (*aux1* i *aux2*), agropina (*ags*) i manopina (*mas1* i *mas2*). *Aux1* i *aux2* geni su homologni *tms1(iaaM)* i *tms2(iaaH)* genima sa T-DNK Ti plazmida *A. tumefaciens* koji kodiraju enzime koji katalizuju dva uzastopna koraka na putu sinteze indol-3-sirćetne kiseline (IAA) (Huffman i sar., 1984; Jouanin, 1984). *Aux1* kodira triptofan monoooksigenazu, koja katalizuje reakciju nastanka indol-3-acetamida od triptofana, dok *aux2* kodira enzim indol-3-acetamid hidrolazu koja vodi do sinteze IAA od indol-3-acetamida (Schröder i sar., 1984). *Ags* gen kodira agropin sintazu koja katalizuje prevođenje manopina u agropin.

Transfer i integracija T_L-DNK i T_R-DNK segmenata u genom biljke domaćina su dva međusobno nezavisna procesa i do sada nije utvrđeno pravilo koje ih strogo određuje. Smatra se da je T_L-DNK esencijalna za neoplastičnu transformaciju. Tu tvrdnju potkrepljuje i činjenica da manopinski i kukumopinski sojevi poseduju samo jednu T-DNK, koja je homologa T_L-DNK agropinskog plazmida (Combard i Baucher, 1988). Takođe, transformisani korenovi indukovani infekcijom agropinskih sojeva *A. rhizogenes* vrlo često sadrže samo T_L-DNK (Jouanin i sar., 1987). Ima podataka da prisustvo T_R-DNK značajno povećava spektar domaćina (Ryder i sar., 1985; White i sar., 1985). To se može pripisati aktivnosti auksinskih gena sa T_R-DNK, jer obezbeđuju auksin neophodan za započinjanje diferencijacije transformisanih ćelija svuda gde endogeni nivo auksina nije dovoljan (Cardareli i sar., 1987). Moguće je da povećana sinteza auksina povećava aktivnost gena sa T_L-DNK, pošto je ekspresija ključnog gena (*rolB*) pozitivno regulisana auksinima.

Rol geni utiču na rastenje i razviće transformisanih korenova i indukuju sintezu sekundarnih metabolita aktivacijom gena koji su uključeni u odbrambene mehanizme biljne ćelije kroz još uvek nedovoljno poznate mehanizme (Meyer i sar., 2000; Bulgakov, 2008).

1.4.1.2. *In vitro* kultura transformisanih korenova i njihova primena

Izolovani transformisani korenovi se mogu održati na medijumu bez regulatora rastenja veliki broj subkultura, za razliku od kulture netransformisanih korenova koja opstaje samo kratko vreme bez dodatka egzogenih auksina. Iako se linije transformisanih korenova često razlikuju po svojoj morfologiji i intenzitetu rasta i grananja (Batra i sar., 2004; Taneja i sar., 2010; Mitić i sar., 2012), većina se karakteriše veoma intenzivnim prirastom biomase (Nikolić i sar., 2003).

Upravo zbog pomenutih osobina, *in vitro* kultura transformisanih korena poseduje jako široku lepezu primena kao što je:

- ❖ Proizvodnja industrijskih i farmaceutski važnih fitojedinjenja kao što su alkaloidi, terpenoidi i fenolna jedinjenja u bioreaktorima.

- ❖ Efikasna i ekonomski isplativa proizvodnja humanih antitela, citokina i drugih terapijskih proteina.
- ❖ Proučavanje biosintetičkih puteva sekundarnih metabolita primenom molekularnih, biohemijskih i genetičkih metoda kao i primena metaboličkog inženjeringa.
- ❖ Proučavanje fiziologije korena (fiksacije azota, deficijencije ili toksičnosti različitih jedinjenja i elemenata, interakcija između domaćina i patogena, alelopatskih interakcija itd.)
- ❖ Dobijanje novih fenotipova ornamentalnih biljaka (patuljastog rasta, kovrdžavih listova, izmenjenih cvetova) procesom regeneracije iz transformisanih korenova.
- ❖ Proučavanje fitoremedijacije toksičnih supstanci i reaktivnih boja (Ono i Tian, 2011).

1.4.1.3. Primena *in vitro* kulture transformisanih korenova u cilju proučavanja alelopatije i proizvodnje alelohemikalija

Glavna prepreka u dobijanju fitohemikalija iz netransformisanog biljnog tkiva je velika zavisnost njihove sinteze od sredinskih faktora, kao i činjenica da proces ekstrakcije najčešće podrazumeva uništenje same biljke. Kultura transformisanih korenova može biti dobra alternativa za produkciju sekundarnih metabolita s obzirom na genetičku uniformnost i značajni prinos biomase. Čest je slučaj da se kulture transformisanih korenova odlikuju intenzivnijom produkcijom metabolita nego kulture kalusa ili netransformisanih ćelija usled integracije i ekspresije agrobakterijskih *rol* gena (Bulgakov, 2008; Shkryl i sar., 2008). Ekspresija *rolA* gena u kalusu *Rubia cordifolia* je značajno uticala na povećanje (2,8 puta) produkcije antrakvinona (Shkryl i sar., 2007). Transformacija ćelija vrste *Vitis amurensis* *rolB* genom, kao najsnažnijim aktivatorom sekundarnog metabolizma, uvećalo je produkciju resveratrola više od 100 puta (Kiselev i sar., 2007). Pokazano je da je *RolC* gen sposoban da stimuliše proizvodnju tropanskih alkaloida (Bonhomme i sar., 2000), piridinskih alkaloida (Palazón i sar., 1998a), indolnih alkaloida (Palazón i sar., 1998b), ginsenzida (Bulgakov i sar., 1998) i antrakvinona (Bulgakov i sar., 2002). Zbog svih prednosti koje pružaju u odnosu na kulturu netransformisanih ćelija, kalusa ili korenova, kulture transformisanih korenova su se pokazale pogodnim za produkciju jedinjenja od

značaja u farmaceutskoj industriji (Uozumi, 2004; McCoy i O'Connor, 2008), među kojima i jedinjenja koja imaju alelopatsko delovanje. Tako je npr. koncentracija fenolnih jedinjenja: kafeinske, hlorogene, ferulinske i galne kiseline, katehina, izokatehina, kvercetina i rutina u transformisanim korenovima heljde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) (Kim i sar., 2009), biljke poznate po svojim lekovitim svojstvima, bila nekoliko puta veća nego u netransformisanim korenovima ove vrste. To je učinilo *in vitro* kulturu ovih korenova značajnim alternativnim sistemom za proizvodnju fenolnih jedinjenja od kojih neka imaju već poznato alelopatsko delovanje (Chou i Leu, 1992, Batis i sar., 2008b).

Hranljive podloge u kojima se uzgajaju transformisani korenovi u *in vitro* kulturi često sadrže jedinjenja koje korenovi eksuduju, a koja mogu ispoljavati alelopatski potencijal. Aseptičnost ovih podloga omogućava sakupljanje eksudovanih jedinjenja u neizmenjenom obliku, što omogućava ispitivanje njihovog izvornog alelopatskog delovanja u *in vitro* esejima. Tako je kultura transformisanih korenova vrste *C. murale*, koja je dobijena genetičkom transformacijom pomoću *A. rhizogenes* A4M70GUS, pokazala primenljivost u proučavanju alelopatskog potencijala ove korovske biljke (Mitić i sar., 2012), kao i u razotkrivanju mehanizama dejstva alelohemikalija sadržanih u eksudatu transformisanih korenova (Dmitrović i sar., 2015, Mitić i sar., 2015, 2018). Takođe, *in vitro* kulture transformisanih korenova vrsta *Artemisia dubia* i *A. indica* su omogućile prikupljanje sekundarnih metabolita ovih vrsta za koje se pokazalo da ispoljavaju značajno alelopatsko delovanje na semena rotkvice (Mannan i sar., 2007). Dodatno, jednak nivo alelopatskog poliacetilena koji je utvrđen u kulturi transformisanih korenova zlatnice (*Solidago altissima*) i u netransformisanim korenovima ove vrste, je bio dobra polazna tačka za ispitivanje alelopatskog delovanja ovog jedinjenja (Inoguchi i sar., 2003).

Prikupljanje saznanja o biosintetičkim putevima različitih sekundarnih metabolita u biljkama (Nesi, 2001; Floss i Walter, 2009; Kajikawa i sar., 2009; Terrier, 2009), kao i molekularnih tehnika za manipulaciju genskom ekspresijom, otvara mogućnosti za metabolički inženjering i povećanje dinamike sinteze fitohemikalija od značaja. Povećanje ekspresije ciljnih gena u metaboličkim putevima od interesa korišćenjem metoda genetičke transformacije pomoću *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* vektora bi omogućilo kreiranje

transformisanih biljaka ili korenova iz kojih bi mogle biti regenerisane transformisane biljke, a koje bi proizvodile povećanu količinu jedinjenja sa alelopatskim efektom. U tom smislu, upotrebom genetičke transformacije bi se obezbedila prednost takvim poljoprivrednim kulturama u odnosu na korovske biljke u veštačkim životnim staništima, što bi omogućilo povećanje prinosa i smanjenu potrebu za primenom sintetičkih herbicida.

1.4.1.4. Genetička transformacija jabuke pomoću *A. rhizogenes* vektora

Genetička transformacija vrsta roda *Malus* pomoću *A. rhizogenes* vektora je veoma retko sprovedena i to prvenstveno sa ciljem poboljšanog ožiljavanja izdanaka (Patena i sar., 1987; Rugini i Mariotti, 1990) ili regeneracije biljaka iz transformisanih korenova koje bi bile izmenjenih karakteristika u smislu bolje razvijenog korenovog sistema i patuljastog rasta kao tipičnih fenotipskih karakteristika koje se razvijaju pod uticajem *rol* gena. Biljke regenerisane iz transformisanih korenova vrste *M. prunifolia* dobijene transformacijom *A. rhizogenes* sojeva MAFF-02-10265, MAFF-02-10266, MAFF-03-01724 i MAFF-03-11725, karakterisale su se gubitkom apikalne dominacije, intenzivnijim granjanjem, skraćenim internodijama, patuljastim rastom i dobro razvijenim korenovim sistemom sa velikim brojem lateralnih korenova (Yamashita i sar., 2004). Regenerisane biljke sličnih karakteristika dobijene su iz transformisanih korenova vrste *M. baccata*, indukovanih genetičkom transformacijom pomoću soja *A. rhizogenes* 8196 (Wu i sar., 2012), kao i sorte za kalemljenje Jork 9 pomoću sojeva 8196, A4 i 15834 (Pawlicki-Jullian i sar., 2002). Korenovi dobijeni transformacijom podloga za kalemljenje *M. pumila* M9 i M26 pomoću soja *A. rhizogenes* A4 su korišćeni za histološku karakterizaciju i utvrđivanje hormonalnog statusa korenova (Lambert i sar., 1998; Sutter i Luza, 1993). Genetička transformacija gajenih sorti jabuke *A. rhizogenes* vektorom primenjena je isključivo u cilju poboljšanja ožiljavanja kod sorti Gala i McIntosh (Damiano i Monticelli, 1998).

Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, do sada nisu zabeleženi uspešni pokušaji izolacije transformisanih korenova kod vrsta roda *Malus*, niti njihove nezavisne propagacije i uspostavljanje permanentne *in vitro* kulture.

1.4.2. Regeneracija jabuke u kulturi *in vitro* - organogeneza *de novo*

Efikasan proces regeneracije biljnih tkiva i organa u kulturi *in vitro* je neophodan preduslov za primenu različitih biotehnoloških postupaka, između kojih i genetičke transformacije biljaka pomoću *Agrobacterium* vektora. S obzirom na značajan uticaj genotipa na regeneraciju jabuke iz somatskih tkiva, kao i njegove interakcije sa drugim faktorima kao što su karakteristike početnog eksplantata (veličina, tip, starost, orijentacija) i uslovi u kulturi *in vitro* (trajanje, kvalitet i intenzitet osvetljenja, vrsta i kombinacija regulatora rasteinja itd.), protokol za efikasnu regeneraciju mora biti posebno optimizovan u skladu sa osobenostima svake sorte.

Nasuprot procesu somatske embriogeneze, koji je veoma malo korišćen u protokolima za regeneraciju jabuke *in vitro* (Paul i sar., 1994; Daigny i sar., 1996), *de novo* organogeneza predstavlja najviše zastupljen put regeneracije izdanaka različitih sorti jabuke, kao i podloga za njihovo kalemljenje. *De novo* organogeneza je proces koji obuhvata formiranje biljnih organa - izdanaka ili korenova iz različitih delova biljke, odnosno eksplantata koji ne sadrže primordije tih organa (Thorpe, 1980). Tako je organogeneza izdanaka jabuke i podloga za kalemljenje uspešno postignuta korišćenjem različitih biljnih delova kao početnih eksplantata, i to protoplasta (Doughty i Power, 1988; Patat-Ochatt i sar., 1988; Wallin i Johansson, 1990; Perales i Schieder, 1993; Patat-Ochatt i sar., 1993; Pan i Deng, 2000), kotiledona (Liu i sar., 1983; Barbieri i Morini, 1987; Keulemans i De Witte, 1994), korenova (Masuda i sar., 1988), internodija (Liu i sar., 1998; Belaizi i sar., 1991), vrhova izdanaka (Lane, 1978; Caboni i sar., 2000; D'Angeli i sar., 2001) i listova ili njihovih odsečaka kao najčešće korišćenog tipa eksplantata za regeneraciju jabuke *in vitro* (Sriskandarajah i sar., 1990; Yepes i Aldwinckle, 1994; Gercheva i sar., 2000; Montecelli i sar., 2000; Qin i sar., 2002; McAdam-O Connell i sar., 2004; Ou i sar., 2008). Proces regeneracije izdanaka jabuke je postignut sa različitom efikasnošću koja je varirala od nekoliko desetina do čak 100% kod nekih sorti (Korban i sar., 1992; Dobránszki i sar., 2002; Qin i sar., 2002). Različita biljna tkiva od kojih se formiraju novi organi procesom organogeneze nemaju unapred formirane meristeme i većina njihovih ćelija se može smatrati totipotentnim. Velike razlike u učestalosti

regeneracije putem organogeneze među sortama jabuke ili tipovima eksplantata, upravo zavise od udela totipotentnih ćelija koje su sposobne da odgovore na stimuluse kojima bivaju izložene u kulturi *in vitro* (Magyar-Tábori i sar., 2010).

Meristemi mogu nastati od totipotentnih ćelija na dva načina: direktnim i indirektnim putem. Kod direktne organogeneze na eksplantatima uzetih sa matične biljke formiraju se začeci pupoljaka ili korenova tako što se ćelije trajnih tkiva eksplantata dediferenciraju i organizuju kao apikalni meristemi. Kod indirektno organogeneze na eksplantatima najpre dolazi do dediferencijacije i proliferacije ćelija čime nastaje kalus, na kome se obrazuju meristemski centri (meristemoidi) koji će se organizovati u apikalne meristeme (Yancheva i sar., 2003; Gahan i George, 2008). Pawlicki i Welander (1994) su pojavu direktne organogeneze kod jabuke primetili kod odsečaka listova kao eksplantata podloge za kalemljenje Jork9 na kojima su se javile intenzivne deobe ćelija u mezofilu i epidermisu listova već nakon trećeg, a adventivne primordije pupoljaka nakon 10 dana gajenja na indukcionoj podlozi. Takođe, formiranje izdanaka procesom direktne organogeneze je primećen i kod regeneracije sa internodalnih segmenata kod sorte Zlatni Delišeš (Belaizi i sar., 1991). Izdanci sorte Gala regenerisani su putem indirektno organogeneze (Dufour, 1990), dok su oba regenerativna puta bila prisutna kod sorte Greensleaves. Kod nje se intenzivna direktna regeneracija (bez kalusne faze) javila u toku druge nedelje gajenja, a dosta sporije regeneracija posredovana formiranjem kalusnog tkiva tokom 12 nedelja (James i sar., 1988).

Regeneracija izdanaka sorte Zlatni Delišeš procesom organogeneze *de novo* je opisana od strane većeg broja autora (Liu i sar., 1983; Theiler-Hedtrich i Theiler-Hedtrich, 1990; Belaizi i sar., 1991; Korban i sar., 1992; Yepes i Aldwinckle, 1994; Graph i Wricke, 1998; Rugini i Muganu, 1998; Viršček-Marn i sar., 1999) upravo zbog velikog ekonomskog značaja ove stare američke sorte, odličnih karakteristika ploda i širokog areala rasprostranjenja. Međutim, i pored velikog broja protokola za *in vitro* regeneraciju ove sorte, Zlatni Delišeš se i dalje može smatrati sortom umerenog regenerativnog potencijala što nameće potrebu za dodatnim naporima u cilju optimizacije postojećih protokola i povećanja učestalosti regeneracije izdanaka kod ovog izuzetno značajnog genotipa.

Dostupni literaturni podaci ukazuju da do sada nije bilo pokušaja da se razvije protokol za *in vitro* regeneraciju sorte Melrouz, uprkos njenoj velikoj zastupljenosti na tržištu i dobrom kvalitetu ploda. Takođe, *in vitro* regeneracija izdanaka sorti Gloster (Keulemans i De Witte, 1994; Szankowski i sar., 2000) i Čadel (Gercheva i sar., 2007) je veoma malo proučavana.

2. CILJ RADA

Naučni cilj ove doktorske disertacije je bio utvrđivanje alelopatskog potencijala eksudata transformisanih korenova jabuke, sa posebnim osvrtom na alelopatsku ulogu sekundarnih metabolita floretina i florizina u kulturi *in vitro*.

Realizacija ovog cilja je ostvarena kroz nekoliko eksperimentalnih zadataka:

- ❖ Uspostavljanje efikasnog sistema za regeneraciju izdanaka iz odsečaka listova jabuke procesom *de novo* organogeneze i definisanje uslova za održavanje permanentne kulture izdanaka.
- ❖ Ispitivanje uticaja β -laktamskih antibiotika: cefotaksima, meropenema i timentima na proces regeneracije izdanaka jabuke.
- ❖ Genetička transformacija jabuke sa *Agrobacterium rhizogenes* 15834 radi uspostavljanja permanentne kulture transformisanih korenova kao pogodnog model sistema za proučavanje alelopatskog potencijala sekundarnih metabolita korenova jabuke u kulturi *in vitro*.
- ❖ Optimizacija uslova za gajenje i molekularna karakterizacija transformisanih korenova.
- ❖ Identifikacija i kvantifikacija potencijalnih alelohemikalija u transformisanim korenovima i hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni.
- ❖ Ispitivanje alelopatskog potencijala eksudata transformisanih korenova jabuke, kao i čistih supstanci florizina i floretina, na rastenje i razviće klijanaca *Arabidopsis thaliana*.
- ❖ Praćenje nivoa ekspresije odabranih gena koji kodiraju proteine uključene u proces polarnog transporta auksina, biosinteze auksina i giberelina, kontrolu ćelijskog ciklusa (ciklina i kinaza zavisnih od ciklina), kao i gena za transkripcioni faktor WOX7 u izdancima i korenovima klijanaca *A. thaliana* tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom.
- ❖ Ispitivanje ultrastrukturnih promena u ćelijama klijanaca *A. thaliana* pod dejstvom floretina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Morfogeneza jabuke *in vitro*

3.1.1. Uspostavljanje aseptične kulture izdanaka jabuke

Aseptična kultura izdanaka jabuke uspostavljena je iz apeksa pazušnih pupoljaka. Lastari dužine oko 50 cm su sakupljeni tokom marta 2009. i 2010. godine odsecanjem sa jednogodišnjih grana 15 godina starih stabala jabuke (*Malus x domestica* Borkh.), sorti Melrouz, Zlatni Delišeš, Čadel i Gloster, koja su gajena u voćnjacima Instituta za voćarstvo Čačak, Srbija. Lastari sa dormantnim vegetativnim pupoljcima su držani u vodi, na temperaturi od 25 ± 2 °C tokom dve nedelje, dok se bočni pupoljci nisu razvili i dostigli dužinu od 0,8 do 1,5 cm. Pupoljci su izolovani sa lastara i ispirani 10 min u sterilnoj destilovanoj vodi u koju je dodato nekoliko kapi deterdženta (Fairy, Procter & Gamble Co). Nakon toga, pupoljci su potopljeni u 5% rastvor varikine (4% NaOCl, Panonija, Pančevo, Srbija) u trajanju od 20 min, a zatim isprani pet puta sterilnom dejonizovanom vodom. Vrhovi pupoljaka sa parom primordijalnih listova veličine 3 mm su isečeni i preneseni u staklene erlenmajere (100 mL) sa po 40 mL osnovne hranljive MS podloge (Murashige i Skoog, 1962) sa $5,0 \mu\text{M}$ 6-benzil-aminopurina (BA, Sigma, St. Louis, MO, SAD) i $0,5 \mu\text{M}$ 1-naftalen-sirćetne kiselina (NAA, Sigma). Osnovna hranljiva MS podloga je sadržala saharozu (30 g L^{-1}), mio-inozitol (100 mg L^{-1} ; Sigma), agar (7 g L^{-1} ; Institut Torlak, Beograd, Srbija), makro- i mikro-soli i kompleks gvožđa (Murashige i Skoog 1962, Tabela 2) i vitamine (Linsmaier i Skoog 1965, Tabela 3). Kiselost hranljive podloge podešena je na pH 5,8 pomoću 1N rastvora NaOH neposredno pre sterilizacije. Nakon četiri nedelje, izdanci su preneti u staklene teglice ($60 \times 110 \text{ mm}$, 250 mL) na MS podlogu sa $2,23 \mu\text{M}$ BA i $0,27 \mu\text{M}$ NAA, koja je u daljem tekstu označena kao podloga za umnožavanje izdanaka (eng. *Shoot Multiplication Medium*, SMM). Povremeno, kulture su nalivane sa po 5 mL tečne SMM podloge i prenošene na svežu čvrstu SMM podlogu svake četiri nedelje.

Tabela 2. Sastav mineralne podloge po Murashige i Skoog-u, 1962.

Makro soli	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro soli	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
KJ	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Kompleks gvožđa	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,20

Tabela 3. Sastav rastvora vitamina po Linsmaier i Skoog-u, 1965.

Vitamini	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
Vitamin B1	0,1
Vitamin B6	0,5
Nikotinska kiselina	0,5
Glicin	2,0

3.1.2. Sterilizacija hranljivih podloga i uslovi za gajenje kultura

Sve hranjive podloge i laboratorijski sudovi su sterilisani prema standardnim procedurama kulture biljaka *in vitro* u autoklavu (Raypa® AE75, Barselona, Španija) na temperaturi od 114 °C i pritisku od 80 kPa u trajanju od 25 minuta (Vinterhalter i

Vinterhalter, 1996). Instrumenti za rad su sterilisani visokom temperaturom na plameniku plinske boce. Rad sa biljnim materijalom vršen je u aseptičnim uslovima u laminarnoj komori (Termovent, Užice, Srbija). Sve kulture su gajene u prostoriji za gajenje kultura *in vitro* na temperaturi od 25 ± 2 °C i u uslovima dugog dana (16 h svetlost / 8 h mrak). Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe (Tesla, Pančevo, Srbija; 65W, 4500 K sa gustinom svetlosnog fluksa od 47 ± 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.1.3. *De novo* organogeneza

Za ispitivanje regeneracije izdanaka jabuke putem organogeneze *de novo* korišćeni su zdravi i potpuno razvijeni mladi listovi dužine 5 do 8 mm, koji su uzeti sa vršne trećine izdanka sorti Melrouz i Zlatni Delišeš gajenih četiri nedelje na SMM. Listovi su isečeni poprečno u odnosu na centralni nerv na tri segmenta koji su označeni kao proksimalni (1), središnji (2) i distalni (3). Segmenti su postavljeni svojom adaksijalnom (Ad) ili abaksijalnom (Ab) površinom na M1, M2 ili M3 podlogu za regeneraciju (eng. *Shoot Regeneration Medium*, SRM) u Petri kutijama (90 × 10 mm, 25 mL medijuma). Pomenute SRM podloge predstavljaju MS podlogu sa određenim regulatorima rasteња:

- ❖ Podloga **M1** je sadržala 3,0 μM tidiazurona (TDZ, Duchefa Biochemie, Haarlem, Holandija) i 5,0 μM NAA (Maheswaran i sar., 2007).
- ❖ Podloga **M2** je sadržala 22,0 μM TDZ i 1,5 μM indol-3-buterne kiseline (IBA, Sigma) (Seong i Song, 2008).
- ❖ Podlogu **M3** su sačinjavale dve podloge koje su sukcesivno primenjene: M3 podloga za indukciju kalusa sa 10,0 μM TDZ i 2,65 μM NAA i M3 podloga za indukciju izdanaka sa 1,0 μM NAA i 4,4 μM BA (Smolka i sar., 2009).

3.1.3.1. Uticaj svetlosnog režima kao predtretmana

Segmenti listova pomenutih sorti jabuke su postavljeni na M1, M2 i M3 podloge za regeneraciju i gajeni kontinuirano šest nedelja u uslovima dugog dana (16 h fotoperiod; 47 ± 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ili prve tri nedelje u mraku, a zatim tri nedelje u uslovima dugog dana.

Nakon šest nedelja kultivacije zabeležen je broj eksplantata koji su formirali kaluse i broj eksplantata sa regenerisanim izdancima. Svaki tretman (svetlost ili mrak) je postavljen u tri ponavljanja (Petri kutije) sa po 15 eksplantata položenih adaksijalnom i 15 eksplantata položenih abaksijalnom površinom na M1, M2 ili M3 podlogu. Eksperiment je ponovljen dva puta (n=90).

3.1.3.2. Uticaj agensa za učvršćivanje podloge

Segmenti listova pomenutih sorti jabuke su postavljeni na M1 i M2 podloge sa dodatkom 0,7% agara ili 0,25% fitagela (Sigma PhytigelTM Cat. No. P8169) i gajeni tri nedelje u mraku, a potom tri u uslovima dugog dana. Nakon šest nedelja kultivacije zabeležen je broj eksplantata sa regenerisanim izdancima. Svaki tretman je postavljen u dva ponavljanja (Petri kutije) sa po 15 eksplantata položenih adaksijalnom i 15 eksplantata položenih abaksijalnom površinom na M1 ili M2 podlogu. Eksperiment je ponovljen dva puta (n=60).

3.1.3.3. Uticaj genotipa (sorte), tipa i orijentacije eksplantata

Na osnovu rezultata dobijenih iz prethodnih eksperimenata definisani su neophodni uslovi za izvođenje ekperimenta u kome je ispitan uticaj genotipa (sorte), tipa eksplantata (položaj odsečka lista duž aksijalne ose) i orijentacije eksplantata (položaj odsečaka lista adaksijalnom ili abaksijalnom površinom prema podlozi).

Segmenti listova pomenutih sorti jabuke su postavljeni na M1 i M2 podloge sa dodatkom 0,7% agara i gajeni tri nedelje u mraku, a potom pet nedelja u uslovima dugog dana. Nakon šest nedelja od postavke ekperimenta, utvrđen je ukupan broj eksplantata sa *de novo* formiranim izdancima, a nakon osam nedelja ukupan broj regenerisanih izdanaka na svakom eksplantatu uz upotrebu svetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Jena, Nemačka). Svaki tretman je postavljen u dva ponavljanja (Petri kutije) sa po 15 eksplantata položenih adaksijalnom i 15 eksplantata položenih abaksijalnom površinom na M1 ili M2 podlogu. Eksperiment je ponovljen dva puta (n=60).

3.1.3.4. Uticaj β -laktamskih antibiotika

U cilju utvrđivanja efekta antibiotika na *de novo* regeneraciju izdanaka jabuke korišćeni su β -laktamski antibiotici: cefotaksim (Cef; Tolycar; Jugomedija AD, Zrenjanin, Srbija), meropenem (Mer; Merocid; PharmaSwiss, Belgrade, Srbija), timentin (Tim; ticarcillin disodium i kalijum klavulinat, 15:1; Duchefa Biochemie). Antibiotici su rastvoreni u dejonizovanoj vodi i sterilisani filter sterilizacijom ($\emptyset = 0,22 \mu\text{m}$, Merck Millipore), a zatim dodavani u rastućim koncentracijama: 100, 200, 300, 400, 500 i 600 mg L⁻¹ za cefotaksim i timentin; 25, 50, 75, 100, 125 i 150 mg L⁻¹ za meropenem u SRM podlogu nakon njenog autoklaviranja i hlađenja do 40°C.

Zdravi i potpuno razvijeni mladi listovi dužine 5 do 8 mm su uzeti sa vršne trećine izdanaka sorte Zlatni Delišes koji su gajeni dve nedelje na SMM podlozi, na način opisan u Poglavlju 3.1.3. i postavljeni abaksijalnom površinom na M2 podlogu sa dodatkom antibiotika. Kontrolni eksplantati su postavljeni na M2 podlogu bez antibiotika. Eksplantati su gajeni tri nedelje u mraku, a zatim dodatnih pet nedelja u uslovima dugog dana, nakon čega je utvrđen broj nekrotičnih eksplantata, broj eksplantata sa regenerisanim izdancima, kao i broj regenerisanih izdanaka na svakom eksplantatu uz upotrebu svetlosnog mikroskopa. Tretman sa cefotaksimom, meropenemom i timentinom je postavljen u pet ponavljanja (Petri kutija) sa po 12 eksplantata (n=60).

3.1.4. Umnožavanje izdanaka

Izdanci dužine 5 do 8 mm, regenerisani na odseccima listova jabuke gajenih na M1 ili M2 podlozi su izdvojeni sa eksplantata i preneti u staklene erlenmajere sa po 50 mL čvrste SMM podloge. Nakon šest nedelja, kada su izdanci dostigli visinu od 2 do 3 cm, utvrđen je broj novoformiranih izdanaka. Svaki tretman je postavljen u pet ponavljanja (erlenmajera) sa po pet eksplantata (n=25).

3.1.5. Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka u uslovima staklene bašte

Nakon umnožavanja, zdravi i jaki izdanci visine 2 do 3 cm su pojedinačno izdvojeni iz žbunića i preneti u staklene erlenmajere (100 mL) sa 50 mL MS podloge sa IBA ili NAA u koncentracijama od 2,5; 5 ili 10 μM u cilju formiranja adventivnih korenova. Kontrolni izdanci su preneti na MS podlogu bez regulatora rastenja. Svaki tretman je postavljen u dva ponavljanja (erlenmajera) sa po 10 izdanaka ($n=20$). Izdanci su gajeni pet dana u uslovima mraka, a zatim su bili preneti u uslove dugog dana. Nakon dva dana, izdanci su preneti na MS podlogu bez regulatora rastenja gde su gajeni narednih četiri do šest nedelja na svetlu, sve dok korenovi nisu dostigli dužinu od 3 do 7 cm. Ožiljeni izdanci su izvađeni iz podloge, a korenovi isprani pod mlazom tekuće vode kako bi se odstranili ostaci agara. Prebrojani su ožiljeni izdanci i zabeležen je broj korenova na svakom izdanku, a zatim i izmerena dužina najdužeg korena svakog izdanka.

Biljčice su zasađene u plastične saksije ($50 \times 14 \times 16$ cm) sa mešavinom zemlje i peska u razmeri 3:1 (v/v). Ovako zasađene biljke su gajene u staklenoj bašti pokrivene staklenim panelom radi očuvanja vlažnosti. Nakon dve nedelje, biljke su otkrivene i dalje gajene u uslovima staklene bašte u prisustvu 12 h dnevne svetlosti, na temperaturi od 27 °C tokom dana i 20 °C tokom noći, pri relativnoj vlažnosti vazduha od 70%. Biljke su po potrebi zalivane. Nakon dva meseca gajenja u staklenoj bašti utvrđen je broj aklimatizovanih biljaka.

3.1.6. Statistička obrada podataka koji se odnose na morfogenezu *in vitro*

Uticaj ispitivanih faktora (svetlosni režim kao predtretman, agens za učvršćivanje podloge, sorta, tip i orijentacija eksplantata, podloga za regeneraciju izdanaka, β -laktamski antibiotici) na regeneraciju izdanaka iz odsečaka listova jabuke je opisan nekom od sledećih veličina: učestalosti regeneracije, prosečnim brojem izdanaka po eksplantatu ili indeksom koji opisuje kapacitet za formiranje izdanaka (eng. *the index of Shoot-Forming Capacity*, SFC). Učestalost regeneracije je izračunata prema formuli: broj eksplantata koji daju najmanje jedan regenerisani izdanak / ukupan broj eksplantata \times 100. Prosečan broj

izdanaka po eksplantatu je izračunat kao ukupan broj regenerisanih izdanaka podeljen sa brojem eksplantata sa izdancima. SFC je izvedena veličina koja objedinjuje učestalost regeneracije i prosečan broj izdanaka po eksplantatu i izračunat je prema formuli: $SFC = (\text{prosečan broj izdanaka po eksplantatu}) \times (\text{učestalost regeneracije}) / 100$.

Učestalost ožiljavanja izdanaka je izračunata prema formuli: broj ožiljenih izdanaka / ukupan broj izdanaka $\times 100$. Prosečan broj korenova po izdanku je izračunat kao ukupan broj korenova podeljen sa brojem ožiljenih izdanaka.

Svi podaci izraženi u procentima su pre statističke obrade podvrgnuti angularnoj transformaciji ($\arcsin\sqrt{X}$), dok su podaci za broj izdanaka i korenova transformisani kvadratnim korenovanjem. Nakon analiza dobijeni rezultati su transformisani odgovarajućim inverznim funkcijama i kao takvi prikazani. SFC indeks je računat po Petri kutiji, a zatim su podaci podvrgnuti transformaciji kvadratnim korenovanjem. Za obradu podataka dobijenih iz eksperimenta u kojem je utvrđivan uticaj agensa za učvršćivanje podloge korišćena je multifaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) za svaku pojedinačnu sortu u kojoj su analizirani faktori bili: vrsta agensa za učvršćivanje podloge, podloga (M1 i M2) i orijentacija eksplantata (Ab i Ad), dok su u slučaju eksperimenta vezanih za *de novo* organogenezu to bili: podloga (M1 i M2), orijentacija eksplantata (Ab i Ad) i tip eksplantata (1, 2 i 3). Za obradu podataka dobijenih iz eksperimenta u kojem je utvrđivan uticaj β -laktamskih antibiotika na regeneraciju izdanaka jabuke korišćena je jednofaktorijalna ANOVA u kojoj je analizirani faktor bila koncentracija antibiotika. Prilikom obrade podataka dobijenih iz eksperimenta ožiljavanja korišćena je multifaktorijalna ANOVA u kojoj su analizirani faktori bili: sorta i podloga. Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćen je Fisherov LSD *post-hoc* test sa nivoom značajnosti od $p \leq 0,05$. Produženi efekat podloga M1 i M2 za regeneraciju izdanaka na umnožavanje izdanaka je procenjivan na osnovu prosečnog broja novoformiranih izdanaka koji su za svaku sortu poređeni *t*-testom za zavisne uzorke, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Numerički podaci su obrađeni primenom računarskog programa SAS Version 9.0 (SAS Institute, 2002. SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC.).

3.2. Genetička transformacija jabuke

3.2.1. Konstrukt *Agrobacterium rhizogenes* korišćen za genetičku transformaciju

Za genetičku transformaciju jabuke, korišćen je *A. rhizogenes* soj 15834 (Puthoff i Smigocki, 2007). U pitanju je agropinski soj koji sadrži binarni vektor pCAMBIA 1301, u okviru koga je integrisan gen za serinski proteinazni inhibitor (PI) BvSTI izolovan iz šećerne repe *Beta vulgaris* L. BvSTI gen se nalazi pod kontrolom konstitutivnog promotora CaMV 35S iz mozaičnog virusa duvana (eng. *Cauliflower Mosaic Virus*). *A. rhizogenes* je gajen na standardnoj čvrstoj YEB podlozi za gajenje bakterija (Vervliet i sar., 1975), čiji sastav je prikazan u Tabeli 4, uz dodatak 50 mg L⁻¹ kanamicina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka). Petri kutije sa bakterijskim kolonijama su čuvane u mraku na temperaturi od 4°C i presejavane na svežu sterilnu podlogu svakih mesec dana.

Tabela 4. Sastav čvrste YEB podloge za gajenje bakterija.

Komponenta	Količina (g L ⁻¹ podloge)
Mesni ekstrakt (Torlak)	5,0
Ekstrakt kvasca (Torlak)	1,0
Pepton (Torlak)	5,0
Saharoza	5,0
Agar (Torlak)	15,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika)	0,5
pH 7,2	

3.2.2. Inokulacija bakterija i uspostavljanje *in vitro* kultura potencijalno transformisanih korenova jabuke

Za inokulaciju biljnog materijala korišćene su bakterijske suspenzije dobijene resuspendovanjem jedne pune eze (Ø 3 mm) bakterija u 5 mL sterilne tečne YEB podloge sa 50 mg L⁻¹ kanamicina u staklenim epruvetama od 30 mL (18 × 150 mm). Bakterije resuspendovane u tečnoj podlozi su gajene na orbitalnom šejkeru (95 rpm), u mraku, na temperaturi od 25±2 °C. Nakon 24 h inkubacije, optička gustina bakterijskih suspenzija je

izmerena na talasnoj dužini od 600 nm pomoću spektrofotometra (Agilent 8453, Santa Clara, CA, USA) i iznosila je $OD_{600} \approx 1,00$. Bakterijske suspenzije navedene optičke gustine su korišćene za inokulaciju biljnog materijala.

Izdanci jabuke sorti Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster, dužine 2 do 3 cm, su izdvajani iz žbunića *in vitro* gajenih kultura izdanaka starih tri nedelje, a potom inokulisani pripremljenom bakterijskom suspenzijom *A. rhizogenes* na jedan od dva načina:

1. Ozleđivanjem stabljike izdanka sterilnom iglom prethodno zaronjenom u bakterijsku suspenziju, na udaljenosti od 1,5 cm od mesta preseka izdanka.

2. Uranjanjem mesta preseka izdanka u bakterijsku suspenziju u trajanju od nekoliko sekundi.

Inokulisani izdanci su pojedinačno kultivisani u staklenim epruvetama od 30 mL sa čvrstom MS podlogom bez regulatora rastenja i gajeni u uslovima dugog dana i temperaturi 25 ± 2 °C u sobi za gajenje *in vitro* kultura. Kontrolu su činili izdanci koji su tretirani na isti način kao i inokulisani izdanci, ali je umesto bakterijske suspenzije korišćena sterilna tečna YEB podloga. Ozleđivanjem stabljike inokulisani su izdanci sorte Melrouz (94), Zlatni Delišes (36), Čadel (34) i Gloster (31), a uranjanjem mesta preseka izdanka u bakterijsku suspenziju inokulisano je 28 izdanaka sorte Zlatni Delišes i po 30 izdanaka preostalih sorti. Nakon tri dana kokultivacije, izdanci su preneti na MS podlogu bez regulatora rastenja sa dodatkom antibiotika cefotaksima (Tolycar®, cefotaksim - Na, Jugomedija AD, Zrenjanin, Srbija) u koncentraciji od 500 mg L^{-1} radi eliminacije bakterija. Sedam nedelja nakon inokulacije bakterija, utvrđen je broj izdanaka na kojima su se pojavili potencijalno transformisani (PT) korenovi, kao i broj PT korenova formiranih na svakom izdanku. Efikasnost transformacije je izračunata prema formuli: (ukupan broj linija PT korenova / broj inokulisanih izdanaka) $\times 100$. Svi formirani PT korenovi sorti Zlatni Delišes (12), Čadel (9) i Gloster (3) kao i 12 izabranih korenova sorte Melrouz su odvojeni od izdanaka i gajeni kao individualne linije u staklenim erlenmajerima (100 mL) koji su sadržali 50 mL sterilne tečne MS podloge sa dodatkom 300 mg L^{-1} cefotaksima. Kulture korenova su

prenošene na svežu podlogu svake tri nedelje. Koncentracija cefotaksima u podlozi je postepeno smanjivana i nakon četiri meseca ovaj antibiotik je potpuno izostavljen iz podloge. Nakon prikupljanja i analize rezultata ekperimenta u kome je testiran efekat hranljivih podloga različitog mineralnog sastava na rast transformisanih korenova linije ZD12 (Poglavlje 3.2.5.1.), sve linije su nadalje kultivisane u tečnoj ½MS podlozi koja se pokazala kao najoptimalnija. Kulture korenova su gajene u prostoriji za gajenje biljnih kultura *in vitro* na orbitalnom šejkeru (95 rpm), pri flurescentnom osvetljenju ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16-h fotoperiod) i temperaturi od $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3. Uspostavljanje kulture netransformisanih (kontrolnih) korenova jabuke

S obzirom da izdanci jabuke tretirani YEB podlogom koja nije sadržala agrobakterije nisu formirali korenove, netransformisani (kontrolni) korenovi jabuke, koji su bili neophodni za dalju molekularnu i hemijsku analizu, su dobijeni *in vitro* ožiljavanjem izdanaka prema prethodno ustanovljenom protokolu (Poglavlje 3.1.3.). Ukratko, mladi izdanci jabuke sorti Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster, dužine 3 do 4 cm, su izdvajani iz *in vitro* kultura starih tri nedelje i preneti na podlogu za ožiljavanje koju je činila MS podloga sa dodatkom IBA u koncentraciji od $2,5 \mu\text{M}$ za sorte Zlatni Delišes i Čadel, odnosno $10 \mu\text{M}$ za sorte Melrouz i Gloster. Izdanci su inicijalno gajeni u mraku u trajanju od pet dana, naredna dva dana na svetlu, a zatim su preneti na MS podlogu bez regulatora rastenja, gde su gajeni narednih šest nedelja do pojave korenova dužine približno 3-7 cm. Korenovi su odvojeni sa izdanaka i dalje gajeni u tečnoj MS podlozi bez regulatora rastenja ili sa $2,5 \mu\text{M}$ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) IBA, na orbitalnom šejkeru pod istim uslovima kao i transformisani korenovi.

3.2.4. Molekularna karakterizacija potencijalno transformisanih korenova jabuke

Ekspresija gena poreklom sa T_L - (*rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*) i T_R - (*auxI* i *aux2*) regiona Ri plazmida kod različitih linija potencijalno transformisanih korenova jabuke praćena je pomoću RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) metode.

3.2.4.1. Izolacija ukupne RNK

Ukupna RNK je izolovana iz 28 linija potencijalno transformisanih korenova sorti Melrouz (7), Zlatni Delišeš (12), Čadel (6), Gloster (3) i netransformisanih korenova jabuke (kontrola) po modifikovanom protokolu koji su originalno razvili Gašić i saradnici (2004). Približno 300 mg tkiva je uzeto iz tečnih kultura korenova u aseptičnim uslovima i trenutno zamrznuto u tečnom azotu. Zamrznuto tkivo je zatim samleveno u tečnom azotu, u avanima prethodno tretiranim sa 3% (v/v) rastvorom vodonik peroksida i sterilisanim u autoklavu 25 min na 114 °C. U samlevene uzorke je dodato po 650 µL ekstrakcionog pufera (Tabela 5) i 15 µL β-merkaptioetanol. Nakon vorteksovanja, uzorci su inkubirani 15 min u vodenom kupatilu na 60 °C. U svaki uzorak je dodato po 650 µL smeše hloroform : izoamil alkohol (24:1, v:v) i nakon vorteksovanja u trajanju od dvadesetak sekundi uzorci su centrifugirani 10 min na 10 000 g na +4°C. Supernatant koji se odvojio u vidu gornje, bezbojne faze, prenet je u nove ependorf tubice. Postupak ekstrakcije dodavanjem smeše hloroform : izoamilalkohol je ponovljen još jednom. Nakon ponovnog centrifugiranja uzoraka, približno 500 µL supernatanta je preneto u nove ependorf tubice u koje je potom dodato po 166 µL 7,5 M LiCl. Sadržaj tubica je izmešan laganim okretanjem i inkubiran na +4 °C preko noći. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani 45 min na 12 000 g na +4 °C. Supernatant je odliven, a talog ispran dodavanjem 1 mL hladnog 70% etanola, a zatim je postupak centrifugiranja i odlivanja supernatanta ponovljen. Nakon sušenja uzoraka u laminarnoj komori u trajanju od 5 min, talog je rastvoren dodavanjem 100 µL 0,1% dietil pirokarbonata (DEPC) (Sigma) uz dodatak 10 µL 3M Na-acetata (pH 5,5) i 275 µL 70% etanola. Uzorci su inkubirani 2 h na -80 °C, a zatim centrifugirani 45 min na 12 000 g na +4 °C. Nakon odlivanja supernatanta, talog je ispran dodavanjem 1 mL 70% etanola, a zatim ponovo centrifugiran na opisani način. Supernatant je ponovo odliven, a talog osušen u laminarnoj komori u trajanju od 15 min i zatim resuspendovan dodavanjem 50 µL 0,1% DEPC. Uzorci su čuvani na -80 °C do dalje analize.

Tabela 5. Sastav pufera za ekstrakciju RNK (Gašić i sar., 2004).

CTAB ekstrakcioni pufer	Finalne koncentracije
Heksadecitrimetil-amonium bromid (CTAB) (ICN Biomedicals Inc. Ohio, SAD)	2% (w/v)
Solubilni polivilnilpolipirolidon (PVP) (Duchefa Biochemie)	2% (w/v)
Hidroksimetil aminometan (TRIS) - HCl (pH 8.0) (Serva, Heidelberg, Nemačka)	100 mM
Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) (Serva)	25 mM
NaCl (Lach-Ner)	2 M
Spermidin (Duchefa Biochemie)	0,5 g L ⁻¹
H ₂ O (DEPC pretretirana)	-

3.2.4.2. Provera kvaliteta i kvantifikacija izolovane RNK

Za proveru kvaliteta i merenje kvantiteta izolata dobijene RNK korišćen je spektrofotometrijski uređaj Agilent 8453. Koncentracija ukupnih izolovanih RNK je određena merenjem apsorbance na 260 nm i izračunata prema formuli:

$$C (\mu\text{g mL}^{-1}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g mL}^{-1} \times 100$$

A_{260} - apsorbance RNK na 260 nm

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

100 - faktor razblaženja

Kvalitet izolovanih RNK je procenjena na osnovu odnosa A_{260}/A_{280} koji se za čiste izolate RNK kreće u intervalu od 1,8 do 2,2.

Integritet RNK je procenjen elektroforetskim razdvajanjem 1 μg izolovanih RNK na 1,2% (w/v) TBE agaroznom gelu (Tabela 6) sa 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ etidijum-bromida pri konstantnom naponu od 70 V prema standardnoj proceduri Sambrook i saradnika (1989). Elektroforeza RNK se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu BlueMarine 100

(Serva), a vizuelizacija RNK traka je izvršena posmatranjem pod UV svetlom na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA, SAD). Nakon određivanja koncentracije i provere kvaliteta RNK izolati su čuvani na -80 °C do trenutka daljeg korišćenja.

Tabela 6. Sastav 1 x TBE pufera za elektroforezu RNK.

Komponenta	Količina (za 1L TBE pufera)
TRIS (Serva)	10,8 g
Borna kiselina (Duchefa Biochemie)	5,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0) (Serva)	4,0 mL
Etidijum-bromid (Valeant Pharmaceuticals, Montreal, Kanada)	0,5 mg

3.2.4.3. Prečišćavanje uzoraka RNK od DNK kontaminacije

Izolovana RNK je tretirana DNK-azom (DNase I, Thermo Scientific, Waltham, SAD) u trajanju od 30 min na 37 °C (Tabela 7) radi eliminacije eventualno zaostale genomske DNK. Stopiranje DNK-aze je izvršeno dodavanjem 1 µL EDTA (Thermo Scientific) u svaki izolat i inkubiranjem 10 min na 65 °C.

Tabela 7. Sastav reakcione smeše za eliminaciju DNK u uzorcima RNK.

Komponenta reakcione smeše	Po reakciji (10µl)	Finalna koncentracija
10 x DNase I pufer	1 µL	-
DNase I (1 U µL ⁻¹)	1 µL	0,1 U µL ⁻¹
RNase inhibitor (40 U µL ⁻¹)	0,25 µL	1 U µL ⁻¹
RNK (1 µg)	max 6,75 µL	-
H ₂ O	do 10 µL	-

3.2.4.4. Reverzna transkripcija (RT)

Prevođenje RNK molekula u komplementarne DNK (cDNK) izvršeno je pomoću RevertAidTM RT Reverse Transcription Kit-a (Thermo Scientific), u reakcionoj smeši

zapremine 20 μL , čiji sastav je prikazan u Tabeli 8. U svaku RT reakciju je uneto 400 ng ukupne RNK. Reakcija reverzne transkripcija odvijala se u tri koraka: 25 °C (10 min), 42 °C (60 min) i zatim 72 °C (10 min) u PCR mašini Eppendorf Mastercycler nexus gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka). Dobijena cDNK čuvana je do upotrebe na temperaturi od - 20 °C.

Tabela 8. Sastav reakcione smeše za reverznu transkripciju.

Komponenta reakcione smeše	Po reakciji (20 μl)	Finalna koncentracija
5 x RT pufer	4 μL	-
dNTP (10 mM)	2 μL	1 mM
Nasumični heksameri (100 μM)	1 μL	5 mM
RNase inhibitor (40 U μL^{-1})	0.5 μL	1 U μL^{-1}
Reverzna transkriptaza (200 U μL^{-1})	1 μL	10 U μL^{-1}
RNK (0,1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	4 μL	0,02 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
H ₂ O	7,5 μL	-

3.2.4.5. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)

Dobijeni cDNK molekuli su korišćeni za umnožavanje odgovarajućih genskih sekvenci pomoću gen-specifičnih prajmera u reakciji lančanog umnožavanja (eng. *Polymerase Chain Reaction*; PCR). Sekvence prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju gena sa T_L- (*rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*) i T_R- (*aux1* i *aux2*) regiona T-DNK Ri plazmida su preuzete iz radova Mitić i saradnici (2012) i Komarovskaa i saradnici (2010), redom i prikazane u Tabeli 9. Radi provere odsustva kontaminacije uzoraka sa bakterijskom DNK, dobijena cDNK je prvo amplifikovana korišćenjem prajmera koji su specifični za bakterijski gen *virDI* (Mitić i sar., 2012) (Tabela 9) koji se nalazi na Ri plazmidu van granica T-DNK. Kao referentni gen korišćen je aktin jabuke (*MdAktin*), a prajmeri za *MdAktin* (Tabela 9) su konstruisani na osnovu sekvence AB638619.1 objavljene u GenBank™ bazi podataka korišćenjem programa NCBI/ Primer-BLAST.

Tabela 9. Sekvence prajmera korišćenih u PCR reakcijama.

Gen	Sekvenca prajmera (5'→3')	Veličina produkta amplifikacije (bp)
<i>rolA</i>	F: GTT-AGG-CGT-GCA-AAG-GCC-AAG R: TGC-GTA-TTA-ATC-CCG-TAG-GTC	203
<i>rolB</i>	F: AAA-GTC-TGC-TAT-CAT-CCT-CCT-ATG R: AAA-GAA-GGT-GCA-AGC-TAC-CTC-TCT	348
<i>rolC</i>	F: TAC-GTC-GAC-TGC-CCG-ACG-ATG-ATG R: AAA-CTT-GCA-CTC-GCC-ATG-CCT-CAC	342
<i>rolD</i>	F: CCT-TAC-GAA-TTC-TCT-TAG-CGG-CAC-C R: GAG-GTA-CAC-TGG-ACT-GAA-TCT-GCA-C	477
<i>aux1</i>	F: CAT-AGG-ATC-GCC-TCA-CAG-GT R: CGT-TGC-TTG-ATG-TCA-GGA-GA	198
<i>aux2</i>	F: AAC-GAT-AAT-AGC-CCG-CTG-TG R: CGT-CTT-GGG-TTT-GTG-GTT-CT	217
<i>virD1</i>	F: ATG-TCG-CAA-GGC-AGT-AAG R: CAA-GGA-GTC-TTT-CAG-CAT-G	441
<i>MdAktin</i>	F: ATT-GGA-ATG-GAA-GCT-GCT-GG R: CAA-TGG-ATG-GAC-CTG-ACT-CG	310

Sve PCR reakcije zapremine 25 µl postavljene su korišćenjem AmpliTaq Gold[®] PCR Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, SAD) po recepturi datoj u Tabeli 10.

PCR reakcija se odvijala u mašini Mastercycler[®] nexus Gradient (Eppendorf AG) pod sledećim uslovima:

- ❖ Inicijalna denaturacija (95 °C / 5 min)
- ❖ 40 ciklusa:
 - ❖ Denaturacije (95 °C / 30 s),
 - ❖ Vezivanja prajmera (58 °C za *aux2* gen, 60 °C za ostale gene / 1 min),
 - ❖ Ekstenzije (72 °C / 1 min)
- ❖ Finalna ekstenzija (72 °C / 10 min).

Tabela 10. Sastav reakcione smeše za PCR.

Komponenta reakcione smeše	Po reakciji (25 µl)	Finalna koncentracija
10 x PCR pufer	1,5 µL	-
MgCl ₂ (25 mM)	0,75 µL	0,75 mM
dNTP (10 mM)	1 µL	400 µM
Forward (F) prajmer (5 µM)	1,25 µL	0,25 µM
Reverse (R) prajmer (5 µM)	1,25 µL	0,25 µM
Taq polimeraza (5 U µL ⁻¹)	0,25 µL	0,05 U µL ⁻¹
cDNK	1 µL	-
H ₂ O	18 µL	-

Za elektroforetsko razdvajanje i vizualizaciju amplifikovanih fragmenata korišćeni su TBE gelovi sa različitim procentom agaroze od 1,2 do 1,8% (w/v) u zavisnosti od dužine amplifikovanih fragmenata. Elektroforeza i vizualizacija produkata amplifikacije je vršena pod istim uslovima kao što je opisano u Poglavlju 3.2.4.2.

3.2.5. Optimizacija uslova za gajenje transformisanih korenova

3.2.5.1. Efekat hranljivih podloga različitog mineralnog sastava

U cilju povećanja prirasta biomase transformisanih korenova, ispitivan je uticaj hranljivih podloga različitog mineralnog sastava: MS (Murashige i Skoog, 1962), modifikovane WPM (eng. *Woody Plant Medium*) (Lloyd i McCown, 1980) i B5 (Gamborg i sar, 1968) podloge, kao i njihovih polu- razblaženih varijanti (½MS, ½WPM i ½B5) na rast transformisane linije korenova ZD12 (Tabele 2, 11 i 12).

Tabela 11. Sastav modifikovane WPM podloge (Lloyd i McCown, 1980).

Makro soli	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
NH ₄ NO ₃	400
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	556
K ₂ SO ₄	990
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	96
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro soli	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
KJ	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Kompleks gvožđa	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,20

Sve podloge su sadržale saharozu (30 g L⁻¹), mio-inozitol (100 mg L⁻¹) i vitamine (Linsmaier i Skoog, 1965; Tabela 3). Približno 500 mg sveže mase korenova je izdvojeno iz tri nedelje stare *in vitro* kulture linije ZD12 i gajeno u erlenmajerima (100 mL) sa po 50 mL tečne podloge. Kulture su gajene na orbitalnom šejkeru (95 rpm) u trajanju od šest nedelja. Nakon prve tri nedelje, kulture su prebačene na sveže mineralne podloge. Masa korenova je merena u laminarnoj komori na analitičkoj vagi (Chyo MK-200B) nakon uklanjanja viška tečne podloge ceđenjem korenova na filter papiru. Prirast mase korenova je izračunat na sledeći način:

$$\text{Prirast (\%)} = (\text{masa korenova nakon šest nedelja gajenja} - \text{početna masa korenova}) / \text{početna masa} \times 100$$

Eksperiment je ponavljen dva puta sa po tri biološka ponavljanja za svaku hranljivu podlogu (n=6). Podaci izraženi u procentima su pre statističke obrade podvrgnuti angularnoj transformaciji ($\arcsin\sqrt{X}$). Za obradu podataka je korišćena jednofaktorijalna ANOVA, a za utvrđivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćen je Fisherov LSD *post-hoc* test sa nivoom značajnosti od $p \leq 0,05$. Nakon analize dobijeni rezultati su transformisani odgovarajućom inverznom funkcijom i kao takvi prikazani.

Tabela 12. Sastav B5 podloge (Gamborg i sar., 1968).

Makro soli	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
KNO ₃	2528
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150
MgSO ₄ x 7H ₂ O	246
Mikro soli	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
H ₃ BO ₃	3,0
MnSO ₄ x H ₂ O	10,00
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2,00
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
KJ	0,75
Kompleks gvožđa	Koncentracija (mg L⁻¹ podloge)
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,20

3.2.5.2. Efekat egzogeno dodatih auksina

Približno 1 g sveže mase korenova je izdvojeno iz tri nedelje stare *in vitro* kulture linije ZD12 i gajeno u erlenmajerima (100 mL) sa po 50 mL tečne MS podloge sa dodatkom IBA ili NAA u rastućim koncentracijama (0,01; 0,02; 0,05; 0,1 ili 0,2 mg L⁻¹).

Kontrolu su predstavljali korenovi linije ZD12 gajeni u tečnoj MS podlozi bez dodatka auksina. Eksperimentalni dizajn, uslovi gajenja kultura i uzimanje uzoraka, kao i obrada rezultata su bili identični kao kod prethodno pomenutog eksperimenta (Poglavlje 3.2.5.1).

3.3. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u transformisanim korenovima linije ZD12 i u hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni

Analiza sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima kontrolnih netransformisanih korenova jabuke sorte Zlatni Delišes, transformisanih korenova linije ZD12 i tečne podloge u kojoj su gajeni, urađena je metodom tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom sa masenom spektrometrijom (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*; UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS).

3.3.1. Priprema uzoraka za fitohemijske analize

Korenovi linije ZD12 (4 g) i netransformisani korenovi (1 g) su izdvojeni iz kultura starih četiri nedelje i gajeni u erlenmajerima (100 mL) sa po 50 mL tečne $\frac{1}{2}$ MS podloge. Korenove linije ZD12 su gajeni bez regulatora rasteanja, dok su netransformisani korenovi gajeni u tečnoj podlozi sa 0,5 mg L⁻¹ IBA na orbitalnom šejkeru (95 rpm), na temperaturi od 25±2 °C i fluorescentnom osvetljenju (2 μmol m⁻² s⁻¹, 16-h fotoperiod). Svaki tretman je imao tri biološka ponavljanja. Nakon četiri nedelje, izmerena je zapremina tečnih podloga koje su zatim liofilizovane (LH Leybold, Lyovac GT2/045, Frenkendorf, Switzerland) i čuvane na -80 °C do dalje analize. Nakon uzorkovanja korenova i merenja njihove sveže mase (FW), korenovi su sušeni sedam dana na sobnoj temperaturi (23±2 °C), nakon čega je izmerena i njihova suva masa (DW). Osušeni biljni material je usitnjen u keramičkim avanima do finog praha. Po 500 mg praha korenova je ekstrahovano sa 30 mL 80% metanola u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 20 min. Ekstrakti su profiltrirani (Whatman No. 1) i potom upareni do suva na 50 °C u rotacionom vakuum uparivaču (Buchi R-210, Flawil, Švajcarska). Tako dobijeni ekstrakti su čuvani na temperaturi od +4 °C do dalje analize.

3.3.2. UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS analiza metanolnih ekstrakta

Metanolni ekstrakti su analizirani UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS metodom. Hromatografsko razdvajanje i identifikacija komponenti metanolnih ekstrakata transformisanih korenova i liofilizovanih podloga je urađena na Dionex Ultimate 3000 UHPLC aparatu (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka). Maseni spektri su snimani na masenom spektrometru TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific) sa elektron sprej jonizacijom. Za razdvajanje je korišćena kolona Hypersil gold C18 1,9 μm , 50 \times 2,1 mm (Thermo Fisher Scientific). Mobilna faza se sastojala od 0,02% (v/v) sirćetne kiseline (A) i acetonitrila (B), a uzorci su eluirani prema sledećem gradijentu: 5-20% B u prva 3 min, 20-40% B od 3 do 5 min, 40-50% B od 5 do 7,5 min, 50-60% B u periodu od 7,5 do 8,5 min, 60-95% B od 8,5 do 10,5 min, 95% B od 10,5 do 11,5 min, 95%-5% B od 11,5 do 12 min i na kraju 5% B do 15 min. Kolona je termostatirana na 30 °C, dok je injekciona zapremina bila 10 μL . Protok je podešen na 0,4 mL min^{-1} . Sve analize su urađene sa rastvaračima analitičke čistoće (Fisher Scientific UK, Leics, Velika Britanija). Obrada podataka je urađena na Chromeleon Xpress softveru (Thermo Fisher Scientific).

Temperatura jonske probe masenog spektrometra je bila podešena na 300 °C, a parametri HESI probe su bili: napon 4500 V, pritisak nosećeg gasa (N₂) 35 AU, pritisak gasa u jonskom izvoru 1,0 AU, pritisak auksilarnog gasa 10 AU, temperatura kapilare 275 °C, podešavanje jonskih sočiva 0 V. U eksperimentima fragmentacije, disocijacija molekula je indukovana kolizijom, pri čemu je koliziona energija bila podešena na 30 eV za sva analizirana fenolna jedinjenja. Kvantifikacija jedinjenja u uzorcima urađena je u eksperimentu monitoringa selektovane reakcije (eng. *Single Reaction Monitoring*, SRM).

Fenolna jedinjenja u uzorcima su identifikovana na osnovu MS i MS/MS spektara i retencionih vremena poređenjem sa komercijalnim standardima, kao i na osnovu dostupnih podataka iz literature. Za kvantifikaciju jedinjenja je korišćena metoda eksternog standarda. Osnovni rastvor za kalibraciju je pripremljen rastvaranjem 1 mg standarda u 1 mL metanola. Smeša standarda je pripremljena u koncentraciji od 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Razblaženja smeše standarda su pripremljena rastvaranjem u metanolu u opsegu koncentracija od 100

$\mu\text{g mL}^{-1}$ do $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$. Regresionom analizom je pokazano da su sve kalibracione krive imale linearnost sa koeficijentom korelacije između $r = 0,990$ i $0,999$; $p < 0,001$. Jedinjenja su kvantifikovana na osnovu površine pikova u SRM eksperimentu, korišćenjem kalibracionih kriva standarda. Koncentracije jedinjenja u korenovima su izražene u ng mg^{-1} DW korena, dok su koncentracije jedinjenja u tečnoj podlozi izražene na dva načina, u ng mL^{-1} tečne podloge i u ng mg^{-1} DW korena. Standardi hlorogene, kafeinske, siringinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline, florizina, floretina, rutina, izokvercitrina, kemferol-3-glukozida, kvercitrina, kvercetina i naringenina su komercijalno nabavljeni (Sigma-Aldrich).

Srednje vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja u netransformisanim (kontrolnim) korenovima i transformisanim korenovima linije ZD12 su poređene *t*-testom za zavisne uzorke, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

3.4. Efekat eksudata transformisanih korenova linije ZD12, florizina i floretina na klijanje, rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana*

3.4.1. Efekat eksudata transformisanih korenova

Približno 2 g sveže mase transformisanih korenova linije ZD12 je izdvojeno iz četiri nedelje stare *in vitro* kulture i prebačeno u staklene erlenmajere (100 mL) sa po 50 mL sterilne tečne $\frac{1}{2}$ MS podloge. Kulture su gajene na orbitalnom šejkeru (95 rpm) pri fluorescentnom osvetljenju ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16-h fotoperiod) i temperaturi od $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon četiri nedelje, podloga u kojoj su rasli korenovi (u daljem tekstu označeno kao eksudat korenova - EK) je odlivena i korišćena u daljim eksperimentima u cilju utvrđivanja potencijalnog alelopatskog efekata eksudata ovih korenova na klijanje, rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana*. Kao kontrola korišćena je sterilna tečna $\frac{1}{2}$ MS podloga.

Semena *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ekotip Columbia) su dobijena sa biljaka uzgojenih u stakleniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu ljubaznošću dr Slavice Dmitrović. Šest puta po približno 30 semena je površinski

sterilisano 60 s u rastvoru varikine (4% NaOCl, Panonija) i 70 % (v/v) etanola (odnos 1:1) u sterilnim Ependorf tubicama, a zatim isprano četiri puta sterilnom dejonizovanom vodom u trajanju od po 60 s. Nakon završenog ispiranja, višak vode je pažljivo izvučen pipetom, a semena su nalivena sa 1 mL sterilne tečne $\frac{1}{2}$ MS podloge i ostavljena u mraku na temperaturi od +4 °C u trajanju od tri dana. Nakon isteka perioda hladne stratifikacije, semena su prebačena u staklene erlenmajere (100 mL) sa 50 mL EK ili tečne $\frac{1}{2}$ MS podloge. Semena su gajena na orbitalnom šejkeru (95 rpm) u uslovima dugog dana i temperaturi od 25±2 °C. Petog i desetog dana od izlaganja semena uslovima dugog dana, izmereni su morfološki parametri klijanaca: dužina korena, broj lateralnih korenova i dužina izdanka. Svaki tretman je postavljen u tri ponavljanja (erlenmajera) sa po 30 semena. Eksperiment je ponovljen dva puta. Za merenje morfoloških parametara nasumično je uzimano po 10 klijanaca po ponavljanju (n=60) za svaki tretman.

3.4.2. Efekat dihidrohalkona florizina i floretina

Semena *A. thaliana* ekotip Columbia su površinski sterilisana kako je objašnjeno u Poglavlju 3.4. a zatim je vrhom sterilnog skalpela pod svetlosnim mikroskopom po 10 semena postavljeno u Petri kutije na površinu čvrste $\frac{1}{2}$ MS podloge (15 mL) sa dodatkom florizina (Sigma) ili floretina (Sigma) u rastućim koncentracijama: 125, 250 ili 500 μ M. Stok rastvori florizina i floretina su dobijeni rastvaranjem čistih suspcstanci u dimetil sulfoksidu (DMSO) (Duchefa Biochemie). Kontrolu su predstavljala semena postavljena na $\frac{1}{2}$ MS podlogu sa dodatkom DMSO (K DMSO). Za svaki tretman florizinom i floretinom je postavljena zasebna kontrola koja je sadržala istu količinu DMSO kao i odgovarajući tretman. Procenat DMSO (v:v) u kontrolama je iznosio: 0,06% za K DMSO_(FLZ 125 μ M), 0,12% za K DMSO_(FLZ 250 μ M), 0,24% za K DMSO_(FLZ 500 μ M), 0,035% za K DMSO_(FLT 125 μ M), 0,07% za K DMSO_(FLT 250 μ M) i 0,14% za K DMSO_(FLT 500 μ M). Petri kutije sa semenima su postavljene uspravno i inkubirane u mraku na temperaturi od +4 °C. Nakon tri dana, Petri kutije su izložene uslovima dugog dana takođe u uspravnom položaju. Svaki tretman je postavljen u tri ponavljanja (Petri kutije) sa po 10 semena u tri nezavisna eksperimenta (n=90). Desetog dana od izlaganja semena uslovima dugog dana izmereni su morfološki parametri klijanaca: dužina korena, broj lateralnih korenova i dužina izdanka.

3.4.3. Statistička analiza efekata eksudata transformisanih korenova jabuke, florizina i floretina na klijanje, rastenje i razvoj klijanaca *A. thaliana*

Podaci za broj lateralnih korenova su pre statističke obrade transformisani kvadratnim korenovanjem, a nakon analize rezultati su transformisani odgovarajućom inverznom funkcijom i kao takvi prikazani. Srednje vrednosti merenih parametara su poređene pomoću *t*-testa za zavisne uzorke sa nivoom značajnosti od $p \leq 0,05$. Statistički značajne razlike tretmana u odnosu na odgovarajuću kontrolnu vrednost označene su zvezdicom. Inhibitorni/stimulatorni efekat tretmana je za svaki parametar, izražen pomoću veličine označene kao procenat inhibicije/stimulacije i izračunat je prema formuli:

Procenat inhibicije/stimulacije = [srednja vrednost tretmana / (srednja vrednost kontrole - 1)] × 100

Znak minus (-)/plus (+) ispred vrednosti za procenat inhibicije/stimulacije označava da je reč o inhibitornom ili stimulatornom tretmanu redom.

3.5. Analiza ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina, transkripcioni faktor WOX7 i kontrolu ćelijskog ciklusa kod klijanaca *A. thaliana* tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom

3.5.1. Biljni materijal

Za analizu ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina i kontrolu ćelijskog ciklusa, korišćeni su klijanci *A. thaliana* tretirani tačnom ½MS podlogom u kojoj su gajeni transformisani korenovi jabuke linije ZD12 ili čistim floretinom. Kao početni biljni materijal u svim eksperimentima korišćena su semena arabidopsisa (*A. thaliana*) ekotip Columbia površinski sterilisana na način opisan u Poglavlju 3.4.

3.5.1.1. Uticaj eksudata transformisanih korenova linije ZD12 na ekspresiju odabranih gena *A. thaliana*

Nakon perioda hladne stratifikacije, semena *A.thaliana* su postavljena u staklene erlenmajere (100 mL) sa po 25 mL sterilne tečne ½MS podloge i gajena na orbitalnom šejkeru (95 rpm) u uslovima dugog dana ($45\pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16-h fotoperiod) i temperaturi od $25\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Peti dan od izlaganja semena uslovima dugog dana, tečna podloga u kojoj su rasli klijanci je zamenjena tečnom ½MS podlogom u kojoj su četiri nedelje gajeni transformisani korenovi linije ZD12. Kao kontrola su korišćeni klijanci gajeni u tečnoj ½MS podlozi. Po 400 klijanaca *A.thaliana* je uzorkovano nakon 2, 6 i 12 h od trenutka izlaganja eksudatu transformisanih korenova ili tečnoj ½MS podlozi. U cilju analize efekata produženog (10 dana) tretmana eksudatom transformisanih korenova jabuke na promenu ekspresije gena ćelijskog ciklusa u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa, semena su odmah po izlaganju uslovima dugog dana prenesena u tečnu ½MS podlogu u kojoj su gajeni transformisani korenovi linije ZD12. Kontrolni klijanci su gajeni u tečnoj ½MS podlozi. Po 400 klijanaca za tretman i kontrolu je uzorkovano nakon 10 dana gajenja. Pažljivim sečenjem skalpelom korenovi su odvojeni od izdanka, posebno sakupljani, a nakon merenja mase trenutno zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na temperaturi od $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do izolacije RNK. Uzorci su za svaku vremensku tačku (2, 6, 12 h i 10) prikupljeni iz po tri biološka ponavljanja u svakom od tri nezavisna eksperimenta.

3.5.1.2. Uticaj floretina na ekspresiju odabranih gena *A. thaliana*

Nakon perioda hladne stratifikacije, semena *A.thaliana* su postavljena u staklene erlenmajere (100 mL) sa po 25 mL sterilne tečne ½MS podloge i gajena pod istim uslovima kao i u prethodnom eksperimentu (Poglavlje 3.7.1.1.) Peti dan od izlaganja semena uslovima dugog dana, tečna podloga u kojoj su rasli klijanci je zamenjena sa 25 mL tečne ½MS podloge u koju je dodat 500 μM floretin. Stok rastvor floretina je dobijen rastvaranjem čiste supstance u DMSO. Kao kontrola su korišćeni klijanci gajeni u tečnoj ½MS podlozi u koju je dodat DMSO u istoj količini kao i kod tretmana sa floretinom (0,14%, v:v). Po 400 klijanaca je uzorkovano nakon 2, 6 i 12 h od trenutka izlaganja

floretinu ili tečnoj ½MS podlozi sa dodatkom DMSO. U cilju analize efekata produženog (10 dana) tretmana floretinom na promenu ekspresije gena ćelijskog ciklusa u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa, semena su odmah po izlaganju uslovima dugog dana prenesena u tečnu ½MS podlogu u koju je dodat 500 µM floretin. Kontrolni izdanci su preneseni u tečnu ½MS podlogu sa 0,14% (v:v) DMSO. Po završetku tretmana uzorci su za svaku vremensku tačku (2, 6, 12 h i 10 dana) prikupljeni iz po tri biološka ponavljanja u svakom od tri nezavisna eksperimenta na isti način kao što je to opisano u Poglavlju 3.7.1.1.

3.5.2. Izolacija ukupnih RNK

Izolacija ukupnih RNK iz tkiva izdanaka i korenova sakupljenih od po 400 klijanaca za svaku vremensku tačku tretmana i kontrole je urađena prema modifikovanom protokolu Gašićeve i saradnika (2004) na prethodno opisan način (Poglavlje 3.2.3.1). Provera kvaliteta i kvantifikacija izolovane RNK, prečišćavanje uzoraka RNK od DNK kontaminacije, reverzna transkripcija, PCR amplifikacija i gel elektroforeza su urađene kako je opisano u Poglavljima 3.2.4.2- 3.2.4.5, redom.

3.5.3. Priprema standarda za kvantitativnu PCR metodu (qPCR)

Sa ciljem apsolutne kvantifikacije transkripata odabranih gena pomoću qPCR metode za svaki gen je napravljena serija razblaženja odgovarajuće cDNK koja su korišćena kao standardi. Priprema standarda započeta je reverznom transkripcijom ukupne iRNK izdanaka arabidopsisa, koja je potom amplifikovana PCR metodom uz korišćenje specifičnih prajmera (Tabela 13) prema protokolu opisanom u Poglavlju 3.2.4.5. Prajmeri za *CDK* i *CYC* gene *A.thaliana* su preuzeti iz rada Dmitrović i saradnici (2015), a prajmeri za preostale analizirane gene su dizajnirani korišćenjem Primer-BLAST softverskog alata (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Amplifikovani fragmenti su razdvojeni agaroznom gel elektroforezom prema prethodno opisanom protokolu (Poglavlje 3.2.4.2).

Tabela 13. Sekvence prajmera korišćenih za PCR i qPCR amplifikaciju. *ACT7* (eng. *ACTIN 7*), *PIN* (eng. *PIN-FORMED*), *AUX1* (eng. *AUXIN RESISTANT 1*), *LAX3* (eng. *AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN 3*), *ABCB* (eng. *ATP-BINDING CASSETTE-B*), *TAA1* (eng. *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1*), *YUC* (eng. *YUCCA FLAVIN MONOOXIGENAZE*), *GA3ox1* (eng. *GIBBERELLIN 3-BETA-DIOXYGENASE 1*), *GA2ox2* (eng. *GIBBERELLIN 20-DIOXYGENASE 2*), *WOX7* (eng. *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 7*), *CDK* (eng. *CYCLIN-DEPENDENT KINASE*), *CYC* (eng. *CYCLIN*).

Gen	GenBank™ pristupni br.	Sekvenca prajmera (5'→3')	Veličina produkta amplifikacije (bp)
Geni uključeni u polarni transport auksina			
<i>PIN1</i>	NM_106017.3	F: TCAAGGCTTATCTGCGACAC R: AGTTAGAGTTCCGACCACCA	155
<i>PIN2</i>	NM_125091.3	F: TCTTGTGTTGAGTTCCGTGGG R: TTCCGTCGTCTCCTATCTCC	153
<i>PIN3</i>	NM_105762.2	F: ATTGTGCCCTTTGTGTTTGC R: TAAACCAGCGTGATCGGAAG	104
<i>PIN7</i>	NM_001084115.1	F: AAATGCTGGTCCGATGAACG R: CTGCTGTGGAGTTACACCGA	104
<i>AUX1</i>	NM_129368.2	F: GTTGAATGCTTTCGTGGTGG R: CGATCTCTCAAAGACGGTGG	188
<i>LAX3</i>	NM_106418.3	F: CTTACCTTTGCTCCTGCTCC R: GACCATACTTGCCCATCCTC	153
<i>ABCB4</i>	NM_130268.3	F: GTGCTCTTGACGCTGAGTCT R: CTTTCTCAACGATGACGCCG	153
<i>ABCB19</i>	NM_113807.2	F: ACCCGTTTGAGCCATTCACT R: TTCAGGGGCACGAGTCTTTC	150
Geni uključeni u biosintezu auksina			
<i>TAA1</i>	NM_105724.3	F: ATCTTACCCTGCGTTTGCCT R: GCTGACTCGGACATGCTTCT	130
<i>YUC3</i>	NM_100340.4	F: ATTTTGCGCGGCGATGTTCTC R: TGGGTTTGTCCGTGATTGT	137
<i>YUC4</i>	NM_121170.3	F: TAACGAGGAACGGGGCAAAG R: CGGCGTTTTTGGCATTCT	143
<i>YUC6</i>	NM_122473.3	F: AGGTTCTTGTGTCGGATG R: TGGGCAGCCATTTTCAGTAAGA	172

Nastavak Tabele 13.

Gen	GenBank™ pristupni br.	Sekvenca prajmera (5'→3')	Veličina produkta amplifikacije (bp)
Geni uključeni u biosintezu giberelina			
<i>GA3ox1</i>	NM_101424.2	F: AAGTGGACCCCTAAAGACGA R: TTGAGATTTGGAAGGCACCC	151
<i>GA20ox2</i>	NM_124560.3	F: GCCAGACGAAGAGAAACCTT R: TTCCATCAAACGGTGAGCAT	190
Geni koji kodiraju transkripcione faktore			
<i>WOX7</i>	NM_120659.2	F: CGAAGTGTGGACGGTGAAT R: TTCTGAATCTGGTCCGTGCT	100
Geni ćelijskog ciklusa			
<i>CDKA;1</i>	NM_114734	F: CCGTACGAGGATACATGGCG R: GGAGATCGACTCCATCGGGA	124
<i>CDKB2;1</i>	NM_106304	F: GTACGAGCCAGCGAAACGAA R: GCAGCACACTAGAGATATGCTTGA	170
<i>CYCA3;1</i>	NM_123674.2	F: GCGGGTGATTTGAAAGAATGTGTG R: GGTGATACAGGCATTGTGCGCT	134
<i>CYCB2;4</i>	NM_106281	F: GCATCGGCGATCTACTGC R: CCCTGCCTTGTGATGCAAAC	141
Referentni gen			
<i>ACT7</i>	NM_121018.4	F: ACAGGAAATGCTTCTAAGTGTGTCT R: ACACAAGACTTCTTGACACAACCA	171

3.5.3.1. Ekstrakcija produkata PCR amplifikacije analiziranih gena iz agaroznog gela

Amplifilovani fragmenti cDNK su izolovani sa agaroznog gela pomoću GeneJET Gel Extraction Kit-a (Thermo Scientific) prema metodi Boom-a i saradnika (1990).

- ❖ Trake na gelu, koje su bile uočljive pri UV osvetljenju, su iskrajane sterilnim skalpelom i ubacivane u Ependorf tube u koje je potom dodavan vezujući pufer (eng. *Binding Buffer*) u odnosu 1:1 (v:m).

- ❖ Sadržaj u Ependorf tubama je inkubiran u vodenom kupatilu na 60 °C u trajanju od 10 min, da bi se gel u potpunosti rastvorio do pojave žute boje. Ependorf tube su povremeno okretane da bi se ubrzalo rastvaranje gela.
- ❖ Sadržaju u Ependorf tubama je dodat 100% izopropanol u odnosu 1:2 (v:v). Nakon intenzivnog mešanja, sadržaj iz Ependorf tuba je presipan u kolone za filtriranje i centrifugiran na 12 000 g u trajanju od 1 min.
- ❖ Nakon centrifugiranja, filtrat je odstranjen, a u kolone je dodato po 700 µL pufera za ispiranje (eng. *Wash Buffer*). Kolone su ponovo centrifugirane na 12 000 g u trajanju od 1 min kako bi se kompletno odstranili ostaci pufera za ispiranje.
- ❖ Kolone su prebačene u nove sterilne Ependorf tube od 1,5 mL u koje je dodato po 50 µL elucionog pufera (eng. *Elution Buffer*) i centrifugirane na 12 000 g u trajanju od 1 min.
- ❖ Kolone su odstranjene, a dobijeni filtrati koji su sadržali produkte RT-PCR amplifikacije iz agaroznog gela su čuvani na -20 °C do upotrebe.

3.5.3.2. Kvantifikovanje ekstrahovanih produkata PCR amplifikacije

Kvantitet prečišćenih cDNK fragmenata je određivan fluorometrijski (Qubit®, Life technologies, Thermo Fisher Scientific) prema uputstvu proizvođača.

- ❖ Pripremljen je Qubit® radni rastvor (eng. *Qubit® Working Solution*) rastvaranjem Qubit® reagensa (eng. *Qubit® reagent*) u Qubit® puferu (*Qubit® buffer*) u razmeri 1:200. Po 200 µL Qubit® radnog rastvora je pripremljeno za dva standarda (standard 1 i standard 2) i za svaki uzorak za analizu.
- ❖ Standardi i uzorci su pripremljeni za analizu u tubama (eng. *Assay Tubes*) prema proračunu datom u Tabeli 14, a zatim je sadržaj tuba vorteksovan u trajanju od 2 do 3 s.
- ❖ Pre očitavanja koncentracija standarda i uzoraka na fluorometru, sadržaj tuba je inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 min.

Tabela 14. Sastav smeše za kvantifikaciju produkata PCR amplifikacije na fluometru (Qubit®).

	Tubica za standard	Tubica za uzorak
Qubit® radni rastvor	190 µL	180-199 µL
Standard	10 µL	-
Uzorak	-	1-20 µL
Ukupna zapremina u tubici	200 µL	200 µL

Nakon kvantifikacije ekstrahovanih produkata PCR amplifikacije, za svaki od analiziranih gena proračunat je broj kopija cDNK molekula po µL pomoću programa (<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) i napravljena je serija razblaženja (od 10^7 do 10^2 kopija cDNK po µL).

3.5.4. Kvantitativna PCR metoda

Nivo ekspresije analiziranih gena je praćen pomoću kvantitativne PCR metode. Za pripremu uzoraka i standarda korišćen je komercijalni kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača. U reakcionu smešu zapremine 10 µL (Tabela 15) unošeno je 1 µL standarda ili odgovarajuće cDNK dobijene reverznom transkripcijom 400 ng ukupne RNK prema prethodno opisanom protokolu (Poglavlje 3.2.4.4.), a zatim razblažene dva puta.

Tabela 15. Sastav reakcione smeše za qRT-PCR.

Komponenta	Po reakciji (10 µL)	Finalna koncentracija
SYBR Green Master Mix	5 µL	-
F prajmer (5 µM)	0,6 µL	0,3 µM
R prajmer (5 µM)	0,6 µL	0,3 µM
H ₂ O	2,8 µL	-
cDNK/standard	1 µL	-

Maxima SYBR Green/ROX Master Mix sadrži fluorescentnu boju SYBR Green I koja omogućava detekciju i analizu DNK molekula u vremenu. ROX boja je pasivna referentna fluorescentna boja koja se upotrebljava za normalizaciju varijacije između

reakcija i greške prilikom pipetiranja, jer se ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju tokom reakcije.

Prajmeri za amplifikaciju svih analiziranih gena *A.thaliana* su prikazani u Tabeli 13. Temperatura vezivanja prajmera je optimizovana u opsegu 57-63 °C. Prisustvo i stabilnost potencijalnih sekundarnih struktura (ukosnica), kao i mogućnost formiranja dimera i unakrsnih dimera od strane dizajniranih prajmera je testirana uz pomoć programa NetPrimer (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, SAD). Specifičnost svih prajmera potvrđena je gel elektroforezom RT-PCR produkata i analizom krive topljenja nakon qRT-PCR reakcije. Kao referentni gen korišćen je aktin7 *A.thaliana* (*ACT7*) amplifikovan specifičnim prajmerima prikazanim u Tabeli 13.

Negativna kontrola (eng. *Non Template Control*- NTC) je umesto cDNK sadržala 1 µL H₂O. Sve reakcije su rađene u mašini QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) prema sledećim uslovima:

- ❖ Inicijalna denaturacija (95 °C / 5 min),
- ❖ 40 ciklusa:
 - ❖ Denaturacije (95 °C / 30 s),
 - ❖ Vezivanja prajmera (60 °C / 1 min),
 - ❖ Ekstenzije (72 °C / 1 min),
- ❖ Finalna ekstenzija (72 °C / 10 min).

Analiza krive topljenja omogućena je kontinuiranim merenjem fluorescencije tokom hlađenja reakcije na 60 °C koje je praćeno povećanjem temperature do 95 °C brzinom od 0,1 °C s⁻¹.

Standardne krive, koje pokazuju zavisnost Ct vrednosti od logaritma broja kopija matrice u standardnim razblaženjima, su korišćene za izračunavanje broja kopija transkripta u uzorcima. Promena nivoa ekspresije analiziranih gena pod uticajem eksudata transformisanih korenova linije ZD12 ili floretina je određena u odnosu na nivo ekspresije

netretirane kontrole, za svaku vremensku tačku na osnovu $\Delta\Delta C_t$ metode (Livak i Schmittgen, 2001).

3.6. Ultrastrukturna analiza ćelija mezofila listova klijanaca *A. thaliana* tretiranih floretinom

Ultrastrukturna analiza ćelija mezofila listova klijanaca *A. thaliana* tretiranih floretinom su izvršena uz pomoć transmisiona elektronske mikroskopije (eng. *Transmission Electron Microscopy* - TEM).

3.6.1. Biljni materijal

Semena *A.thaliana* ekotip Columbia su površinski sterilisana i postavljena u Petri kutije na površinu čvrste ½MS podloge (15 mL) sa dodatkom floretina (Sigma) u koncentraciji od 250 ili 500 μM , na način koji je opisan u Poglavljima 3.4. i 3.5. Kao kontrola su korišćeni klijaneci gajeni na ½MS podlozi u koju je dodat DMSO u istoj količini kao i kod odgovarajućeg tretmana sa floretinom i to 0,07% za K DMSO_(FLT 250 μM) i 0,14% za K DMSO_(FLT 500 μM). Petri kutije sa semenima su postavljene uspravno i inkubirane u mraku na temperaturi od +4 °C. Nakon tri dana, Petri kutije su iznete na svetlo (45±2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16-h fotoperiod), takođe u uspravnom položaju. Listovi klijanaca tretiranih sa 500 μM floretinom su uzorkovani nakon tri dana gajenja na svetlu, a listovi sa klijanaca koji su bili tretirani sa 250 μM floretinom, nakon 10 dana od trenutka iznošenja semena na svetlo.

3.6.2. Priprema biljnog materijala za elektronsku mikroskopiju

Za fiksaciju biljnog materijala, korišćen je 3% rastvor glutaraldehida (Sigma-Aldrich) u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7,2) tokom 4 do 6 h na temperaturi od +4 °C. Po završenoj fiksaciji, uzorci su isprani hladnim fosfatnim puferom nakon čega je usledila postfiksacija sa 2% rastvorom osmijum-tetroksida (Sigma-Aldrich) u istom puferu tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim dehidratirani provlačenjem kroz seriju alkohola rastućih koncentracija i na kraju kalupljeni u smoli Epon-Araldita (Sigma-Aldrich). Dobijeni kalupi sečeni su LKB III ultramikrotomom na preseke debljine 1 μm , bojeni

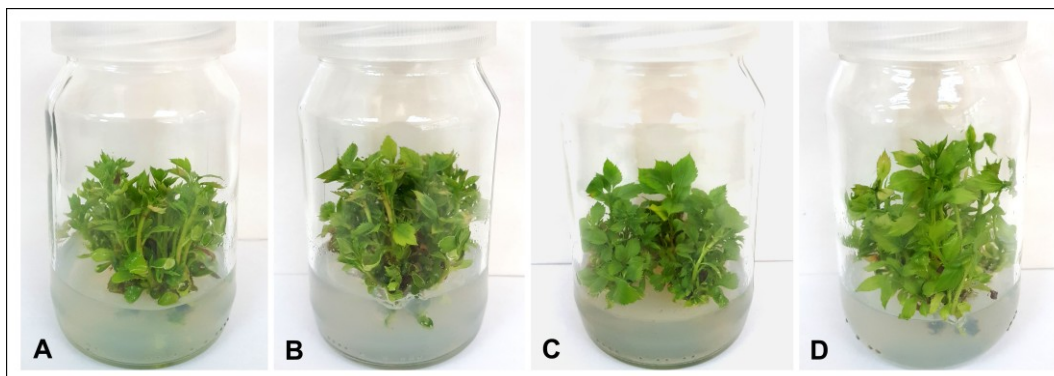
toluidin plavim (Sigma-Aldrich) i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (Leica DM LB, Meyer Instruments, Inc, Houston, SAD). Materijal za elektronsku mikroskopiju je sečen na preseke debljine debljine 500-700 nm koji su postavljeni na bakarne mrežice i obojeni uranil acetatom i olovo citratom (Leica Microsystems), a preparati posmatrani na transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI CM12, Eindhoven, Holandija).

4. REZULTATI

4.1. Morfogeneza jabuke *in vitro*

4.1.1. Uspostavljanje kulture izdanaka jabuke *in vitro*

In vitro kultura izdanaka četiri sorte jabuke (Melrouz, Zlatni Delišeš, Čadel i Gloster) je uspostavljena iz apeksa pazušnih pupoljaka lastara jabuke. Izdanci koji su se razvili iz pupoljaka na MS podlozi sa 5,0 μM BA i 0,5 μM NAA su umnožavani i dalje održavani na MS podlozi sa smanjenom koncentracijom hormona (2,23 μM BA i 0,27 μM NAA). Upotreba pomenute hranljive podloge se pokazala pogodnom jer su se uspostavljene kulture izdanaka sve četiri sorte jabuke odlikovale bujnim rastenjem i umnožavanjem zdravih i zelenih izdanaka (Slika 6), bez pojave vitifikacije. Dobijeni izdanci su poslužili kao izvor eksplantata (odsečaka listova) za razvoj protokola za efikasnu regeneraciju jabuke putem *de novo* organogeneze, kao bitnog preduslova za dalja biotehnoška istraživanja.



Slika 6. *In vitro* kultura izdanaka jabuke sorti Melrouz (A), Zlatni Delišeš (B), Čadel (C) i Gloster (D).

4.1.2. Optimizacija uslova za regeneraciju izdanaka jabuke

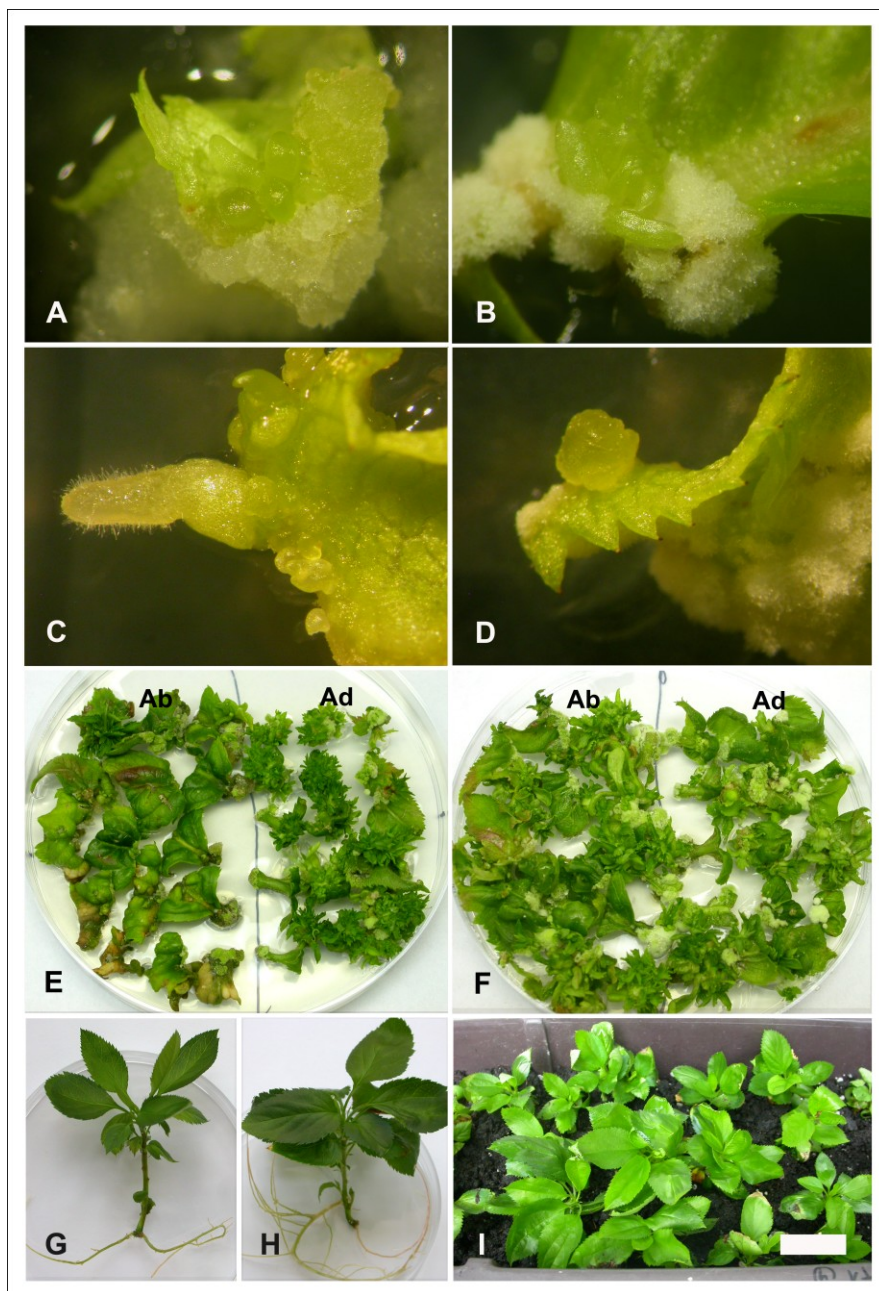
Isipitivan je uticaj različitih hranljivih podloga (M1, M2 ili M3, Poglavlje 3.1.3), orijentacije eksplantata na podlozi (položaj adaksijalnom (Ad) ili abaksijalnom (Ab) površinom prema podlozi), svetlosnog režima kao predtretmana, agensa za učvršćivanje podloge, genotipa (sorte), kao i tipa eksplantata (položaj odsečka lista duž aksijalne ose) na efikasnost regeneracije izdanaka jabuke sorti Melrouz i Zlatni Delišeš.

Eksplantati obe sorte jabuke, gajeni uporedo na sve tri hranljive podloge u uslovima svetla, su nakon šest nedelja proizveli kaluse. Orijentacija eksplantata je uticala na formiranje kalusa samo kod sorte Melrouz. Utvrđeno je da je 46,7% eksplantata ove sorte sa Ad orijentacijom i 75% eksplantata sa Ab orijentacijom razvilo kaluse nezavisno od primenjene podloge, dok je kod sorte Zlatni Delišeš to bio slučaj sa po 62,7% eksplantata obe orijentacije. Ovi zeleni ili zeleno-crvenkasti kalusi su bili kompaktni, čvrsti i na njima nije dolazilo do formiranja pupoljaka.

S druge strane, skoro 100% eksplantata obe sorte jabuke koji su bili tri nedelje na predtretmanu u mraku, a zatim naredne tri nedelje gajeni na svetlu, je obrazovalo kaluse uglavnom na mestima preseka lista ili duž lisne nervature. Kalusi formirani na M1 (MS + 3,0 μ M TDZ + 5,0 μ M NAA) i M2 (MS + 22,0 μ M TDZ + 1,5 μ M IBA) podlogama su bili mali (\approx 3x3 mm), rastresiti i bledezelene boje. Na ovim kalusima je još u toku indukcionog perioda u mraku zapažena pojava prvih pupoljaka. Nedelju dana nakon iznošenja eksplantata na svetlo, sitni listoliki ili globularni pupoljci su postali jasno uočljivi na površini kalusa (Slika 7A i B). Paralelno, zapažena je pojava pupoljaka koji su formirani direktno na površini liske, bez posredne kalusne faze (Slika 7C i D). Kod obe sorte jabuke, približno 50% svih eksplantata obe orijentacije, gajenih na M1 podlozi, je ispoljavalo regenerativnu sposobnost. U slučaju eksplantata kultivisanih na M2 podlozi zabeležena je značajno veća učestalost regeneracije u odnosu na M1 podlogu, koja je iznosila 71,3% za sortu Melrouz i 82,7% za Zlatni Delišeš.

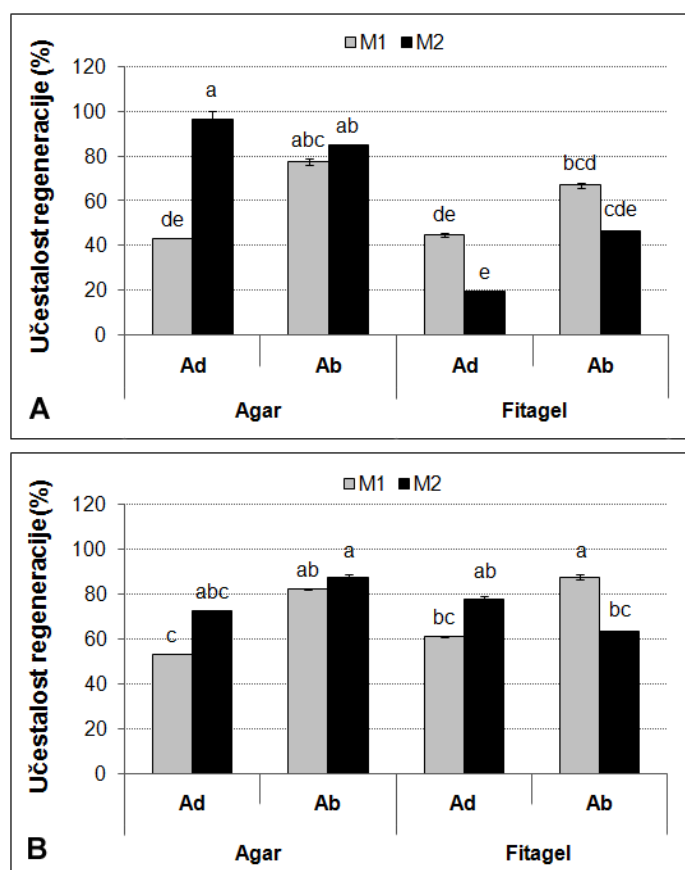
Kalusi formirani na eksplantatima gajenim na M3 indukcionoj podlozi (MS + 10,0 μ M TDZ + 2,65 μ M NAA) su bili voluminozni, meki i beličasti. Nakon prenosa na M3 podlogu za regeneraciju (MS + 1,0 μ M NAA + 4,4 μ M BA) eksplantati su, nezavisno od predtretmana na svetlu ili u mraku kojem su bili izloženi, nekrozirali i nisu formirali izdanke.

Agens koje je korišćen za učvršćivanje podloge, agar ili fitagel (Phytigel™) je statistički značajno uticao na regenerativni potencijal odsečaka listova jabuke (Slika 8).



Slika 7. Regeneracija izdanaka na eksplantatima listova jabuke sorti Melrouz i Zlatni Delišeš. Indirektna (A i B) i direktna (C i D) organogeneza na odsečcima listova sorti Melrouz i Zlatni Delišeš, redom, nakon iznošenja kultura na svetlo, a posle tri nedelje gajenja u mraku na M2 podlozi (MS + 22,0 μ M TDZ + 1,5 μ M IBA) za regeneraciju, bar = 1 mm (Bar za slike A-I je prikazan na slici I). Izdanci sorti Melrouz (E) i Zlatni Delišeš (F) regenerisani na eksplantatima položenim abaksijalnom (Ab) ili adaksijalnom (Ad) površinom na M2 podlogu nakon osam nedelja kultivacije, bar = 13 mm. Ožiljeni izdanci sorti Melrouz (G) i Zlatni Delišeš (H) inicijalno gajeni na MS podlozi sa 10,0 mM ili 2,5 mM IBA, redom, a zatim šest nedelja na MS podlozi bez regulatora rasteenja, bar = 15 mm. Aklimatizovane biljčice sorte Zlatni Delišeš gajene u staklenoj bašti (I), bar = 30 mm.

Najveća učestalost regeneracije kod sorti Melrouz (96,6%) (Slika 8A) i Zlatni Delišeš (87,4%) (Slika 8B) je postignuta na M2 podlozi učvršćenoj pomoću agara. Upotreba fitagela je uticala na povećanje broja vitrifikovanih izdanaka. Tako su kod sorte Zlatni Delišeš vitrifikovani izdanci zabeleženi u približno tri puta većem broju na podlozi sa fitagelom (16,5% za M1 i 22% za M2 podlogu) u poređenju sa podlogama istog sastava ali učvršćenih pomoću agara (5% i 7,5%, redom). Ista pojava je uočena i kod sorte Melrouz gde je broj vitrifikovanih izdanaka na podlogama sa fitagelom bio i do 90% veći nego na odgovarajućim podlogama učvršćenih pomoću agara.



Slika 8. Uticaj agensa za učvršćivanje podloge, agara ili fitagela (PhytigelTM), na učestalost regeneracije izdanaka jabuke sorti Melrouz (A) i Zlatni Delišeš (B) iz odsečaka listova postavljenih adaksijalnom (Ad) i abaksijalnom (Ab) površinom na M1 (MS + 3,0 μ M TDZ + 5,0 μ M NAA) ili M2 (MS + 22,0 μ M TDZ + 1,5 μ M IBA) podlogu za regeneraciju. Eksplantati su gajeni tri nedelje u mraku, a zatim dodatne tri nedelje na svetlu. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) dva ponavljanja sa po 15 eksplantata za svaki tretman ponovljen u dva nezavisna eksperimenta (n=60). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

Na osnovu prethodnih eksperimenata je utvrđeno da je tronedeljni predtretman eksplantata u mraku ključan za indukciju pupoljaka kod sorti Melrouz i Zlatni Delišes. Uspešna regeneracija je postignuta isključivo ukoliko je ista podloga (M1 ili M2) korišćena ujedno i za indukciju kalusa i za regeneraciju izdanaka u kombinaciji sa agarom kao agensom za učvršćivanje. Dobijeni rezultati su poslužili kao osnova za dalje ispitivanje uticaja genotipa (sorte), tipa eksplantata (položaja odsečka lista na lisnoj ploči - proksimalni, središnji i distalni), kao i načina orijentacije (Ad ili Ab) eksplantata na njihov regenerativni potencijal.

Već nakon nedelju gajenja na režimu dugog dana posle tronedeljne inkubacije u mraku 95% do 100% eksplantata obe sorte jabuke proizvelo je kaluse i na M1 i na M2 podlozi, nezavisno od tipa eksplantata i načina njihove orijentacije. ANOVA pokazuje da je nakon šest nedelja kultivacije učestalost regeneracije kod sorte Melrouz statistički značajno zavisila od vrste hranljive podloge i načina orijentacije eksplantata (Tabela 16), dok je kod sorte Zlatni Delišes učestalost regeneracije osim pomenuta dva faktora značajno zavisila i od njihove interakcije (vrsta hranljive podloge x orijentacija eksplantata). Kod obe sorte jabuke, M2 se pokazala pogodnijom za regeneraciju od M1 podloge (Tabela 16). Najveća učestalost regeneracije (97,4%) kod sorte Melrouz je postignuta kada su eksplantati svojom Ad stranom bili postavljeni na podlogu (Slika 7E), dok je ista učestalost regeneracije (97,4%) zabeležena i kod sorte Zlatni Delišes, ali u slučaju suprotne (Ab) orijentacije eksplantata prema podlozi (Slika 7F). Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti regeneracije između tretmana u kojima su kao eksplantati korišćeni proksimalni (1), središnji (2) ili distalni (3) odsečki listova (Tabela 16).

Tabela 1. Efekat tipa i orijentacije eksplantata, kao i podloge za regeneraciju (M1 i M2) na formiranje kalusa i regeneraciju izdanaka jabuke sorti Melrouz i Zlatni Delišes. Listovi su isečeni poprečno u odnosu na centralni nerv na tri segmenta koji su označeni kao proksimalni (1), središnji (2) i distalni (3) i postavljeni svojom abaksijalnom (Ab) ili adaksijalnom (Ad) površinom na podloge za regeneraciju. Eksplantati su gajeni tri nedelje u mraku, a zatim izloženi uslovima dugog dana narednih pet nedelja. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) dva ponavljanja sa po 30 eksplantata za svaki tretman ($n=60$). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima u istoj koloni i u okviru iste sorte se statistički značajno razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

Sorta	Podloga	Orijentacija eksplantata	Tip eksplantata	Pojava kalusa (%)	Učestalost regeneracije (%)	Prosečan broj izdanaka/eksplantatu	SFC
Melrouz	M1	Ab	1	100	18,4 ± 1,8 c	0,28 ± 0,04 e	0,05
	M1	Ab	2	95	44,8 ± 2,3 bc	0,56 ± 0,06 de	0,25
	M1	Ab	3	95	39,0 ± 4,4 bc	0,75 ± 0,07 cde	1,72
	M1	Ad	1	100	75,2 ± 0,3 ab	2,96 ± 0,06 b	2,23
	M1	Ad	2	100	75,2 ± 0,3 ab	2,82 ± 0,07 bc	2,12
	M1	Ad	3	95	65,1 ± 0,3 abc	2,18 ± 0,07 bcd	1,42
	M2	Ab	1	100	50,0 ± 1,0 bc	4,99 ± 0,17 b	2,50
	M2	Ab	2	100	60,2 ± 1,1 abc	2,71 ± 0,11 bc	1,63
	M2	Ab	3	95	65,1 ± 0,3 abc	4,06 ± 0,13 b	2,64
	M2	Ad	1	100	94,7 ± 5,3 a	10,58 ± 0,09 a	10,02
	M2	Ad	2	100	97,4 ± 2,6 a	11,75 ± 0,07 a	11,44
	M2	Ad	3	95	75,2 ± 0,3 ab	4,99 ± 0,12 b	3,75
Zlatni Delišes	M1	Ab	1	95	70,0 ± 0,0 bcd	1,27 ± 0,04 cdef	0,89
	M1	Ab	2	100	39,8 ± 1,1 d	0,42 ± 0,04 f	0,17
	M1	Ab	3	100	45,0 ± 0,3 cd	0,69 ± 0,05 ef	0,31
	M1	Ad	1	100	50,0 ± 0,0 cd	1,05 ± 0,06 def	0,53
	M1	Ad	2	100	44,8 ± 2,3 cd	0,45 ± 0,03 f	0,20
	M1	Ad	3	100	55,0 ± 0,3 bcd	0,74 ± 0,05 ef	0,41
	M2	Ab	1	100	97,4 ± 2,6 a	5,44 ± 0,04 a	5,30
	M2	Ab	2	100	97,4 ± 2,6 a	5,06 ± 0,04 ab	4,93
	M2	Ab	3	100	97,4 ± 2,6 a	6,47 ± 0,05 a	6,30
	M2	Ad	1	100	81,0 ± 1,7 ab	2,93 ± 0,05 bc	2,37
	M2	Ad	2	100	75,2 ± 0,3 bc	2,42 ± 0,06 cd	1,82
	M2	Ad	3	100	60,0 ± 0,0 bcd	1,98 ± 0,08 cde	1,19

Razlike između sort Melrouz i Zlatni Delišeš su bile izraženije u pogledu prosečnog broja regenerisanih izdanaka po eksplantatu, nego one zabeležene u slučaju učestalosti regeneracije. ANOVA je ukazala da su isti parametri koji su u okviru jedne sorte uticali na učestalost regeneracije, značajano uticali i na prosečan broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu. Kod sorte Melrouz to su bili: vrsta hranljive podloge i način orijentacije eksplantata, a kod sorte Zlatni Delišeš pored vrste hranljive podloge, načina orijentacije eksplantata i njihova interakcija. Kod sorte Melrouz, najveći prosečan broj izdanaka po eksplantatu je regenerisan iz Ad eksplantata, odsečak 1 i 2 na M2 podlozi (10,58 i 11,75, redom) (Tabela 16), što je skoro dvostruko više od maksimalnog prosečnog broja pupoljaka dobijenog u slučaju Ab orijentacije eksplantata na M2 podlozi kod sorte Zlatni Delišeš (6,47) (Tabela 16). Shodno tome i SFC indeks je u najoptimalnijim uslovima za regeneraciju za sortu Zlatni Delišeš bio znatno niži (6,30) u odnosu na onaj dobijen kod sorte Melrouz (11,44) (Tabela 16).

Većina regenerisanih izdanaka je bila zelena, zdrava i bez abnormalnosti (Slika 7G i H). Ipak, manji broj vitrifikovanih izdanaka je zabeležen kod obe sorte jabuke na M1 i M2 podlogama. Kod Zlatnog Delišeša procenat vitrifikovanih izdanaka je varirao od 5,5% na M1 do 7,3% na M2 podlozi, a kod Melrouz od 6,8% na M1 do 11,1% na M2 podlozi. Vitrifikovani izdanci su odstranjeni iz kultura i samo oni zdravi su preneti na medijum za umnožavanje (SMM).

4.1.3. Uticaj β -laktamskih antibiotika na regeneraciju izdanaka jabuke

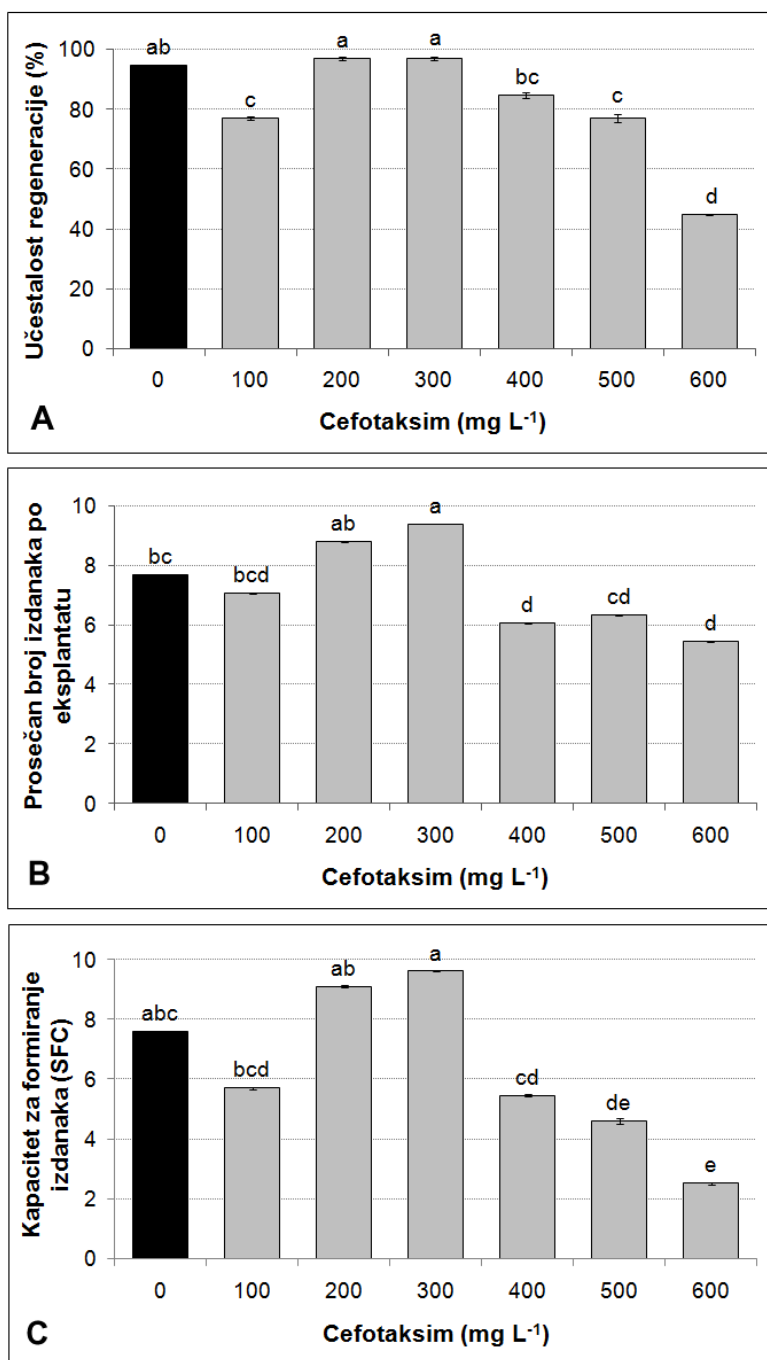
S ciljem povećanja regenerativnog odgovora odsečaka listova jabuke ispitivan je uticaj β -laktamskih antibiotika cefotaksima (Cef), meropenema (Mer) i timentina (Tim) na regeneraciju izdanaka kod sorte Zlatni Delišeš.

Već nakon dve do tri nedelje inkubacije u mraku, na većini odsečaka listova gajenih na M2 podlozi za regeneraciju i u prisustvu ili bez β -laktamskih antibiotika (kontrola) došlo je do formiranja kalusa. Kalusi su formirani uglavnom duž ivica sečenja eksplantata ili duž glavnog nerva listova. Još u toku indukcionog perioda u mraku, zapažena je pojava prvih

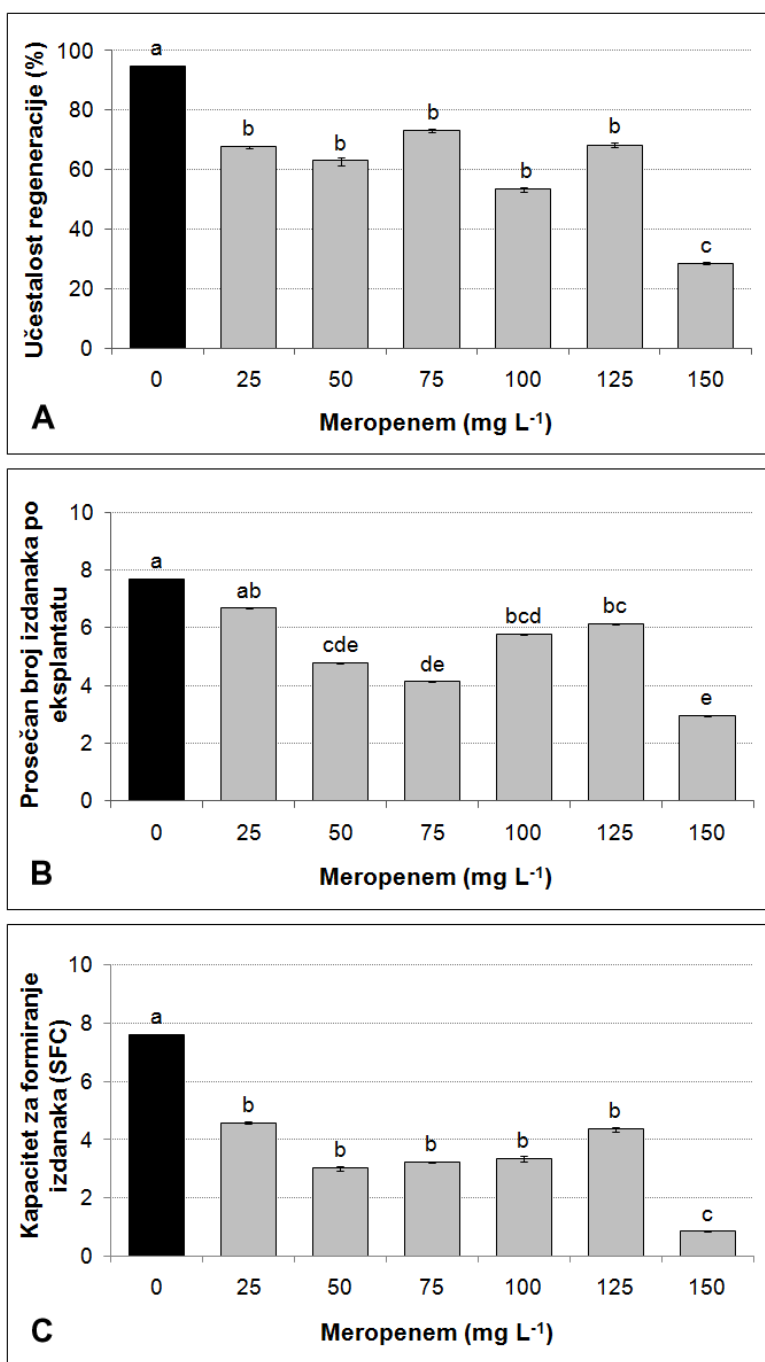
pupoljaka na kalusima kod svih tretmana. Nakon osam nedelja kultivacije (tri u mraku i dodatnih pet u uslovima dugog dana), β -laktamski antibiotici su, u zavisnosti od tipa i koncentracije u kojoj su primenjeni, različito uticali na regenerativni odgovor odsečaka listova jabuke. Ovaj uticaj se manifestovao statistički značajnim razlikama u učestalosti regeneracije, prosečnom broju izdanaka po eksplantatu i SFC indeksu u odnosu na netretiranu kontrolu. Kontrolni eksplantati su regenerisali sa visokom učestalošću (94,9%), dajući prosečno 7,67 izdanaka po eksplantatu (Slika 9A i B).

Cefotaksim u koncentracijama od 200 i 300 mg L⁻¹ nije doveo do statistički značajnog povećanja učestalosti regeneracije (Slika 9A), dok je tretman sa 300 mg L⁻¹ cefotaksima statistički značajano povećavao prosečan broj izdanaka po eksplantatu u poređenju sa kontrolom (9,39 vs. 7,67) (Slika 9B). Suprotno, cefotaksim u koncentracijama od 100, 500 i 600 mg L⁻¹ je doveo do smanjenja učestalosti regeneracije, koje je bilo najveće na tretmanu sa 600 mg L⁻¹ (44,7%) (Slika 9A).

Meropenem je u svim primenjenim koncentracijama uticao na statistički značajno smanjenje učestalosti regeneracije. Razlike između vrednosti za učestalosti regeneracije eksplantata na podlogama sa različitim koncentracijama meropenema su bile minimalne, osim u slučaju tretmana sa 150 mg L⁻¹ meropenema koji je delovao izrazito inhibitorno, smanjujući vrednost učestalosti regeneracije na 28,5% (Slika 10A). Takođe, meropenem je u svim primenjenim koncentracijama, izuzev najmanje od 25 mg L⁻¹, uticao na statistički značajno smanjenje prosečnog broja regenerisanih izdanaka po eksplantatu u poređenju sa kontrolom (Slika 10B).

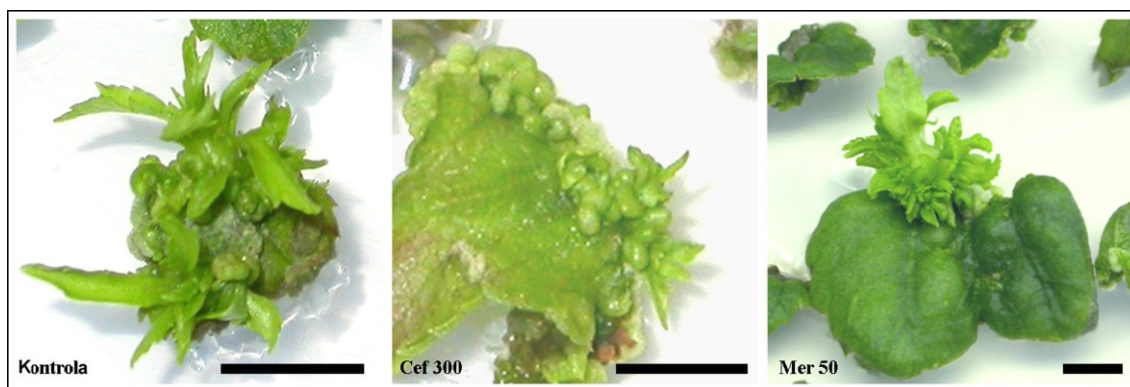


Slika 9. Uticaj cefotaksima (Cef) na učestalost regeneracije (A), prosečan broj izdanaka po eksplantatu (B) i kapacitet za formiranje izdanaka (SFC) (C) iz odsečaka listova jabuke sorte Zlatni Delišes, nakon tri nedelje gajenja na M2 podlozi u mraku i dodatnih pet nedelja u uslovima dugog dana. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) pet ponavljanja sa po 12 eksplantata za svaki tretman ($n=60$). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.



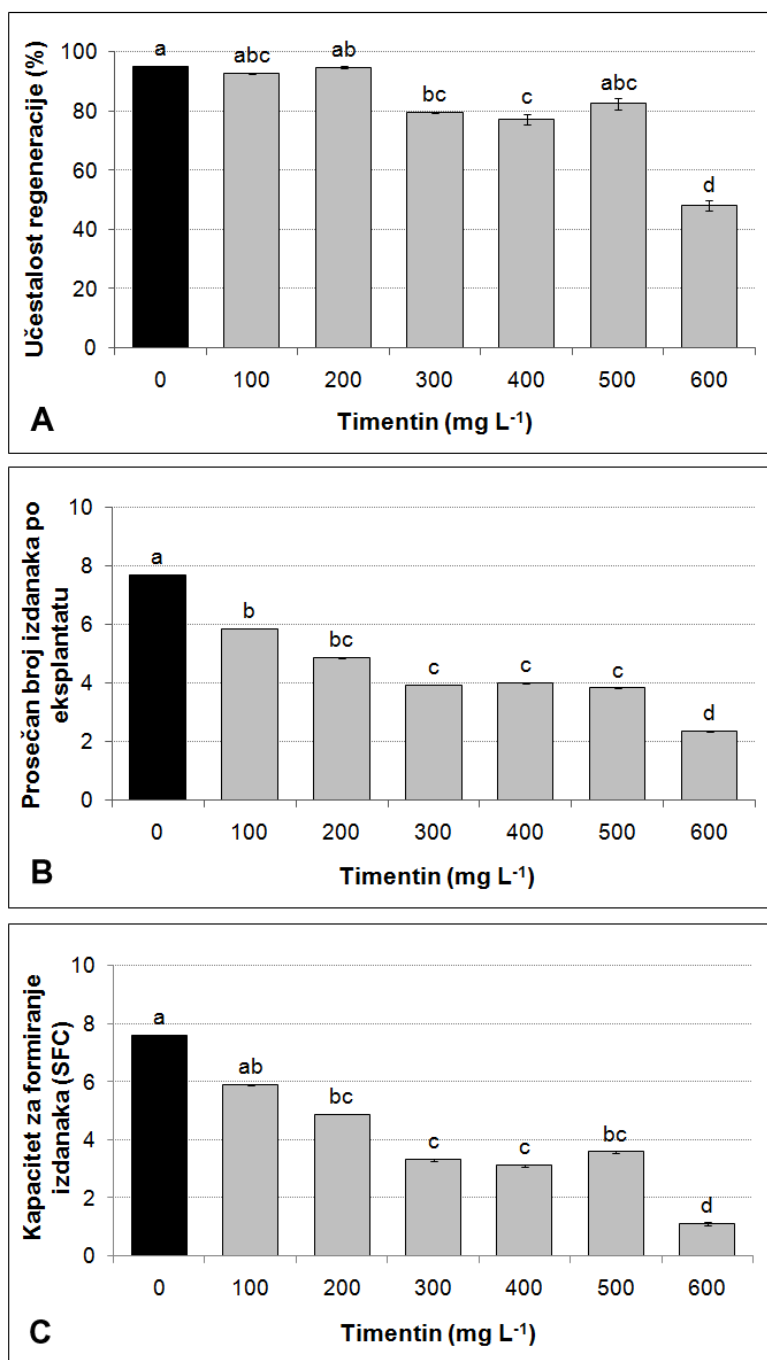
Slika 10. Uticaj meropenema (Mer) na učestalost regeneracije (A), prosečan broj izdanaka po eksplantatu (B) i kapacitet za formiranje izdanaka (SFC) (C) iz odsečaka listova jabuke sorte Zlatni Delišes, nakon tri nedelje gajenja na M2 podlozi u mraku i dodatnih pet nedelja u uslovima dugog dana. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) pet ponavljanja sa po 12 eksplantata za svaki tretman ($n=60$). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

Iako meropenem nije uticao pozitivno na regenerativni odgovor eksplantata kao cefotaksim, izdanci regenerisani na M2 podlozi sa meropenemom u koncentracijama od 25 do 125 mg L⁻¹ su rasli intenzivnije i dali veće, snažnije i bolje razvijene izdanke nego oni koji su regenerisani na podlozi sa cefotaksimom nakon istog perioda gajenja (Slika 11).



Slika 11. Izdanci regenerisani na M2 podlozi za regeneraciju bez antibiotika (kontrola), M2 podlozi sa dodatkom 300 mg L⁻¹ cefotaksima (Cef 300) ili 50 mg L⁻¹ meropenema (Mer 50) nakon tri nedelje kultivacije u mraku i dodatnih pet nedelja u uslovima dugog dana. Bar = 5 mm.

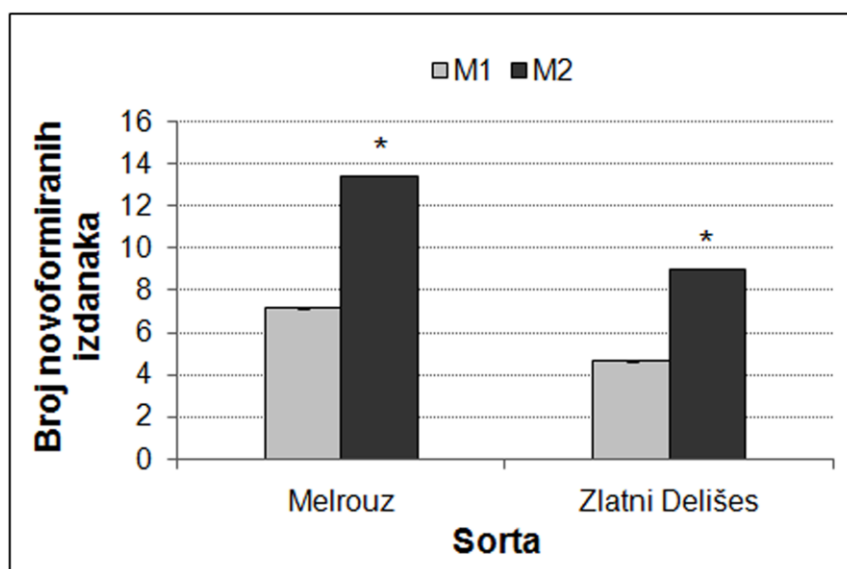
Slično kao meropenem, i timentin je u svim primenjenim koncentracijama imao negativan uticaj na regenerativni odgovor eksplantata listova jabuke, s tim što je on bio manje izražen u slučaju učestalosti regeneracije (Slika 12A) nego u slučaju prosečnog broja izdanaka po eksplantatu (Slika 12B). Najveće smanjenje regenerativnog odgovora koje se ogledalo u skoro dvostrukom smanjenju učestalosti regeneracije i trostrukom smanjenju prosečnog broja pupoljaka po eksplantatu, zapaženo je na podlozi sa najvišom koncentracijom timentina od 600 mg L⁻¹ (Slika 12A i B). Kumulativni efekat smanjenja učestalosti regeneracije i prosečnog broja pupoljaka po eksplantatu rezultovao je u smanjenju SFC vrednosti eksplantata gajenih na svim podlogama sa timentinom, izuzev one sa najmanjom koncentracijom (100 mg L⁻¹) (Slika 12C).



Slika 12. Uticaj timentina (Tim) na učestalost regeneracije (A), prosečan broj izdanaka po eksplantatu (B) i kapacitet za formiranje izdanaka (SFC) (C) iz odsečaka listova jabuke sorte Zlatni Delišes, nakon tri nedelje gajenja na M2 podlozi u mraku i dodatnih pet nedelja u uslovima dugog dana. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) pet ponavljanja sa po 12 eksplantata za svaki tretman ($n=60$). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

4.1.4. Umnožavanje izdanaka

Vrsta podloge za regeneraciju je statistički značajno uticala, ne samo na regeneraciju izdanaka iz odsečaka listova, nego i na kasnije umnožavanje tako regenerisanih izdanaka na SMM podlozi (2,2 μ M BA + 0,3 μ M NAA) (Slika 13). Tako je broj novoformiranih izdanaka kod obe sorte bio dvostruko veći u slučaju kada je za regeneraciju izdanaka korišćena M2 hranljiva podloga, u poređenju sa M1 podlogom. Ovaj produženi uticaj SRM podloga je bio osetan i tokom naredne tri subkultivacije. Izdanci sorte Melrouz, regenerisani na obe podloge za regeneraciju, su pokazali veći potencijal za umnožavanje od sorte Zlatni Delišes. Najveći prosečan broj novoformiranih izdanaka (13,4) zabeležen je nakon šest nedelja gajenja na SMM podlozi izdanaka sorte Melrouz koji su bili regenerisani na M2 podlozi (Slika 13).



Slika 13. Produženi efekat podloga za regeneraciju izdanaka M1 i M2 na broj novoformiranih izdanaka gajenih šest nedelja na SMM podlozi za umnožavanje koja je sadržala 2,2 μ M BA i 0,3 μ M NAA. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti pet ponavljanja (\pm SE) sa po pet eksplantata za svaki tretman (n=25). Efekat M1 i M2 podloga na broj novoformiranih izdanaka jedne sorte poređen je *t*-testom na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Zvezdicama su obeležene srednje vrednosti koje se statistički značajno razlikuju.

4.1.5. Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka u uslovima staklene bašte

Nakon uspostavljanja optimalnih uslova za efikasnu regeneraciju izdanaka iz odsečaka listova jabuke i njihovo umnožavanje, ispitivan je efekat auksina IBA i NAA na ožiljavanje izdanaka sorti Melrouz i Zlatni Delišes, a potom je pristupljeno njihovoj aklimatizaciji u uslovima staklene bašte.

Izdanci sorti Melrouz i Zlatni Delišes regenerisani na hranljivim podlogama M1 i M2 i umnoženi na SMM podlozi su nakon dostizanja visine od 2 do 3 cm izdvajani iz žbunića i preneti na MS podlogu sa IBA ili NAA u rastućim koncentracijama od 0; 2,5; 5,0 ili 10 μM . ANOVA je ukazala da su sorta i vrsta hranljive podloge, kao i interakcija ova dva faktora (sorta x podloga) značajno uticala na učestalost ožiljavanja, dok su prosečan broj korenova po izdanku i dužina korena zavisili od sorte i vrste hranljive podloge. Najveći procenat ožiljavanja od 74,3% je zabeležen u slučaju izdanaka sorte Zlatni Delišes gajenih na podlozi sa 2,5 μM IBA (Tabela 17). Učestalost ožiljavanja ove sorte je opadala sa porastom koncentracije IBA, dok takav trend nije zabeležen u slučaju primene NAA (Tabela 17). Prosečno tri korena dužine od 3,5 do 13,5 cm su formirana po izdanku sorte Zlatni Delišes (Tabela 17). Kod sorte Melrouz najveća učestalost regeneracije korenova od 62,1% je postignuta na podlozi sa 10 μM IBA, na kojoj je formirano u proseku 2,4 korena po izdanku, dužine 2 do 7 cm (Tabela 17). Poređenjem parametara koji opisuju sposobnost ožiljavanja izdanaka kao što su učestalost ožiljavanja i prosečan broj korenova po izdanku, nije primećena značajna razlika između izdanaka regenerisanih na hranljivim podlogama M1 i M2, usled čega su rezultati za izdanke sa ove dve podloge objedinjeni i kao takvi prikazani u Tabeli 17. Na izdancima gajenim na kontrolnoj MS podlozi bez regulatora rastanja nije došlo do formiranja korenova.

Biljčice sa dobro razvijenim korenima (Slika 7G i H), posađene u plastične posude sa mešavinom zemlje i peska, su uspešno aklimatizovane u staklenoj bašti (Slika 7I). Nakon dva meseca aklimatizacije, stopa preživljavanja biljaka sorte Zlatni Delišes je iznosila 89%, a sorte Melrouz 74%.

Tabela 17. Efekat auksina IBA i NAA na ožijavanje izdanaka jabuke sorti Melrouz i Zlatni Delišes. Izdanci su gajeni sedam dana na MS podlozi sa dodatkom IBA ili NAA (pet dana u mraku/dva dana u uslovima dugog dana), a zatim su preneti na podlogu bez regulatora rastjenja. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) dva ponavljanja sa po 10 eksplantata za svaki tretman (n=20). Srednje vrednosti u istoj koloni obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

Sorta	Auksin (μ M)		Učestalost ožiljavanja (%)	Prosečan broj korenova/izdanku	Dužina korena (mm)
	IBA	NAA			
Melrouz	0,0	0,0	0,00 \pm 0 e	0,0 \pm 0 e	0,0 \pm 0 e
	2,5	–	55,52 \pm 0,21 c	2,6 \pm 0,4 abcd	27,5 \pm 0,3 d
	5,0	–	52,00 \pm 0,09 c	2,3 \pm 0,3 bcd	38,5 \pm 0,2 bcd
	10,0	–	62,02 \pm 0,09 bc	2,4 \pm 0,4 abcd	41,5 \pm 0,9 abcd
	–	2,5	34,21 \pm 0,13d	1,8 \pm 0,3 d	25,0 \pm 0,5 d
	–	5,0	26,34 \pm 0,02 d	2,0 \pm 0,1 cd	27,5 \pm 0,3 d
	–	10,0	24,65 \pm 0,01d	3,0 \pm 0,9 abc	45,0 \pm 1,5 abcd
Zlatni Delišes	0,0	0,0	0,00 \pm 0 e	0,0 \pm 0 e	0,0 \pm 0 e
	2,5	–	74,30 \pm 0,4 a	3,2 \pm 0,2 abc	72,3 \pm 1,6 ab
	5,0	–	68,01 \pm 0,04 ab	2,9 \pm 1,6 abcd	74,0 \pm 3,1 a
	10,0	–	59,02 \pm 0,17 bc	3,3 \pm 0,6 ab	65,0 \pm 2,0 abc
	–	2,5	56,56 \pm 0,43 c	2,8 \pm 0,3 abcd	36,0 \pm 0,4 cd
	–	5,0	59,12 \pm 0,67 bc	3,2 \pm 0,2 abc	40,1 \pm 1,0 abcd
	–	10,0	56,00 \pm 0,01 c	3,6 \pm 0,6 a	45,0 \pm 0,5 abcd

4.2. Genetička transformacija jabuke

4.2.1. Genetička transformacija jabuke sa *A. rhizogenes* 15834

Prvi potencijalno transformisani (PT) korenovi su se pojavili na izdancima jabuke sorti Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster, dve nedelje nakon inokulacije sojem *A. rhizogenes* 15834, nezavisno od načina inokulacije. U slučaju kada je inokulacija vršena ozleđivanjem stabljike izdanka ubadanjem sterilnom iglom prethodno zaronjenom u bakterijsku suspenziju (I), korenovi su se predominantno razvili na samim mestima ozleđivanja (Slika 14).

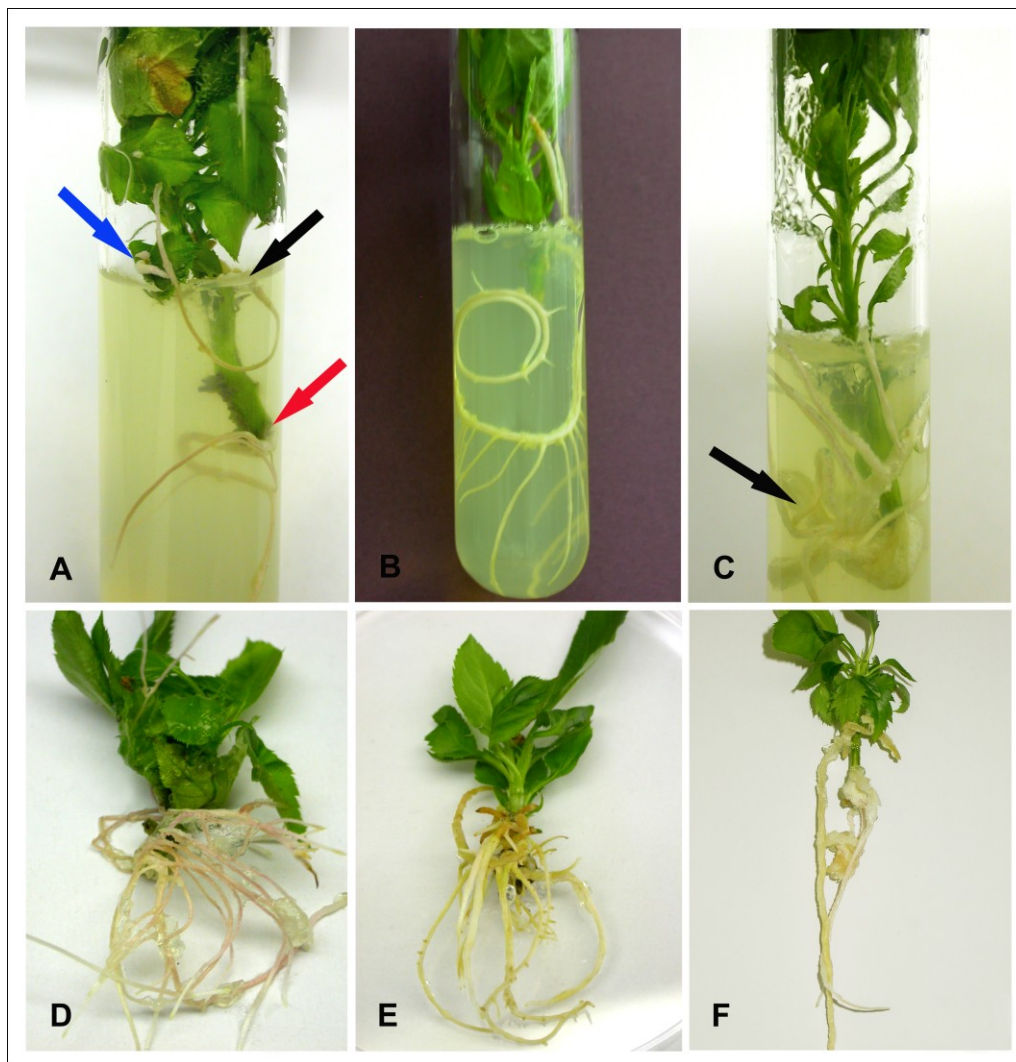


Slika 14. Transformisani korenovi regenerisani na mestu ozleđivanja tkiva izdanka jabuke.

U drugom slučaju, tj. kada je stablo izdanka na mestu preseka uranjano u bakterijsku suspenziju (II), do pojave korenova dolazilo je, ne samo na mestu preseka, već i u njegovoj okolini, često 10 do 20 mm iznad bazalnog kraja izdanka (Slika 15A). U nekim slučajevima, dolazilo je do formiranja adventivnih korenova i na površini listova (Slika 15A.). Beličast, rastresit kalus je često bio prisutan na mestima inokulacije kod izdanaka koji nisu formirali korenove. Tokom narednih pet nedelja, došlo je do pojave novih korenova, dok su se postojeći izduživali, dostižući dužinu i do 12 cm sedam nedelja nakon inokulacije. Na kontrolnim izdancima nije došlo do formiranja adventivnih korenova.

Formirani adventivni korenovi su pokazivali izražen agravitropski rast, što je tipična karakteristika transformisanih (eng. *hairy root*, HR) korenova. Pojedini adventivni korenovi su rasli naviše, obrazujući karakteristične uvojke (Slika 15B). U nekim slučajevima lateralni korenovi su bili srasli pri osnovi formirajući tvorevinu nepravilnog oblika sa kalusnim tkivom na površini (Slika 15C). Većina potencijalno transformisanih korenova je bila debela, bela, ponekad blago-rozikasto obojena (Slika 15D) ili sa primesama žućkaste boje (Slika 15E). Većina njih je posedovala deblje, ređe raspoređene lateralne korenove bez korenskih dlaka, dok je kod nekoliko linija zabeleženo odsustvo ili

prisustvo samo 1-2 lateralna korena. Kalusno tkivo je često bilo prisutno na celoj površini korenova (Slika 15F).



Slika 15. Transformisani korenovi jabuke sedam nedelja nakon inokulacije sojem *A. rhizogenes* 15834. Transformisani korenovi regenerisani na mestu preseka izdanka inokulisanog agrobakterijama (crvena strelica), ~15 mm iznad mesta preseka (crna strelica) i na površini lista izdanka (plava strelica) (A); Agravitropski rast transformisanih korenova (B); Tvorevina nepravilnog oblika nastala srastanjem bazalnih delova transformisanih korenova (strelica) (C); Blago-rozikasta (D) ili žućkasta (E) obojenost transformisanih korenova; Formiranje kalusnog tkiva na površini transformisanih korenova (F).

Efikasnost transformacije sojem *A. rhizogenes* 15834 je zavisila od sorte jabuke i od načina na koji je vršena inokulacija. Prva inokulaciona procedura, koja je podrazumevala ozleđivanje stabljike izdanka ubadanjem sterilnom iglom, pokazala se

pogodnijom za transformaciju izdanaka sorte Melrouz, obezbeđujući efikasnost transformacije od 70,2% (Tabela 18). U slučaju sorte Zlatni Delišeš, efikasnost transformacije je bila značajno manja (2,8%), dok sorte Čadel i Gloster nije bilo moguće transformisati korišćenjem ove inokulacione procedure (Tabela 18). Međutim, sorte Zlatni Delišeš, Čadel i Gloster su uspešno transformisane pomoću drugog načina inokulacije, uranjanjem mesta preseka izdanka u bakterijsku suspenziju (Tabela 18). Na taj način, efikasnost transformacije je za sortu Zlatni Delišeš povećana na 39,3%, dok su sorte Čadel i Gloster transformisane sa efikasnošću od 30% i 10%, redom. Kod sorte Melrouz, druga inokulaciona procedura je bila znatno manje uspešna i rezultovala je efikasnošću transformacije od samo 3,3%. Može se zaključiti da je prva inokulaciona procedura pogodnija za genetičku transformaciju sorte Melrouz, a druga za transformaciju sorti Zlatni Delišeš, Čadel i Gloster.

Tabela 18. Regeneracija adventivnih korenova na izdancima jabuke sorti Melrouz, Zlatni Delišeš, Čadel i Gloster sedam nedelja nakon inokulacije izdanaka sojem *A. rhizogenes* 15834 *in vitro*, uz korišćenje dva načina inokulacije agrobakterija (I i II). Efikasnost transformacije = (ukupan broj linija potencijalno transformisanih korenova / broj inokulisanih izdanaka) x 100. PT - potencijalno transformisani korenovi.

Sorta	Broj inokuisanih izdanaka	Procenat izdanaka sa PT korenovima (%)	Ukupan broj linija PT korenova	Prosečan broj PT korenova po izdanku	Efikasnost transformacije (%)
Inokulacija ozleđivanjem stabljike izdanka (I)					
Melrouz	94	18,1	66	3,9	70,2
Zlatni Delišeš	36	2,8	1	1,0	2,8
Čadel	34	0,0	0	0,0	0,0
Gloster	31	0,0	0	0,0	0,0
Inokulacija uranjanjem mesta preseka izdanka u bakterijsku suspenziju (II)					
Melrouz	30	3,3	1	1,0	3,3
Zlatni Delišeš	28	39,3	11	1,0	39,3
Čadel	30	20,0	9	1,5	30,0
Gloster	30	10,0	3	1,0	10,0

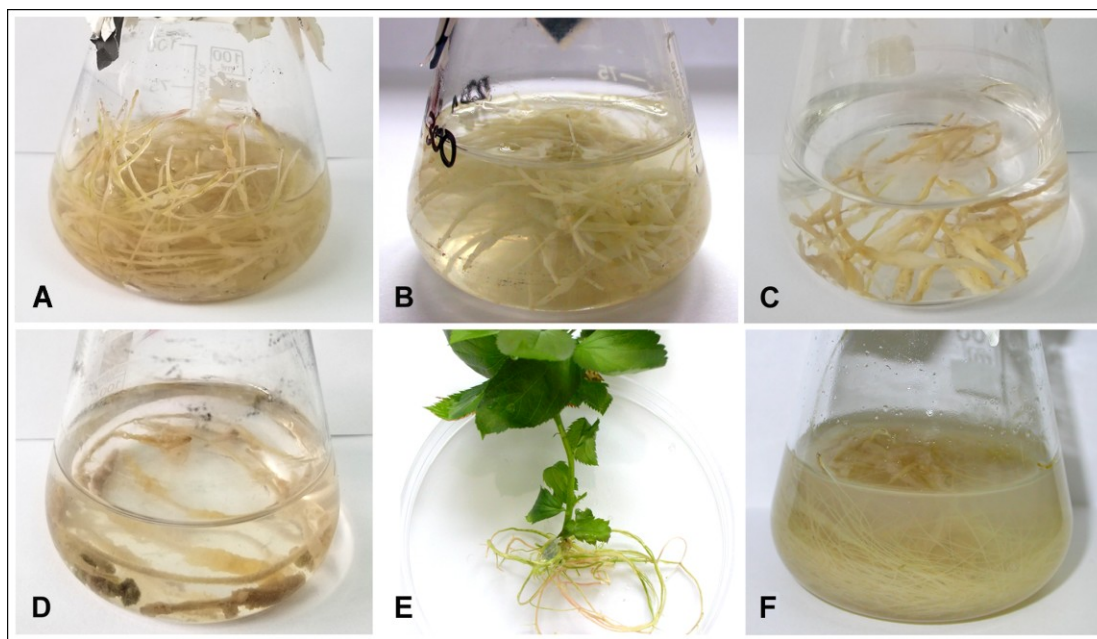
4.2.2. Uspostavljanje permanentne kulture potencijalno transformisanih korenova jabuke *in vitro*

Sedam nedelja nakon inokulacije, formirani adventivni korenovi koji su dostizali dužinu od 2 do 12 cm su isečeni u osnovi i skinuti sa izdanaka, a zatim dalje gajeni kao samostalne linije korenova u tečnoj MS podlozi sa dodatkom cefotaksima. Između linija korenova gajenih u tečnoj podlozi zapažene su znatne razlike u intenzitetu rastenja i sposobnosti formiranja lateralnih korenova. Manji broj linija se granao, formirajući masu lateralnih korenova i značajno uvećavajući biomasu (Slika 16A i B), dok se većina linija korenova odlikovala umerenim (Slika 116C) i sporim rastom (Slika 16D) koji se prvenstveno ogledao u izduživanju aksijalnog korena. Izvestan broj PT linija korenova (8) je potpuno prestao da raste ubrzo nakon odvajanja od izdanka ili tokom prva četiri meseca gajenja u tečnoj podlozi. Od ukupno 36 linija korenova inicijalno postavljenih u tečnu podlogu, samo 28 linija (Melrouz 7, Zlatni Delišes 12, Čadel 6, Gloster 3) se održalo u kulturi i bilo podvrgnuto molekularnoj karakterizaciji (Poglavlje 4.6.4.).

4.2.3. Uspostavljanje *in vitro* kulture netransformisanih (kontrolnih) korenova jabuke

S obzirom na to da kontrolni izdanci sve četiri sorte jabuke koji su tretirani ozleđivanjem izdanaka ili uranjanjem mesta preseka izdanaka u tečnu YEB podlogu koja nije sadržala agrobakterije, nisu formirali korenove, dobijanje netransformisanih korenova koji bi poslužili kao kontrola u daljem eksperimentalnom radu je postignuto ožiljavanjem izdanaka jabuke na čvrstoj MS podlozi koja je sadržala IBA, prema protokolu opisanom u Poglavlju 3.2.3. Korenovi dobijeni na ovakav način (Slika 16E) su odvajani od izdanaka i dalje samostalno gajeni u tečnoj MS podlozi bez regulatora rastenja ili uz dodatak IBA u koncentraciji od 0,5 mg L⁻¹. Kontrolni korenovi gajeni u podlozi bez regulatora rastenja nisu rasli i vrlo brzo su postali braonkasti, a zatim su i potpuno propali. Kod onih koji su gajeni u tečnoj podlozi sa 0,5 mg L⁻¹ IBA zapaženo je intenzivno kalusiranje na površini korenova kao i odvajanje ćelija epidermisa i korteksa što je dovodilo do znatnog zamućenja tečne hranljive podloge i stvaranje taloga u Erlenmajerima posle četiri nedelje kultivacije. Počev od druge subkultivacije u tečnu hranljivu podlogu istog sastava, pojava kalusa je

znatno smanjena i zapaženo je intenzivno formiranje velikog broja lateralnih korenova, što je ubrzo rezultiralo značajnim povećanjem biomase. Ubrzo je formiranje novih bočnih korenova usporeno, a rast kultura se prvenstveno zasnivao na izduživanju postojećih korenova. Tako formirane kulture netransformisanih kontrolnih korenova je odlikovalo prisustvo veoma tankih i izduženih korenova (Slika 16F), što ih je znatno razlikovalo od kultura potencijalno transformisanih korenova (Slika 16A-D). Nakon šest meseci, kulture kontrolnih korenova gajenih u tečnoj MS podlozi sa dodatkom $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA su značajno usporile rast, korenovi su postali žučkasti i prestali da se granaju, a na njihovoj površini se pojavila znatna količina kalusnog tkiva, nakon čega je ubrzo došlo i do njihovog potpunog propadanja.



Slika 16. Izgled potencijalno transformisanih linija korenova i netransformisanih kontrolnih korenova sorte Zlatni Delišeš. Transformisani korenovi intenzivnog rasta (linije ZD12 (A) i ZD1 (B)); umerenog rasta (linija ZD11 (C)) i slabog rasta (linija ZD3 (D)) nakon 16 nedelja gajenja u tečnoj MS podlozi bez regulatora rasta. Ožiljeni kontrolni izdanak (E); Netransformisani kontrolni koren odsečen sa izdanka prikazanog na slici (E) nakon 12 nedelja gajenja u tečnoj MS podlozi sa dodatkom IBA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (F).

4.2.4. Molekularna karakterizacija potencijalno transformisanih korenova jabuke

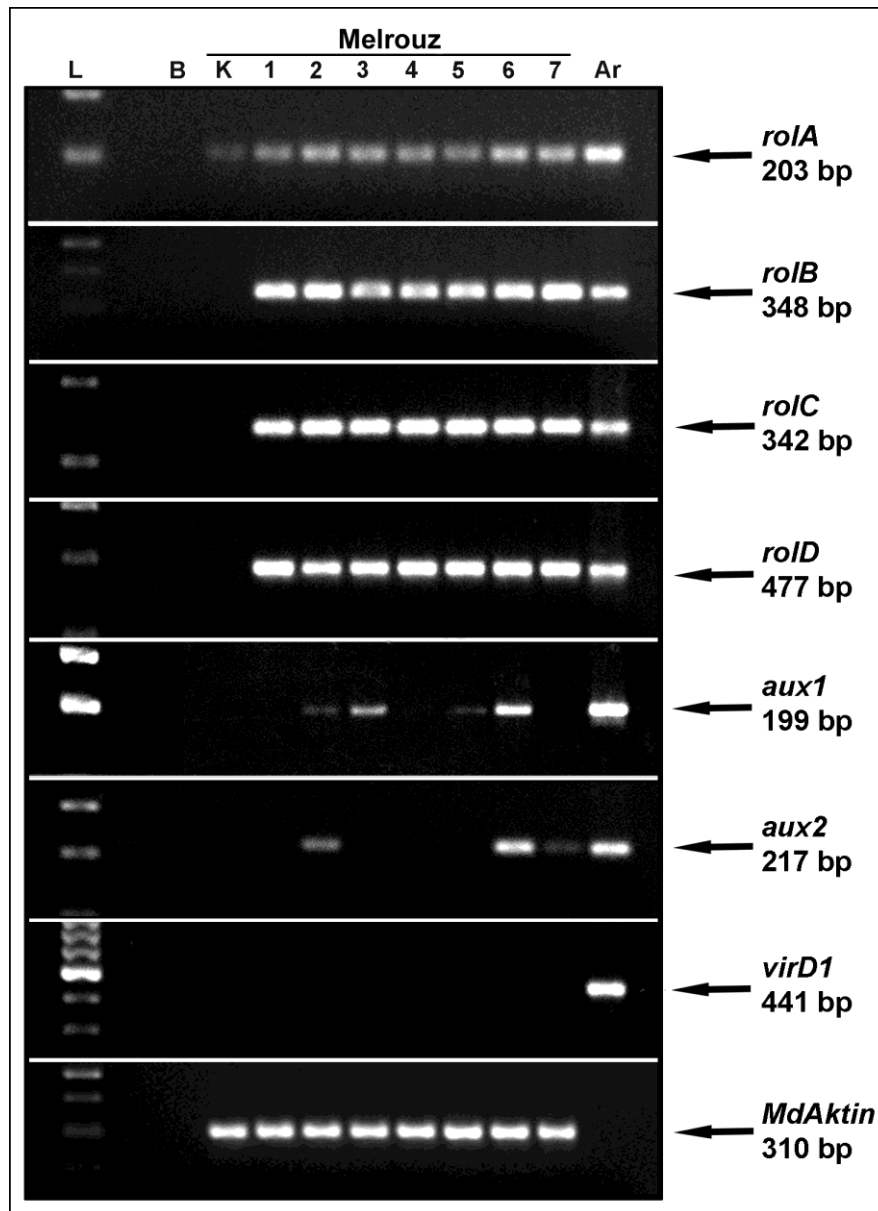
Ekspresija gena sa T_L- (*rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*) i T_R- (*aux1* i *aux2*) regiona Ri plazmida *A. rhizogenes* 15834 kod potencijalno transformisanih korenova jabuke sorti Melrouz, Zlatni Delišeš, Čadel i Gloster je potvrđena RT-PCR analizom. Odsustvo kontaminacije bakterijskom DNK je potvrđeno kod svih 28 PT linija korenova analizom ekspresije bakterijskog *virD1* gena koji se nalazi na Ri plazmidu van granica T-DNK. *VirD1*-specifičan signal nije bio detektovan ni kod jedne ispitivane linije (Tabela 19; Slike 17, 18, 19 i 20). Potvrda ekspresije *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD* gena kod svih PT linija je ukazala na integraciju kompletnog T_L-DNA regiona i nedvosmisleno potvrdila njihovu transgenu prirodu (Tabela 19; Slike 17, 18, 19 i 20) zbog čega su u tekstu dalje označavani kao transformisani korenovi (eng. *hairy root*, HR). Za razliku od *rol* gena, *aux1* i *aux2* geni su se ekspimirali samo kod pojedinih ispitivanih HR linija. Deset HR linija nije ekspimiralo ni jedan *aux* gen, dok je ekspresija oba *aux* gena detektovana kod dve HR linije sorte Melrouz (M2 i M6) i jedne HR linije sorte Zlatni Delišeš (ZD3) (Tabela 19). HR linije M3 i M5 su pokazivale ekspresiju samo *aux1* gena, dok je pojedinačna ekspresija *aux2* gena zabeležena kod ukupno 13 HR linija različitih sorti jabuke (Tabela 19). Neočekivano, signal slabog intenziteta za *rolA* gen je detektovan i kod netransformisanih kontrolnih korenova sorte Melrouz, za *rolC* kod sorti Zlatni Delišeš i Gloster i *rolD* kod kontrolnih korenova sorti Čadel i Gloster (Tabela 19; Slike 17, 18, 19 i 20).

Tabela 19. RT-PCR analiza ekspresije *rol*, *aux* i *virD1* gena kod potencijalno transformisanih linija korenova sorti Melrouz (M1-7), Zlatni Delišeš (ZD1-12), Gloster (G1-3) i Čadel (Č1-6) dobijenih transformacijom sa *A. rhizogenes* 15834. PK - pozitivna kontrola (*A. rhizogenes* 15834); NK - negativna kontrola (netransformisani korenovi); referentni gen - *MdAktin*.

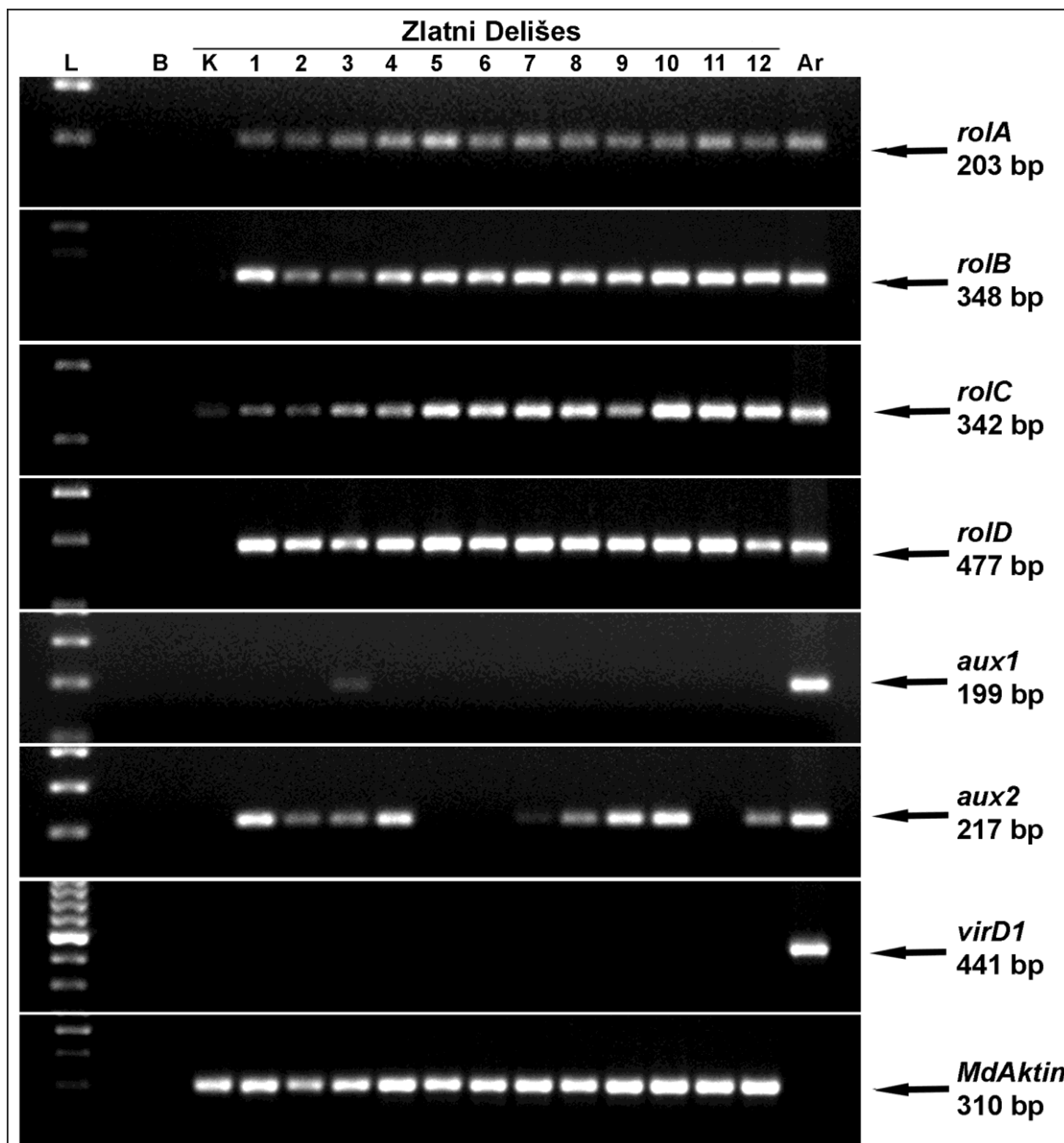
Linije korenova	T _L -DNA				T _R -DNA		<i>virD1</i>	<i>MdAktin</i>
	<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>	<i>rolD</i>	<i>aux1</i>	<i>aux2</i>		
PK	+	+	+	+	+	+	+	-
NK M	+	-	-	-	-	-	-	+
NK ZD	-	-	+	-	-	-	-	+
NK Č	-	-	-	+	-	-	-	+
NK G	-	-	+	+	-	-	-	+

Nastavak Tabele 19.

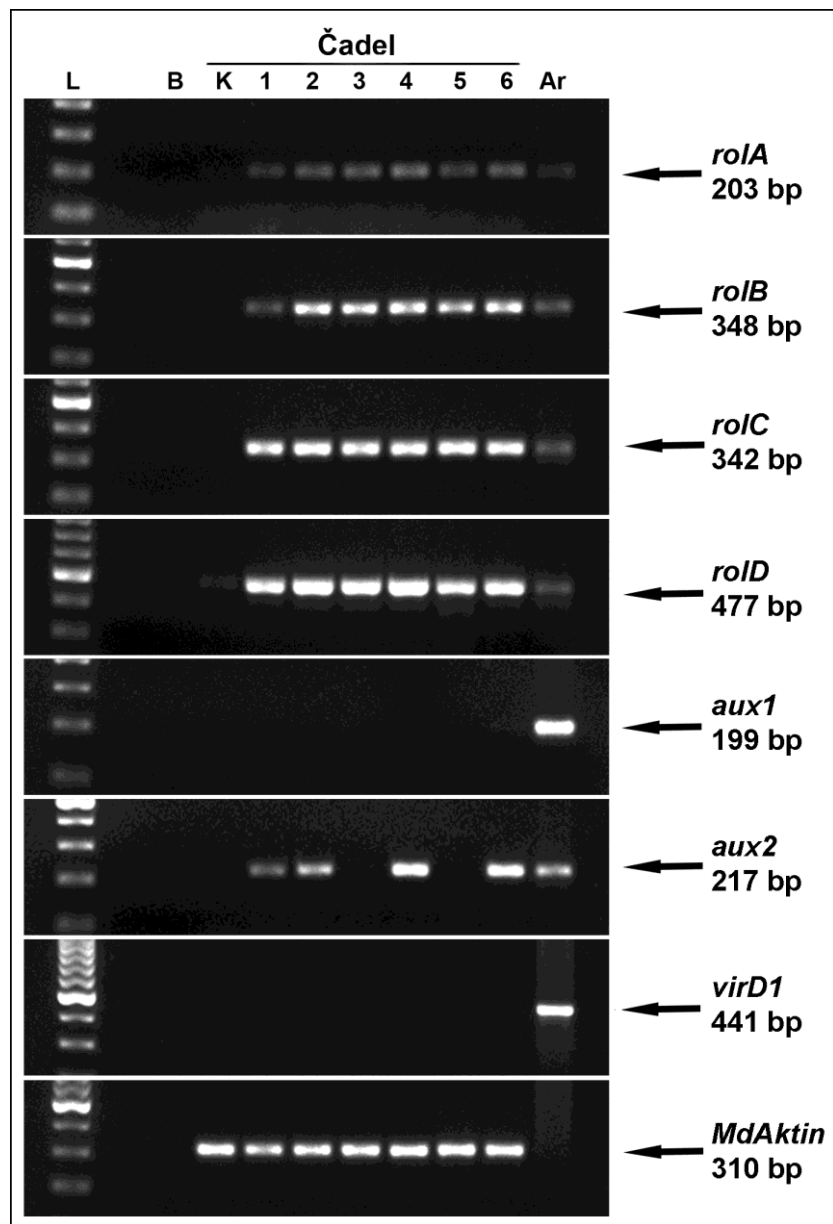
Linije korenova	T _L -DNA				T _R -DNA		<i>virD1</i>	<i>MdAktin</i>
	<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>	<i>rolD</i>	<i>aux1</i>	<i>aux2</i>		
M1	+	+	+	+	-	-	-	+
M2	+	+	+	+	+	+	-	+
M3	+	+	+	+	+	-	-	+
M4	+	+	+	+	-	-	-	+
M5	+	+	+	+	+	-	-	+
M6	+	+	+	+	+	+	-	+
M7	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD1	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD2	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD3	+	+	+	+	+	+	-	+
ZD4	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD5	+	+	+	+	-	-	-	+
ZD6	+	+	+	+	-	-	-	+
ZD7	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD8	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD9	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD10	+	+	+	+	-	+	-	+
ZD11	+	+	+	+	-	-	-	+
ZD12	+	+	+	+	-	+	-	+
Č1	+	+	+	+	-	+	-	+
Č2	+	+	+	+	-	+	-	+
Č3	+	+	+	+	-	-	-	+
Č4	+	+	+	+	-	+	-	+
Č5	+	+	+	+	-	-	-	+
Č6	+	+	+	+	-	+	-	+
G1	+	+	+	+	-	-	-	+
G2	+	+	+	+	-	-	-	+
G3	+	+	+	+	-	-	-	+



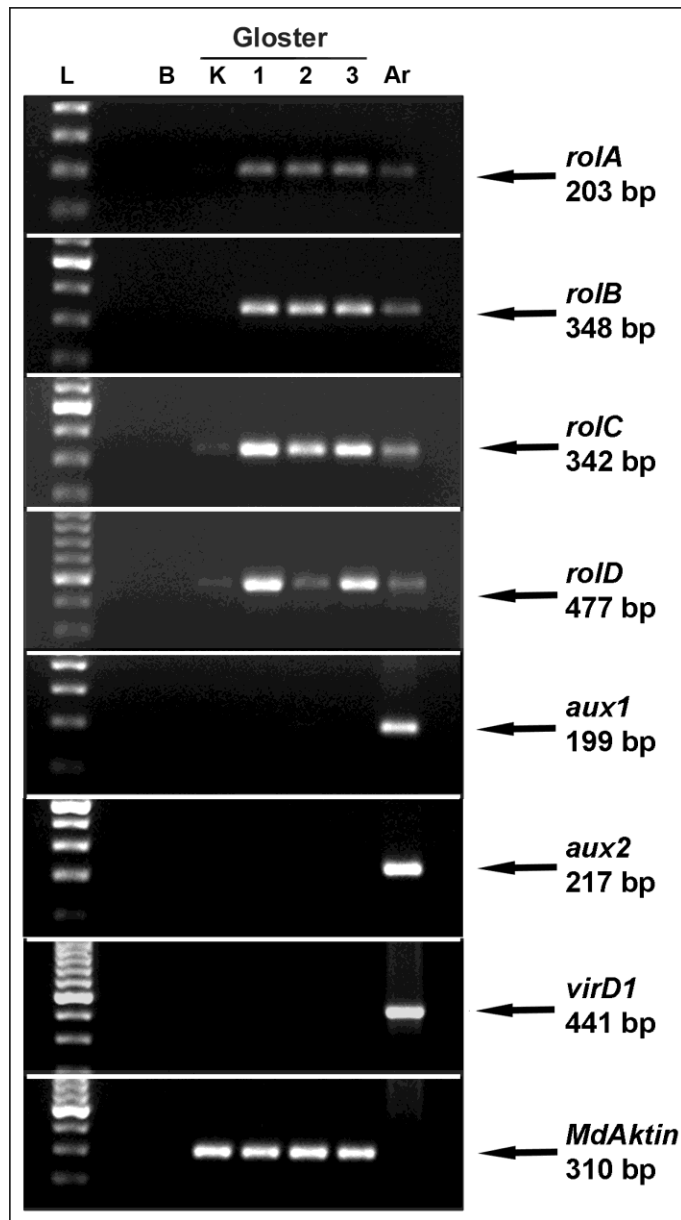
Slika 17. Ekspresija *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *aux1*, *aux2*, *virD1* i *MdAktin* gena u kontrolnim i transformisanim (HR) korenovima jabuke sorte Melrouz. L: DNK standard (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific), B: negativna kontrola PCR reakcije (blank), K: netransformisana kontrola, 1-7: potencijalne transformisane HR linije, Ar: pozitivna kontrola (*A. rhizogenes*).



Slika 18. Ekspresija *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *aux1*, *aux2*, *virD1* i *MdAktin* gena u kontrolnim i transformisanim (HR) korenovima jabuke sorte Zlatni Delišes. L: DNK standard (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific), B: negativna kontrola PCR reakcije (blank), K: netransformisana kontrola, 1-12: potencijalne transformisane HR linije, Ar: pozitivna kontrola (*A. rhizogenes*).



Slika 19. Ekspresija *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *aux1*, *aux2*, *virD1* i *MdAktin* gena u kontrolnim i transformisanim (HR) korenovima jabuke sorte Čadel. L: DNK standard (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific), B: negativna kontrola PCR reakcije (blank), K: netransformisana kontrola, 1-6: potencijalne transformisane HR linije, Ar: pozitivna kontrola (*A. rhizogenes*).



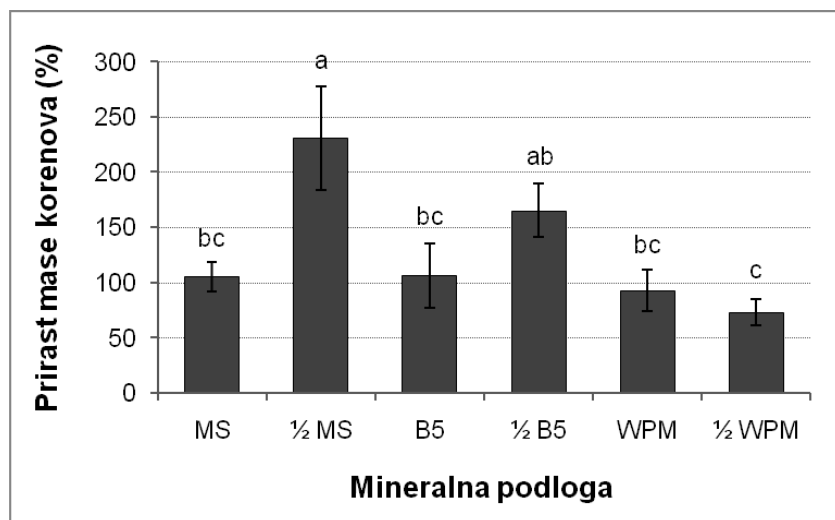
Slika 20. Ekspresija *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, *aux1*, *aux2*, *virD1* i *MdAktin* gena u kontrolnim i transformisanim (HR) korenovima jabuke sorte Gloster. L: DNK standard (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific), B: negativna kontrola PCR reakcije (blank), K: netransformisana kontrola, 1-3: potencijalne transformisane HR linije, Ar: pozitivna kontrola (*A. rhizogenes*).

4.2.5. Optimizacija uslova za gajenje transformisanih korenova *in vitro*

Uprkos konstantnom rastu svih preživelih HR linija, većinu njih je odlikovao mali prirast biomase tokom jedne subkulture. U cilju optimizacije uslova za povećanje prirasta biomase, ispitan je efekat nekoliko hranljivih tečnih podloga različitog mineralnog sastava (Slika 21), kao i tipa i koncentracije odabranih auksina (IBA i NAA) (Slika 22) na prirast mase transformisanih korenova. S obzirom da je linija ZD12 (Slika 16A) pokazivala zadovoljavajući rast i u tečnoj MS podlozi bez regulatora rastenja, mogla je obezbediti dovoljnu količinu početnog materijala za sprovođenje eksperimenta i zato je upravo ona izabrana kao najpogodnija za analize prirasta biomase.

4.2.5.1. Efekat hranljivih podloga različitog mineralnog sastava

Korenovi linije ZD12 su gajeni u hranljivim tečnim podlogama različitog sastava mikro- i makro- soli (MS, WPM, B5), kao i u njihovim polu-razblaženim varijantama ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{2}$ WPM i $\frac{1}{2}$ B5) (Slika 21).



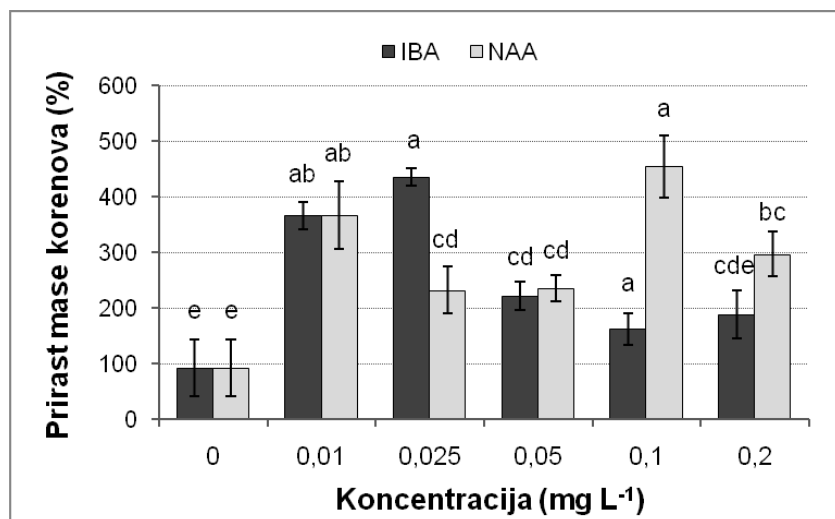
Slika 21. Prirast mase transformisanih korenova linije ZD12 nakon šest nedelja gajenja u hranljivim tečnim podlogama različitog mineralnog sastava: MS (Murashige i Skoog, 1962), modifikovanoj WPM (Lloyd i McCown, 1980, eng. *Woody Plant Medium*) i B5 (Gamborg i sar, 1968) i njihovim polu-razblaženim varijantama ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{2}$ WPM i $\frac{1}{2}$ B5). Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) tri ponavljanja za svaki tretman ponovljen u dva nezavisna eksperimenta (n=6). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

Tokom prve dve nedelje gajenja rast korenova u svim ispitivanim tečnim podlogama je bio relativno slab. Međutim, nakon inicijalnog perioda stagnacije, korenovi su počeli da se granaju i da rastu intenzivnije, pogotovo u $\frac{1}{2}$ MS i $\frac{1}{2}$ B5 tečnim podlogama. Nakon šest nedelja rasta na različitim hranljivim podlogama, najveći prirast korenova je ostvaren na $\frac{1}{2}$ MS podlozi (231%) u poređenju sa podlogama drugog mineralnog sastava (165% i niže). Iako na osnovu ANOVA ne postoji statistički značajna razlika u prirastu mase korenova između tretmana $\frac{1}{2}$ MS i $\frac{1}{2}$ B5, korenovi gajeni u $\frac{1}{2}$ B5 tečnoj podlozi su tokom druge subkultivacije postepeno dobijali braonkastu obojenost. Stoga je podloga koja je sadržala dvostruko razblažen MS mineralni rastvor ($\frac{1}{2}$ MS) odabrana za dalje gajenje i održavanje svih transformisanih linija.

4.2.5.2. Efekat egzogeno dodatih auksina na rast transformisanih korenova jabuke

U cilju dalje optimizacije uslova za gajenje transformisanih korenova jabuke i povećanje prirasta biomase, ispitivan je efekat auksina IBA i NAA u rastućim koncentracijama (0,01; 0,025; 0,05; 0,1 ili 0,2 mg L⁻¹) dodatih u hranljivu tečnu MS podlogu, na rast korenova linije ZD12 (Slika 22). Sve primenjene koncentracije auksina imale su statistički značajan pozitivan efekat na rast korenova jabuke. Najveći prirast mase zabeležen je kod korenova gajenih u tečnoj podlozi sa 0,1 mg L⁻¹ NAA (455%) i 0,025 mg L⁻¹ IBA (435%) u odnosu na MS podlogu bez regulatora rastežja (93%). Uprkos intenzivnom rastežju tokom prve četiri nedelje kultivacije u tečnoj podlozi sa 0,1 mg L⁻¹ NAA, dalja kultivacija je dovodila do zadebljavanja korenova i obrazovanja znatne količine kalusnog tkiva koje je onemogućilo dalje formiranje lateralnih korenova. Uopšte, pojava kalusa na korenovima je bila indukovana dodavanjem oba auksina, a stepen kalusiranja je bio proporcionalan njihovoj koncentraciji. Kalusiranje je bilo izraženije u prisustvu NAA, nego u prisustvu IBA primenjene u istoj koncentraciji. Stoga se primena IBA u niskim koncentracijama (0,01 - 0,025 mg L⁻¹) pokazala kao pogodnija za stimulaciju rasta i povećanje prirasta biomase transformisanih korenova jabuke. Međutim, produžena subkultivacija na niskim koncentracijama ovog auksina je takođe uzrokovala kalusiranje što je dalje znatno usporavalo rast korenova. Iz tog razloga, niske doze IBA su korišćene samo za kratkotrajnu inicijalnu stimulaciju rasta izolovanih korenova, dok je za dalje uzgajanje

upotrebljavana ½MS tečna podloga bez regulatora rastenja. Za stimulaciju sporo-rastućih linija primenjavana je smena pomenute podloge i podloge sa IBA u kraćim vremenskim intervalima od nekoliko subkultura.



Slika 22. Prirast mase transformisanih korenova linije ZD12 nakon šest nedelja gajenja u tečnoj MS podlozi sa IBA i NAA u rastućim koncentracijama od 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 ili 0,2 mg L⁻¹. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) tri ponavljanja za svaki tretman ponovljen u dva nezavisna eksperimenta (n=6). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$.

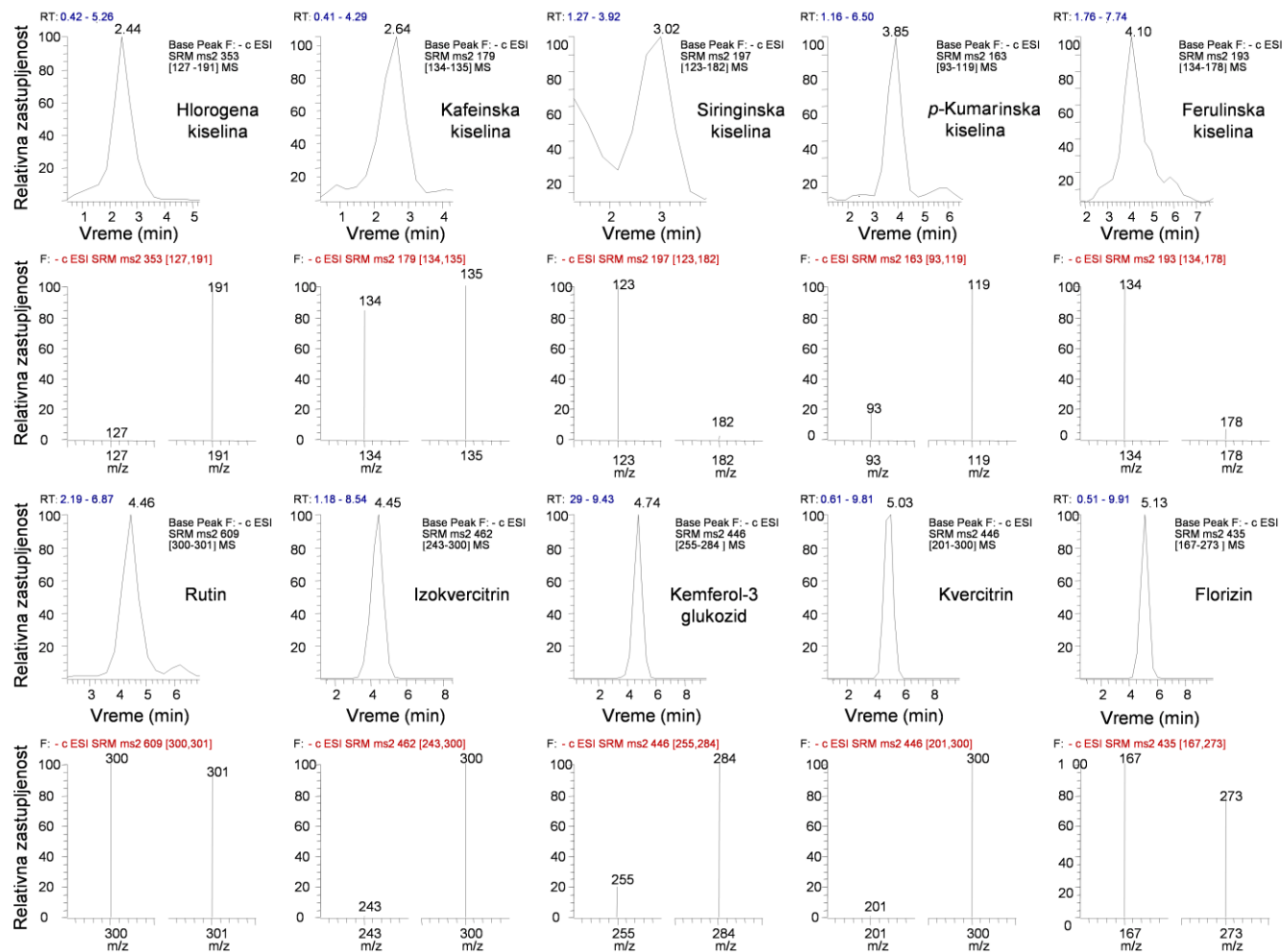
4.3. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u transformisanim korenovima linije ZD12 i u hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni

Analiza prisustva fenolnih jedinjenja i to: fenolnih kiselina (hlorogene, kafeinske, siringinske, *p*-kumarinske i ferulinske), glikozilovanih flavonoida (florizina, rutina, kvercitrina, izokvercitrina i kemferol-3-glukozida) i aglikona flavonoida (floreтина, kvercetin i naringenina) u kontrolnim netransformisanim korenovima sorte Zlatni Delišes, transformisanim korenovima linije ZD12 i tečnoj podlozi u kojoj su transformisani korenovi gajeni, urađena je korišćenjem UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS analize (Slike 23 i 24).

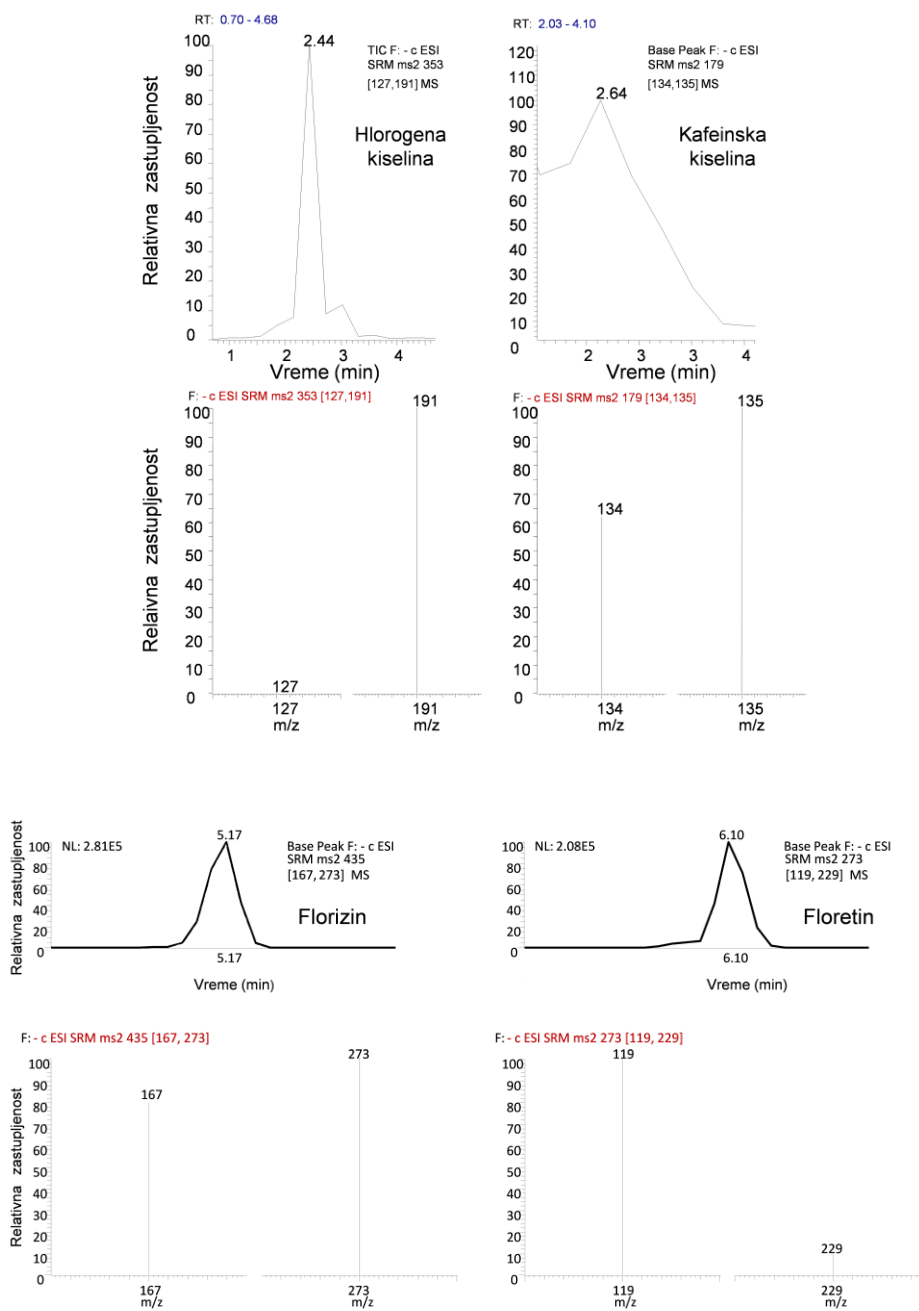
Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike između srednjih vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja u netransformisanim (kontrolnim) korenovima i

transformisanim korenovima linije ZD12 (Tabela 20). U oba slučaja, florizin je detektovan kao dominantno fenolno jedinjenje (1763,83 ng mg⁻¹ i 2643,60 ng mg⁻¹ DW korena, redom), čiji je sadržaj od 100 do 1000 puta veći nego sadržaj ostalih fenolnih jedinjenja. Za razliku od florizina, njegov aglikon floretin nije detektovan u tkivu korenova, dok su ostala dva aglikona, kvercetin i naringenin, bila prisutna samo u tragovima i nije ih bilo moguće kvantifikovati.

U tečnoj ½MS hranljivoj podlozi u kojoj su četiri nedelje gajeni ZD12 korenovi detektovano je sedam od 12 fenolnih jedinjenja detektovanih u tkivu korena, ali je samo četiri od njih (hlorogena i kafeinska kiselina, florizin i floretin) bilo moguće i kvantifikovati (Tabela 20). Hlorogena i kafeinska kiselina su bile jedine fenolne kiseline koje su eksudovane u hranljivu podlogu. Međutim, njihove koncentracije su bile približno petostruko niže nego one detektovane u korenu. Količina florizina u podlozi (3,34 ng mg⁻¹ DW korena) je bila reda veličine ostalih kvantifikovanih jedinjenja, ali približno 500 puta manja od količine ovog dihidrohalkona utvrđene u transformisanom korenu. Za razliku od korena u kome nije detektovan, floretin je u tečnoj podlozi detektovan u količini sličnoj količini florizina.



Slika 23. SRM (eng. *Single Reaction Monitoring*) hromatogrami i odgovarajući MS/MS spektri hlorogene, kafeinske kiseline, siringinske, *p*-kumarinske kiseline, rutina, izokvercitrina, kemferol-3-glukozida, kvercitrina i florizina u metanolnim ekstraktima transformisanih korenova linije ZD12.



Slika 24. SRM (eng. *Single Reaction Monitoring*) hromatogrami i odgovarajući MS/MS spektri hlorogene i kafeinske kiseline, florizina i floretina u metanolnim ekstraktima liofilizovane tečne hranljive podloge u kojoj su gajeni transformisani korenova linije ZD12.

Tabela 20. Sadržaj fenolnih jedinjenja u netransformisanim (kontrolnim) korenovima sorte Zlatni Delišes, transformisanim korenovima linije ZD12 i tečnoj hranljivoj podlozi u kome su gajani transformisani korenovi linije ZD12 u periodu od četiri nedelje. Podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) tri biološka ponavljanja. Srednje vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja u netransformisanim (kontrolnim) korenovima i transformisanim korenovima linije ZD12 se statistički značajno ne razlikuju prema *t*-testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. nd = nije detektovano, t = detektovano samo u tragovima.

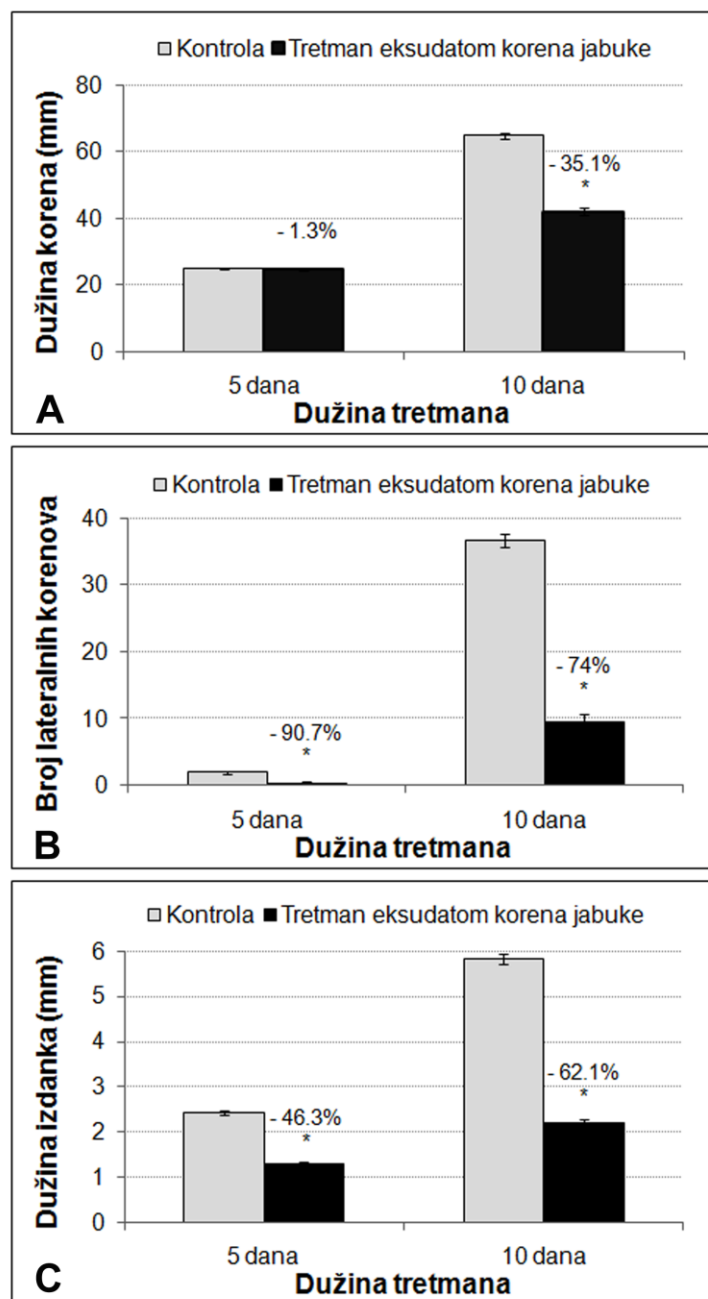
	Sadržaj fenolnih jedinjenja u korenu (ng mg ⁻¹ DW)		Sadržaj fenolnih jedinjenja eksudovanih u tečnu podlogu po mg suve mase transformisanog korena (ng mg ⁻¹ DW)	Sadržaj fenolnih jedinjenja po mL tečne podloge u kojoj su gajeni transformisani korenovi (ng mL ⁻¹)
	Netransformisan koren	Transformisani koren		
Hlorogena kiselina	22,10 ± 0,27	22,10 ± 1,70	4,08 ± 0,62	8,82 ± 0,68
Kafeinska kiselina	29,99 ± 0,68	29,40 ± 1,31	6,71 ± 0,87	14,58 ± 0,83
Siringinska kiselina	7,17 ± 0,08	6,58 ± 0,11	nd	nd
<i>p</i> -kumarinska kiselina	38,34 ± 0,18	38,37 ± 0,92	nd	nd
Ferulinska kiselina	6,16 ± 1,51	3,84 ± 0,71	nd	nd
Florizin	1763,83 ± 343,65	2643,60 ± 241,93	3,34 ± 0,73	7,49 ± 1,86
Floretin	nd	nd	3,60 ± 0,29	8,01 ± 1,05
Rutin	10,87 ± 0,21	10,84 ± 0,28	nd	nd
Izokvercitrin	2,03 ± 0,25	1,51 ± 0,59	t	t
Kemferol-3-glukozid	0,64 ± 0,36	1,71 ± 0,40	nd	nd
Kvercitrin	8,29 ± 1,98	5,32 ± 0,52	nd	nd
Kvercetin	t	t	t	t
Naringenin	t	t	t	t

4.4. Efekat eksudata transformisanih korenova linije ZD12 na klijanje, rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana*

Eksudat transformisanih korenova (EK) linije ZD12, sadržan u tečnoj hranljivoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi u kojoj su ovi korenovi bili gajeni i kojom su tretirana semena test biljke *A. thaliana*, nije ispoljio uticaj na stopu klijanja semena, odnosno, i kontrolna i tretirana semena su proključala sa stopom klijanja od 100%. Međutim, značajan efekat EK je zapažen na rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana* (Slika 24).

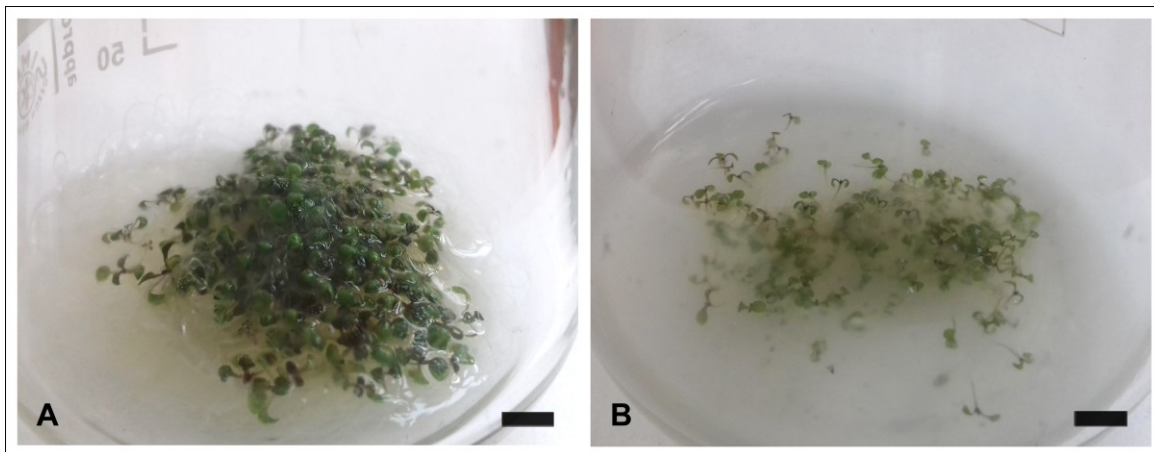
Pet dana nakon izlaganja semena uslovima dugog dana nije uočena statistički značajna razlika u dužini korena kod kontrolnih i tretiranih klijanaca. Međutim, u narednih pet dana inhibitorski uticaj EK je bio sve izraženiji rezultujući skraćivanjem dužine korena od 35,1% u odnosu na kontrolu (Slika 24A). Pet dana nakon iznošenja semena iz mraka kod kontrolnih klijanaca je primećena pojava prvih lateralnih korenova i to u proseku 1,94 korenova/klijancu. Lateralni korenovi su se pretežno razvijali u gornjoj trećini aksijalnog korena, bliže osnovi izdanka i bili su tanki, kratki, beli i bez vidljivih korenskih dlačica. Klijanci tretirani eksudatom korena jabuke u tom periodu su veoma retko razvijali lateralne korenove, svega u proseku 0,18 korenova/klijancu (Slika 21B). Tokom narednih pet dana, veći broj tankih lateralnih korenova se razvio i na tretiranim klijancima (9,6 korenova/klijancu). Međutim, ovi korenovi su bili znatno kraći, nerazgranati i posedovali su manje korenskih dlačica nego brojni lateralni korenovi razvijeni kod kontrolnih klijanaca (36,8 korenova/klijancu) (Slika 21B). Očigledno da tretman eksudatom korena jabuke, ne samo što je uticao na smanjenje broja lateralnih korenova kod klijanaca arabidopsisa za 74% u odnosu na kontrolu (Slika 21B), nego je znatno uticao i na njihovu morfologiju.

Tretman eksudatom transformisanih korenova jabuke je značajno uticao i na smanjenje ukupne dužine izdanaka klijanaca *A. thaliana*. Petog dana tretmana, izdanci klijanaca tretiranih sa EK su bili skoro dvostruko kraći nego izdanci kontrolnih klijanaca, a ta razlika je postala još izraženija (62,1%) na kraju eksperimenta, odnosno nakon deset dana tretmana (Slika 24C).



Slika 25. Efekat eksudata transformisanih korenova jabuke linije ZD12, sadržan u tečnoj podlozi u kojoj su gajeni korenovi, na dužinu korena (A), broj lateralnih korenova (B) i dužinu izdanka (C) klijanaca *A. thaliana* nakon petodnevnog i desetodnevnog tretmana. Kontrolni tretman sadrži ½MS tečnu podlogu. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) tri ponavljanja sa po 10 eksplantata za svaki tretman ponavljen u dva nezavisna eksperimenta (n=60). Srednje vrednosti obeležene zvezdicom se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu prema *t*-testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Brojevi iznad histograma predstavljaju procenat inhibicije (-)/stimulacije (+) u odnosu na kontrolu i izračunati su kako je opisano u Poglavlju 3.4.3.

Pet dana nakon izlaganja semena uslovima dugog dana, klijanaci koji su rasli na kontrolnoj podlozi imali su formiranu lisnu rozetu koju su pored kotiledona činila dva potpuno razvijena lista i drugi par listova koji se razvijao iz vršnog pupoljka. Za razliku od njih, tretirani klijanaci su imali samo kotiledone bleđe boje i lisne površine sitnije od kotiledona netretiranih klijanaca (Slika 25).



Slika 25. Efekat eksudata transformisanih korenova jabuke linije ZD12 na rastenje i razvoj klijanaca *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana. Kontrolni tretman sadrži tečnu hranjivu $\frac{1}{2}$ MS podlogu (A) umesto $\frac{1}{2}$ MS podloge u kojoj je transformisani koren linije ZD12 gajen četiri nedelje (B). Bar = 5 mm.

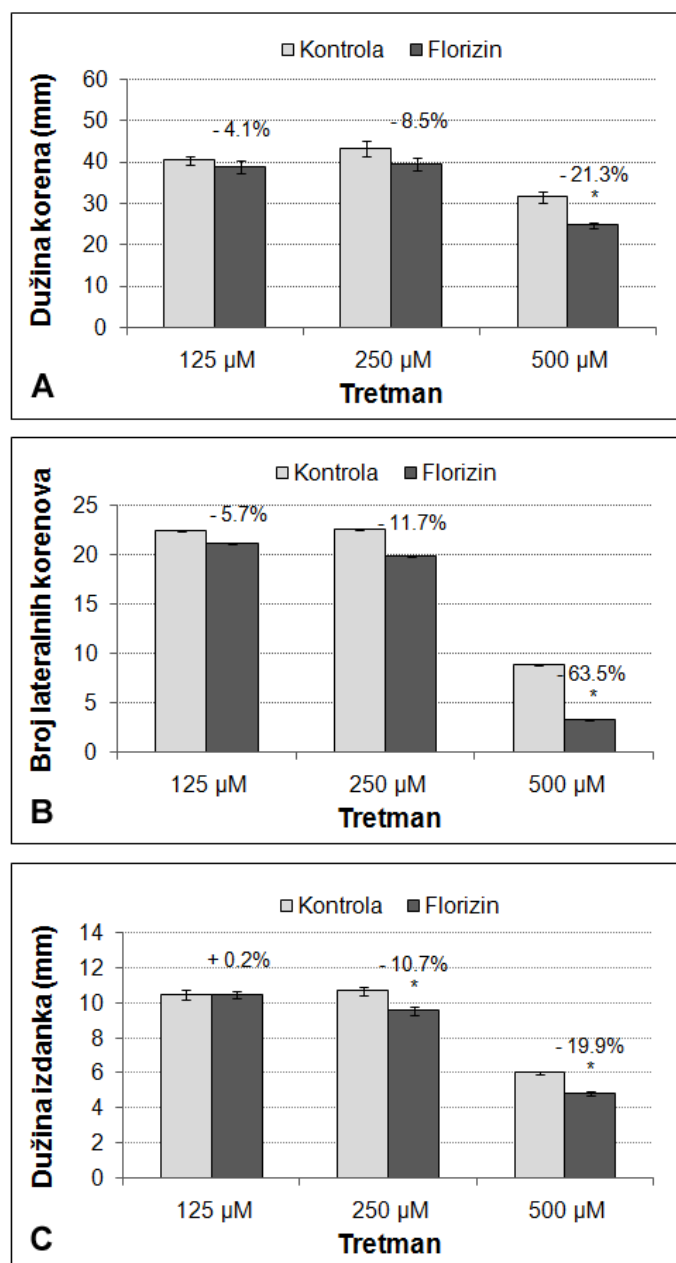
4.5. Efekat dihidrohalkona florizina i floretina na klijanje, rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana*

Kako su dihidrohalkon florizin i njegov aglikon floretin, uz hlorogenu i kafeinsku kiselinu, jedina fenolna jedinjenja koja su eksudovana iz tkiva korena jabuke u tečnu hranjivu podlogu u kojoj su korenovi gajeni (Poglavlje 4.7), u daljem radu je ispitivana njihova potencijalna uloga u ostvarenoj inhibiciji rasta klijanaca arabidopsisa koji su bili tretirani tečnom hranjivom podlogom u kojoj su gajeni transformisani korenovi. U tu svrhu klijaneci su tretirani čistim supstancama florizinom i floretinom u rastućim koncentracijama (125, 250 i 500 μ M).

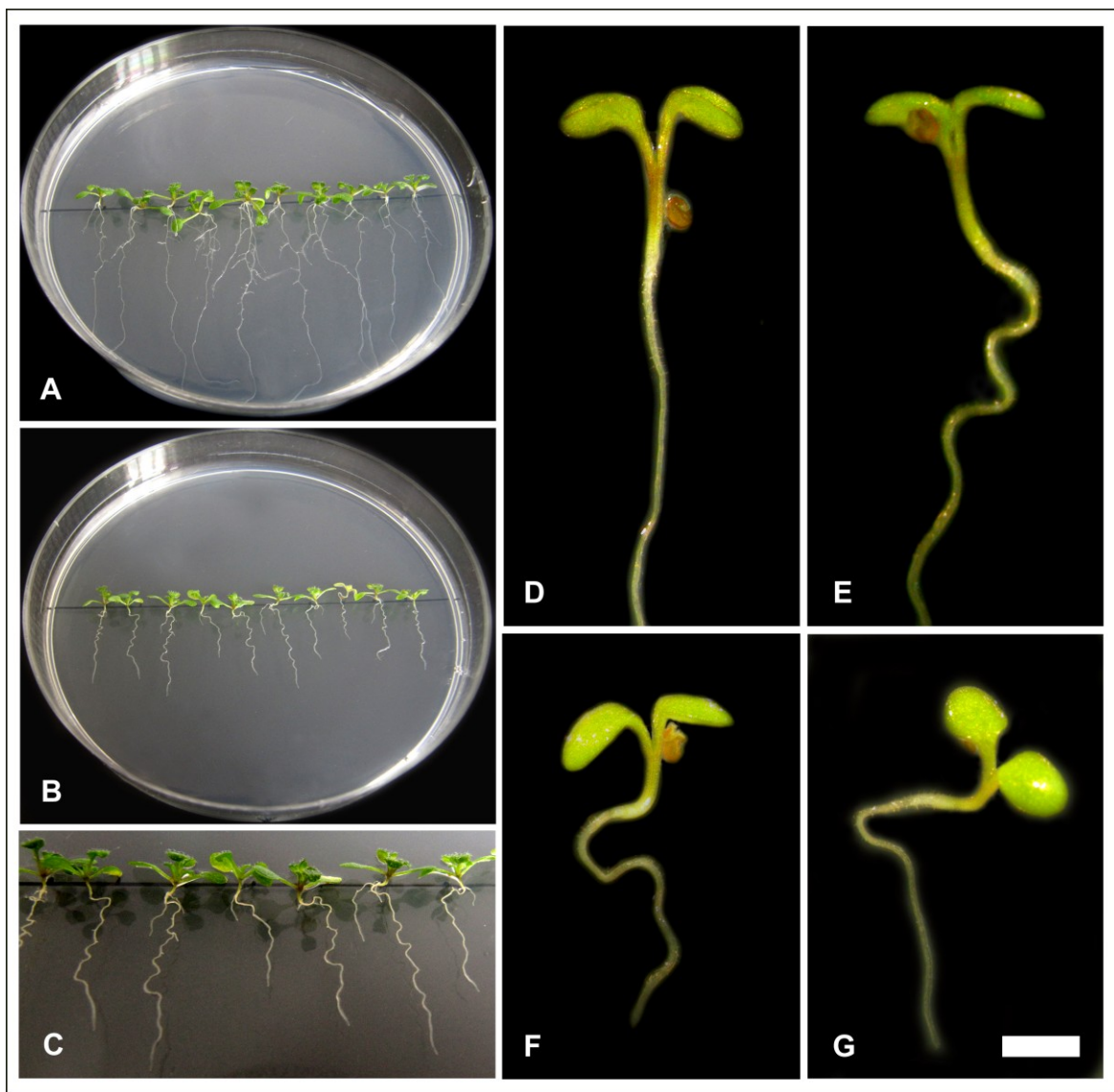
4.5.1. Efekat florizina

Florizin, primenjen u koncentracijama od 125, 250 i 500 μM , nije ispoljio efekat na klijanje semena arabidopsisa s obzirom da su semena na svim tretmanima, kao i ona kontrolna, imala stopu klijanja od 100%. Medjutim, uočen je negativan efekat na rastenje i razviće klijanaca arabidopsisa koji je zavisio od primenjene koncentracije florizina. Florizin u koncentracijama od 125 μM i 250 μM nije imao statistički značajan uticaj na merene parametre rastenja i razvića korena klijanaca. Nakon 10 dana tretmana florizinom u pomenutim koncentracijama, primećena je blaga inhibicija izduživanja korena (4,1% i 8,5%, redom) (Slika 26A), dok je prosečan broj lateralnih korenova bio umanjen za 5,7% i 11,7%, redom (Slika 26B). Korenovi su bili tanki, beli sa dobro razvijenim korenovim dlačicama gusto raspoređenim čitavom dužinom aksijalnog i bočnih korenova. Najintenzivniji tretman florizinom od 500 μM ispoljio je statistički značajan inhibitorski efekat na dužinu korena (21,3%) (Slika 26A), kao i na prosečan broj lateralnih korenova (63,5%) (Slika 26B), u poređenju sa kontrolom. Negativan efekat florizina se odrazio i na dužinu izdanka klijanaca. Tretmani sa 250 μM i 500 μM floretinom su doveli do statistički značajnog smanjenja dužine izdanka od 10,7% i 19,9%, redom (Slika 26C).

Za razliku od netretiranih (kontrolnih) klijanaca (Slika 27A), koje je odlikovao pravolinijski rast i normalan gravitropski odgovor, tretman florizinom je doveo do pojave specifičnog sinusoidnog izgleda aksijalnog korena sa veoma retkim i kratkim lateralnim korenovima (Slika 27B i C). Ovaj fenomen je zapažen kod klijanaca starosti tri do četiri dana, kod kojih se za razliku od kontrolnih (Slika 27D), već tada mogao uočiti specifičan izgled korena, dok su kotiledoni bili neizmenjeni (Slika 27E i F). Kod pojedinih klijanaca zabeležen je horizontalan rast radikule i hipokotila tokom prva dva dana nakon klijanja embriona. Ovakav agravitropski rast hipokotila je rezultirao specifičnim oblikom četvorodnevnih klijanaca, kod kojih su koren i izdanak bili savijeni pod uglom od 90° u odnosu na horizontalno postavljenu glavnu osu klijanca (Slika 27G).



Slika 26. Efekat florizina na dužinu korena (A), broj lateralnih korenova (B) i dužinu izdanka klijanaca *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana. Kontrolni tretman je sadržao istu količinu rastvarača DMSO koliko i odgovarajući tretman florizinom (0,06%; 0,12% i 0,24% (v/v) DMSO za tretmane sa 125 µM, 250 µM i 500 µM florizinom, redom). Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) tri ponavljanja sa po 10 klijanaca za svaki tretman ponavljen u tri nezavisna eksperimenta ($n=90$). Srednje vrednosti obeležene zvezdicom se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu prema *t*-testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Brojevi iznad histograma predstavljaju procenat inhibicije (-)/stimulacije (+) u odnosu na kontrolu i izračunati su kako je opisano u Poglavlju 3.4.3.



Slika 27. Uticaj 500 μM florizina na rastenje i razvoj klijanaca *A. thaliana*. Klijanci gajeni 10 dana na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez florizina (kontrola) (A), bar = 14 mm (bar za slike A-G je prikazan na slici G) ili sa dodatkom 500 μM florizina (B), bar = 11 mm, i (C) bar = 5 mm; Četiri dana stari klijanci na kontrolnoj podlozi (D) i podlozi sa 500 μM florizinom (E-G), bar = 1 mm.

4.5.2. Efekat floretina

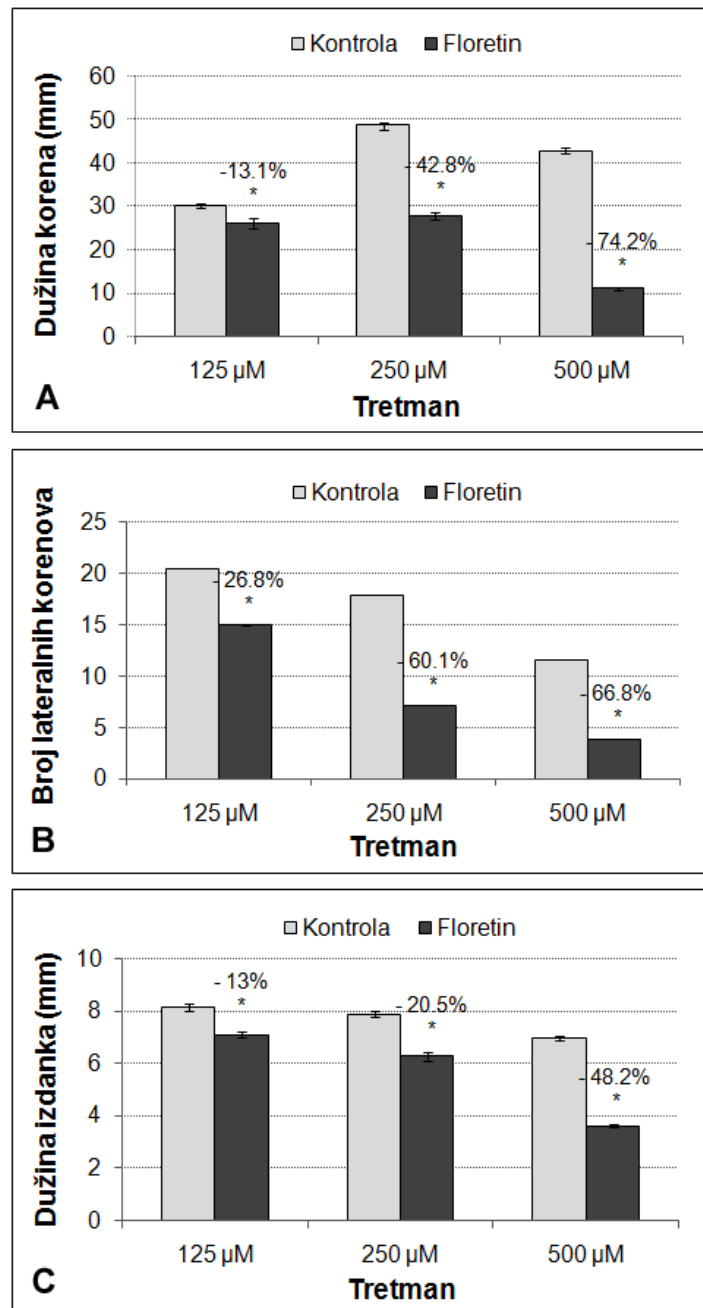
Stopa klijavosti semena arabidopsisa od 100% je ukazala na odsustvo uticaja floretina na klijanje semena ove test biljke. Međutim, evidentan je bio njegov negativan efekat u svim primenjenim koncentracijama (125, 250 i 500 μM) na razvoj klijanaca.

Koren klijanaca tretiranih 125 μ M floretinom je bio za 13,1% manje dužine od kontrolnog (Slika 28A) i posedovao je u proseku 15 bočnih korenova, što predstavlja smanjenje za 26,8% u odnosu na kontrolu (20,5 bočnih korenova) (Slika 28B). U isto vreme dužina izdanaka tretiranih klijanaca (7,1 mm) je bila manja u poređenju sa dužinom kontrolnih klijanaca (8,2 mm) (Slika 28C).

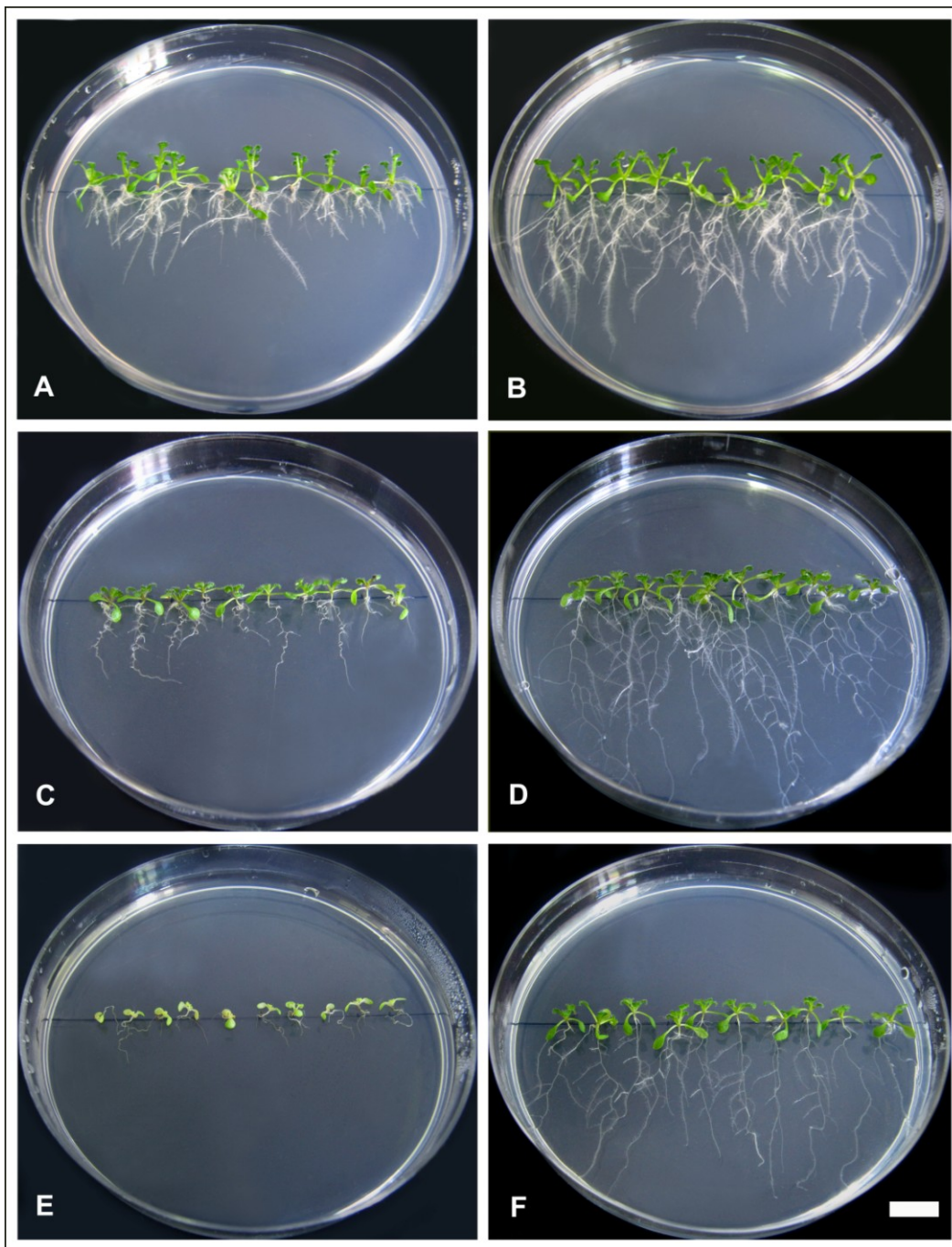
Tretman sa dvostruko većom koncentracijom floretina (250 μ M) je doveo do više od dvostrukog povećanja stepena inhibicije kod svih merenih parametara. Tako je dužina korena smanjena za 42,8% (Slika 28A), a broj lateralnih korenova za 60,1% (Slika 28B). Rastenje izdanaka je takođe bilo inhibirano na ovoj koncentraciji floretina, tako da je prosečna dužina izdanka desetog dana tretmana iznosila 6,3 mm (Slika 28C).

Veoma snažan inhibitorni uticaj na rastenje i razviće klijanaca arabidopsisa imao je floretin u koncentraciji od 500 μ M. Korenovi tetiranih klijanaca su bili približno četiri puta kraći nego oni kod kontrolnih biljaka (Slika 28A), sa prosečno 3,8 bočnih korenova (Slika 28B), a izdanci skoro dvostruko kraći (48,2%) u odnosu na kontrolne (Slika 28C).

Floretin je osim opisanih promena merenih parametara rasteња i razvića klijanaca arabidopsisa izazvao i druge morfološke promene srazmerno primenjenoj koncentraciji. Najniža koncentracija floretina (125 μ M) nije dovela do drugih promena u izgledu korenova sem pomenutog smanjenja njihove dužine i razgranatosti. Korenovi su bili zdravi, bele boje, sa velikim brojem finih, gusto raspoređenih korenovih dlačica duž celog korena (Slika 29A), dok su izdanci, iako nešto malo kraći, bili zdravi i intenzivno zelene boje (Slika 29A) slično kontrolnim (Slika 29B). Korenovi klijanaca tretiranih 250 μ M floretinom su osim što su bili kraći i manje razgranati, bili i više žućkasti (Slika 29C), dok su izdanci i dalje zadržali intenzivno zelenu boju (Slika 29C) slično kontroli (Slika 29D). Klijanci na tretmanu 500 μ M floretinom su bili i dalje vijabilni, ali značajno izmenjenog izgleda. Odlikovali su ih bledožućkasto-braonkasti korenovi sa retkim korenskim dlačicama (Slika 29E) i izdanci bledozelene ili žućkasto-zelene boje, sa kotiledonima i dva sitnija lista u lisnoj rozeti (Slika 29E), u poređenju sa kontrolom koja je pored kotiledona posedovala četiri potpuno razvijena lista (Slika 29F) .

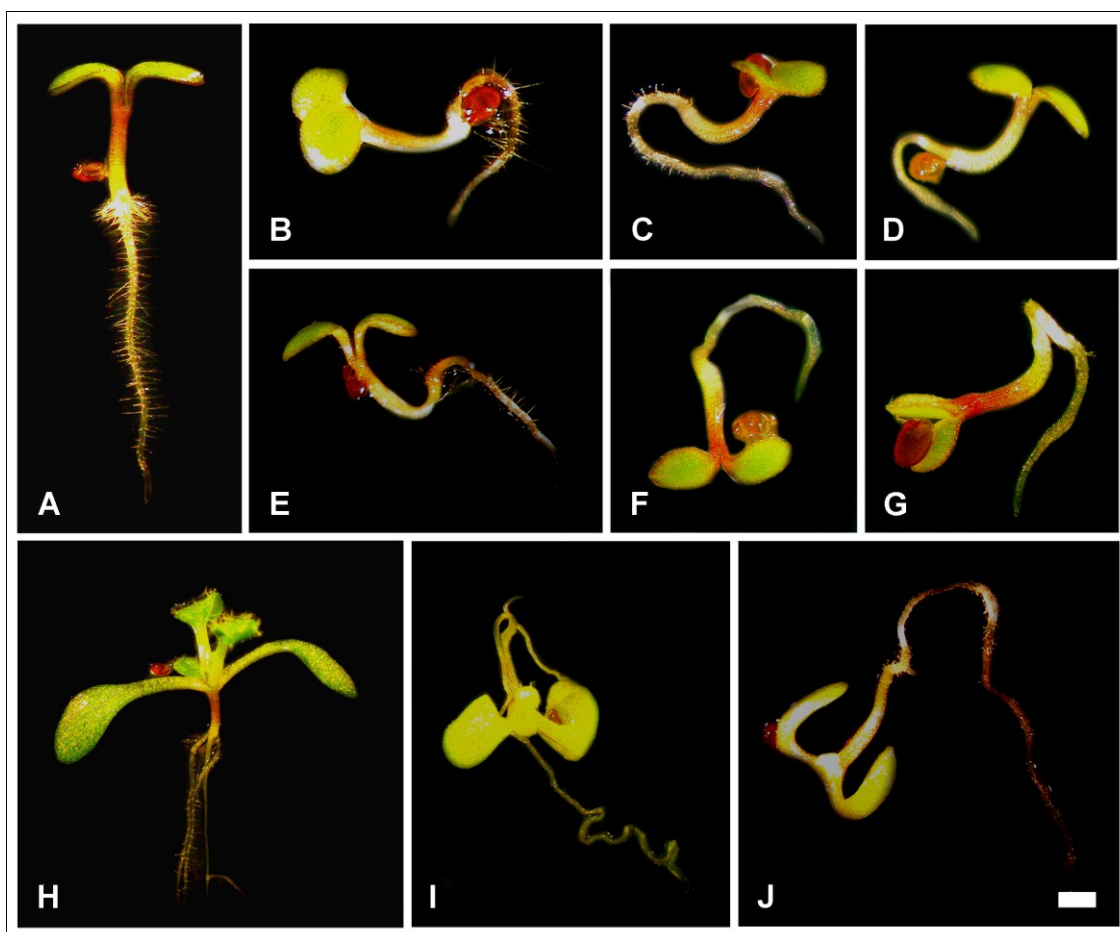


Slika 28. Efekat floretina na dužinu korena (A), broj lateralnih korenova (B) i dužinu izdanka (C) klijanaca *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana. Kontrolni tretman je sadržao istu količinu rastvarača DMSO koliko i odgovarajući tretman floretinom (0,035%: 0,07% i 0,14% (v/v) DMSO za tretmane sa 125 µM, 250 µM i 500 µM floretinom, redom). Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti (\pm SE) tri ponavljanja sa po 10 eksplantata za svaki tretman ponovljen u tri nezavisna eksperimenta (n=90). Srednje vrednosti obeležene zvezdicom se statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu prema *t*-testu, na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Brojevi iznad histograma predstavljaju procenat inhibicije (-)/stimulacije (+) u odnosu na kontrolu i izračunati su kako je opisano u Poglavlju 3.4.3.



Slika 29. Klijanci *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana na $\frac{1}{2}$ MS podlozi sa floretinom u rastućim koncentracijama od 125 μ M (A), 250 μ M (C) ili 500 μ M (E) u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. Kontrolni tretman je sadržao istu količinu rastvarača DMSO koliko i odgovarajući tretman floretinom (0,035% (B), 0,07% (D) i 0,14% (F) (v/v) DMSO za tretmane sa 125 μ M, 250 μ M i 500 μ M floretinom, redom). Klijanci su se razvijali u Petri kutijama postavljenim uspravno. Bar = 9 mm. Bar za slike A-F je prikazan na slici F.

Floretin je prouzrokovao i pojavu specifičnog, nepravilnog, agravitropskog rasta klijanaca, koje je bivalo sve izraženije sa povećanjem njegove koncentracije u podlozi. Za razliku od kontrolnih klijanaca sa pravilnim gravitropskim rastom (Slika 30A), kod tretmana sa 125 μ M floretinom su se mogli zapaziti klijanci kod kojih su kotiledoni i hipokotil rasli plagiotropno ili diagravitropno, dok se radikula izduživala najpre negativno gravitropski, a zatim se orjentisala u smeru dejstva sile zemljine teže rezultujući lučno savijenim korenom na stadijumu od tri dana starosti (Slika 30B i C).



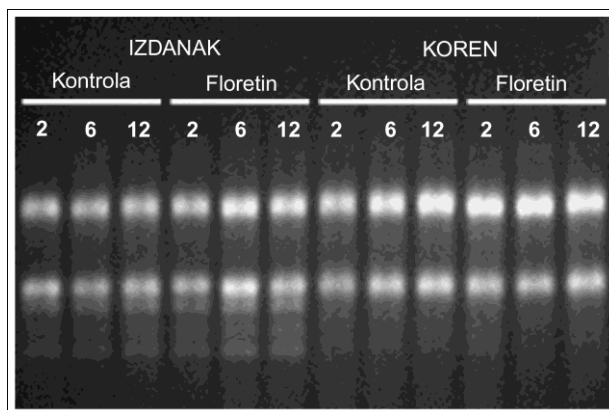
Slika 30. Efekat floretina na razvoj klijanaca *A.thaliana*. Tri dana stari klijanci na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez floretina (kontrola) (A, bar = 0,5 mm) (bar za slike A-J je prikazan na slici J) i podlozi sa 125 μ M (B i C, bar = 0,3 mm), 250 μ M (D i E, bar = 0,5 mm) i 500 μ M floretinom (F i G, bar = 0,3 mm). Sedam dana stari klijanci na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez floretina (kontrola, H, bar = 5 mm) i $\frac{1}{2}$ MS podlozi sa 500 μ M floretinom (I i J, bar = 5 mm). Kontrolni tretman je sadržao istu količinu rastvarača DMSO koliko i odgovarajući tretman floretinom (0,035%; 0,07% i 0,14% (v/v) DMSO za tretmane sa 125 μ M, 250 μ M i 500 μ M floretinom, redom). Klijanci su se razvijali u Petri kutijama postavljenim upravno.

Kod tretmana 250 μM floretinom uočen je ista orijentacija kotiledona i hipokotila klijanaca, dok je agravitropski odgovor korena bio nešto izraženiji. Koren je nakon formiranja početnog luka, nastavljao da raste plagiotropno ili diagravotropno (Slika 30 D i E). Na podlozi sa 500 μM floretina je bio zapažen delimično ili potpuno pozitivan gravitropski rast kotiledona i hipokotila (Slika 30F i G). Na podlogama sa 125 ili 250 μM floretina, nepravilan rast izdanaka i korena klijanaca je bio izražen samo u prvim danima nakon klijanja, dok je kasnije dolazilo do uspostavljanja normalnog gravitropskog odgovora. Za razliku od kontrolnih klijanaca (Slika 30H), klijanci tretirani 500 μM floretinom su zadržavali nepravilan rast i na kasnijim stadijumima razvića, kao što se može videti na primeru sedmodnevnih klijanaca kod kojih je takođe uočena i pojava epinastičnih kotiledona (Slika 30I i J).

4.6. Analiza ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina, transkripcioni faktor WOX7 i kontrolu ćelijskog ciklusa kod klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom

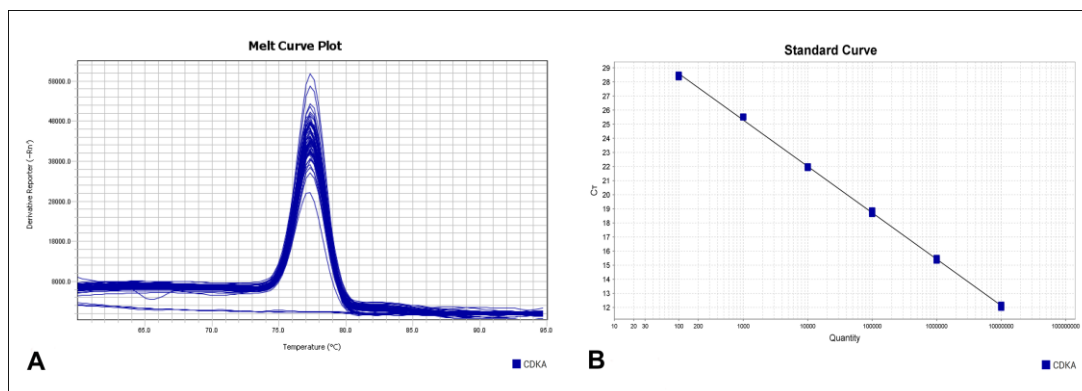
U cilju analize nivoa ekspresije određenih gena za koje se pretpostavlja da bi mogle biti uzrok retardacije raste klijanaca arabidopsisa uzrokovane floretinom prisutnim u eksudatu transformisanih korenova jabuke, iz izdanaka i korenova klijanaca arabidopsisa starih pet dana izolovane su ukupne RNK, i to 2, 6 i 12 h od primene 500 μM floretina ili tečne hranljive podloge koja je sadržala eksudat transformisanih korenova jabuke, kao i nakon 10 dana kontinuiranog gajenja klijanaca na pomenutim tretmanima. Agaroznom gel elektroforezom potvrđeno je da su RNK bile zadovoljavajućeg kvaliteta i koncentracije (Slika 31).

Izolovane RNK su prečišćene od kontaminacije DNK, a zatim prevedene u cDNK putem reverzne transkripcije. Dobijene cDNK su amplifikovane PCR reakcijom uz upotrebu prajmera specifičnih za ispitivane gene, a dobijeni amplifikovani fragmenti su razdvojeni agaroznom gel elektroforezom radi provere specifičnosti amplifikacije (podaci nisu prikazani).



Slika 31. Primer 1,2% gela sa ukupnim RNK (1 μ g/uzorku) izolovanim iz izdanaka i korenova netretiranih (kontrolnih) klijanaca arabidopsisa i klijanaca arabidopsisa izloženih dejstvu 500 μ M floretina tokom 2, 6 i 12 h.

Specifičnost korišćenih prajmera je dodatno potvrđena analizom temperatura topljenja (T_m) produkata nakon kvantitativne PCR (qPCR) amplifikacije. Za sve ispitivane prajmere potvrđena je visoka specifičnost reakcije, a primer dobre krive topljenja dat je za gen *CDKA1;1* (Slika 32A).



Slika 32. Primer specifične i visoko efikasne amplifikacije prikazan kroz dobro oblikovanu krivu topljenja (A) i standardnu krivu (B) *CDKA1;1* gena.

Amplifikovani fragmenti cDNK jednog od kontrolnih uzoraka su izolovani sa agaroznog gela, a kvantitet fragmenata je određen fluorometrijski, nakon čega je proračunat broj kopija cDNK molekula po μ L i napravljena serija razblaženja (od 10^7 do 10^2 kopija cDNK po μ L). qPCR amplifikacijom tako dobijenih standarda konstruisane su standardne krive za svaki od analiziranih gena. Primer dobre standardne krive dat je za gen *CDKA1;1*

na Slici 32B. Na osnovu dobijenih nagiba kriva (eng: *Slope*), preračunate su efikasnosti qPCR reakcija za svaki od analiziranih gena, čime je pokazano da su sve bile u opsegu preporučenih vrednosti od 80% do 120% (Tabela 21).

Tabela 21. Nagibi kriva za ispitivane gene i efikasnosti koje iz njih proizlaze.

Gen	Nagib krive (<i>Slope</i>)	Efikasnost
<i>ACT7</i>	-3,305	100,71%
<i>PIN1</i>	-3,511	92,67%
<i>PIN2</i>	-3,642	88,18%
<i>PIN3</i>	-3,332	99,58%
<i>PIN7</i>	-3,322	100,00%
<i>AUX1</i>	-3,368	98,11%
<i>LAX3</i>	-3,589	89,95%
<i>ABCB4</i>	-3,612	89,17%
<i>ABCB19</i>	-3,427	95,79%
<i>TAA1</i>	-3,379	97,67%
<i>YUC3</i>	-3,518	92,42%
<i>YUC4</i>	-3,538	91,71%
<i>YUC6</i>	-3,730	85,39%
<i>GA3ox1</i>	-3,478	93,87%
<i>GA20ox2</i>	-3,777	83,98%
<i>WOX7</i>	-3,222	93,87%
<i>CDKA1;1</i>	-3,293	101,22%
<i>CDKB2;1</i>	-3,545	91,46%
<i>CYCA3;1</i>	-3,416	96,22%
<i>CYCB2;4</i>	-3,358	98,52%

Pre analize ekspresije odabranih gena, proverena je ujednačenost količine cDNK u svim uzorcima amplifikacijom referentnog gena za aktin vrste *A.thaliana*. Prosečan broj ciklusa posle kojih je dostignut prag detekcije (Ct) referentnog gena za aktin je bio ujednačen kod svih analiziranih uzoraka.

Nivo ekspresije analiziranih gena prikazanih u Tabeli 21 izračunat je na osnovu Ct vrednosti, korišćenjem $\Delta\Delta C_t$ metode. Za svaku vremensku tačku nivo ekspresije u uzorcima tretiranim floretinom ili eksudatom korena jabuke dobijen je nakon normalizacije prema netretiranim (kontrolnim) uzorcima i izražen kao logaritamska vrednost ($\log_2 R$). Kontrolnim uzorcima je dodeljena vrednost 0.

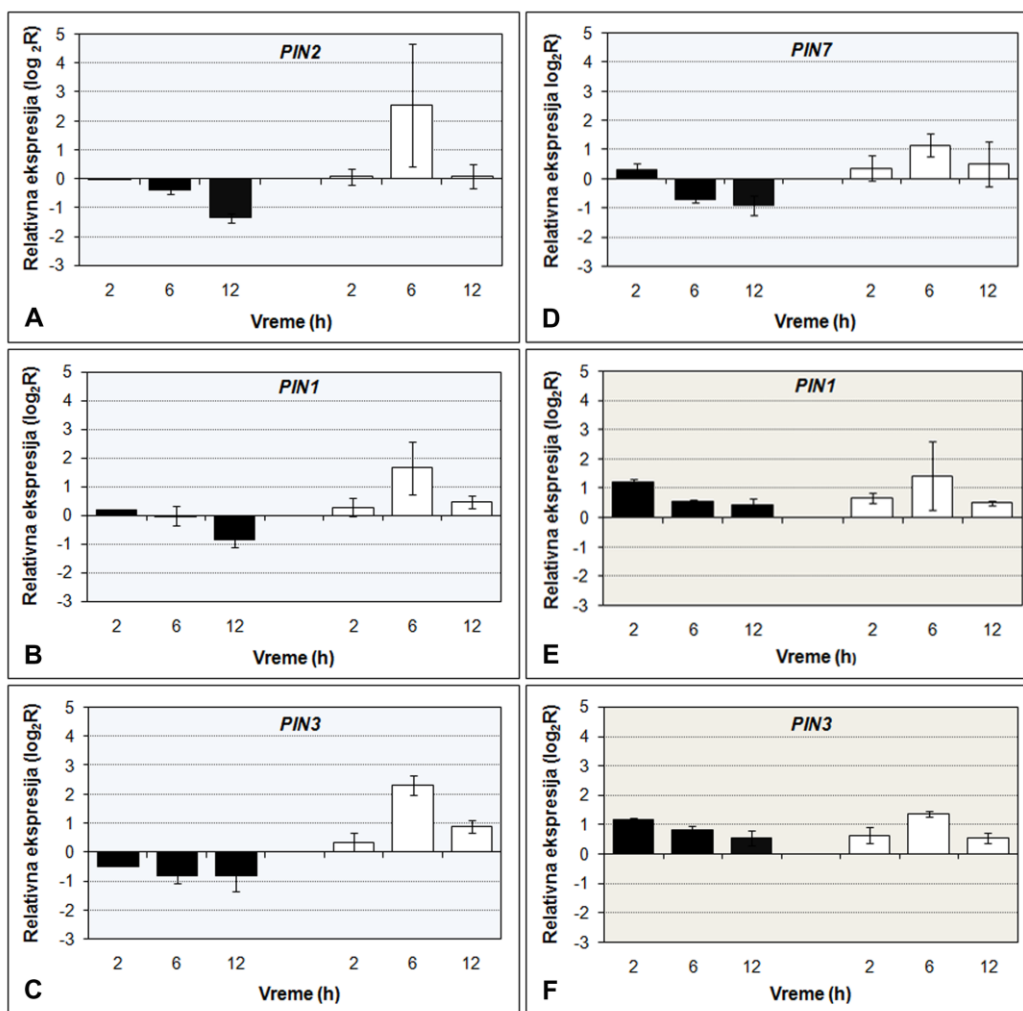
4.6.1. Ekspresija gena uključenih u polarni transport auksina (*PIN*, *AUX1*, *LAX3* i *ABCB*)

Promene u ekspresiji gena koji kodiraju članove PIN familije transportera odgovornih za aktivni transport auksina iz ćelije (PIN1, PIN2, PIN3 i PIN7) zabeležene su u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih sa 500 μM floretinom 2, 6 i 12 h od početka tretmana (Slika 33A, B, C i D). Zabeleženi vremenski profili promene ekspresije svih ispitivanih gena PIN familije proteina su se značajno razlikovali kod izdanaka i korenova tretiranih klijanaca.

U izdancima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, ekspresija svih ispitivanih *PIN* gena u odnosu na kontrolu je postepeno opadala sa vremenom izlaganja floretinu dostižući najniži nivo 12 h od početka tretmana (Slika 33A, B, C i D). S druge strane, ekspresija *PIN* gena u korenovima se odlikovala međusobno sličnim vremenskim profilom koji se znatno razlikovao od onog u izdancima i odlikovao se veoma blagim porastom ekspresije 2 h, maksimumom 6 h i ponovnim sniženjem ekspresije 12 h od početka tretmana floretinom, na nivo koji je bio nešto viši nego kod netretirane kontrole (Slika 33A, B, C i D).

S obzirom na identičan trend promene ekspresije svih ispitivanih *PIN* gena uzrokovane primenom tretmana 500 μM floretinom, odabrana su samo dva gena, *PIN1* i *PIN3*, čija je promena ekspresije praćena u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke (Slika 33E i F). Za razliku od tretmana floretinom, tretman sa EK je u izdancima klijanaca doveo do inicijalnog povećanja nivoa ekspresije oba ispitivana gena u odnosu na kontrolu, a zatim do postepenog

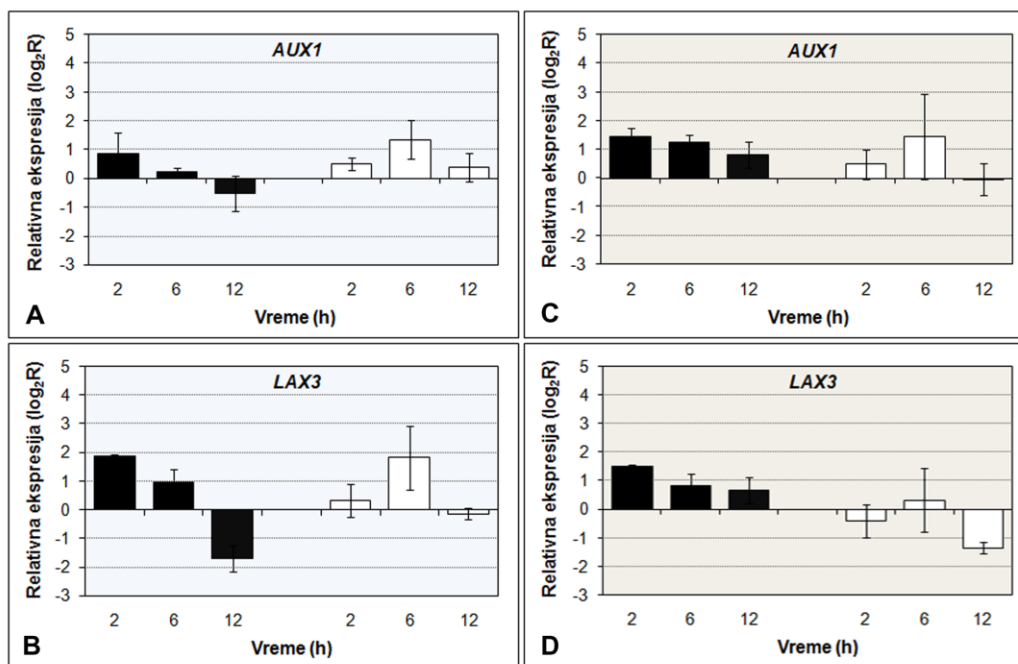
opadanja sa vremenom trajanja tretmana. Kod korenova klijanaca arabidopsisa, vremenski profili relativne ekspresije *PIN1* i *PIN3* gena (Slika 33E i F) su pokazivali identičan trend promene koji je bio zabeležen i u toku tretmana floretinom.



Slika 33. Relativna ekspresija *PIN1*, *PIN2*, *PIN3* i *PIN7* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A.thaliana* 2, 6 i 12 h od početka tretmana sa 500 μ M floretinom (A, B, C i D) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (E i F), prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

Za razliku od *PIN* gena kod kojih je zabeleženo karakteristično sniženje ekspresije u izdancima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, u slučaju gena koji kodiraju *AUX1* i *LAX3* transportere, odgovorne za aktivni transport auksina u ćeliju, zabeležen je karakterističan profil koji se odlikovao početnim porastom ekspresije 2 h od početka

tretmana floretinom, koja se u narednim časovima postepeno snižavala, da bi 12 h od početka tretmana opala na nivo koji je bio niži od nivoa zabeleženog kod netretiranih klijanaca (Slika 34A i B). Promena ekspresija ovih gena u korenovima klijanaca tretiranih floretinom (Slika 34A i B) je pokazivala isti trend kao onaj koji je bio zabeležen u slučaju gena za PIN transportere.

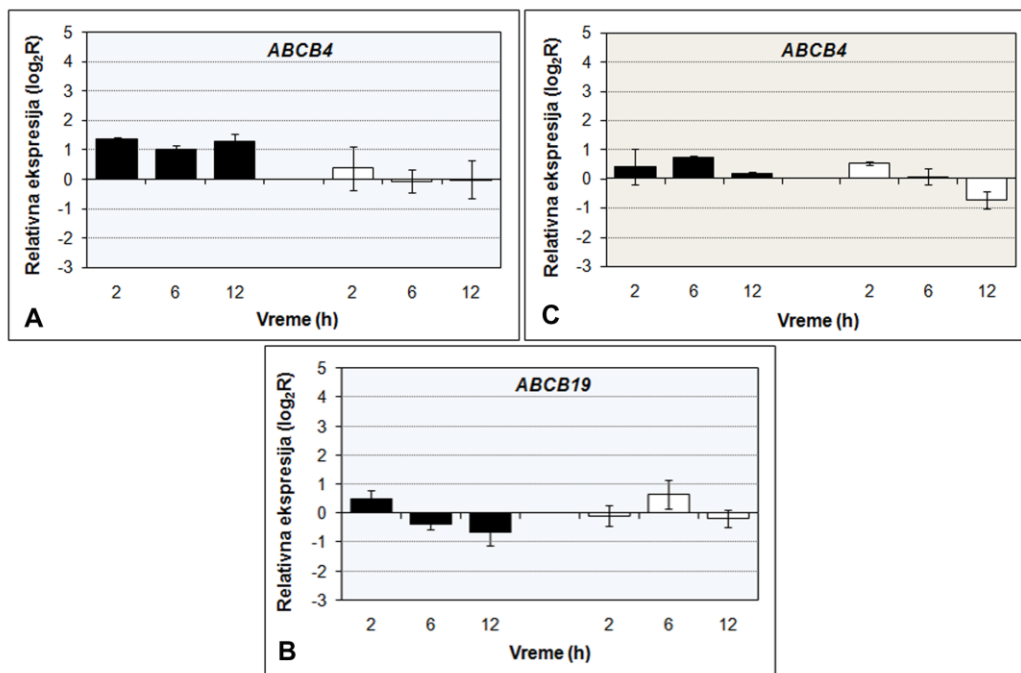


Slika 34. Relativna ekspresija *AUX1* i *LAX3* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A. thaliana* 2, 6 i 12 h od početka nakon tretmana sa 500 μ M floretinom (A i B) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (C i D), prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

Tretman eksudatom transformisanih korenova jabuke je doveo do porasta nivoa ekspresije *AUX1* i *LAX3* gena u izdancima klijanaca arabidopsisa kao i tretman floretinom, ali se za razliku od njega održao iznad kontrolnog nivoa tokom celog eksperimenta (Slika 34C i D). Promena ekspresije *AUX1* gena u korenovima arabidopsisa pod dejstvom tretmana eksudatom jabuke (Slika 34C) je bila veoma slična onoj koja je zabeležena kod tretmana floretinom, dok je trend promene ekspresije *LAX3* gena bio nešto drugačiji i odlikovao se sniženjem ekspresije ispod nivoa netretirane kontrole (Slika 34D). Takođe, trend u promeni ekspresije *AUX1* i *LAX3* gena u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih sa

EK je bio identičan onom koji je zabeležen kod *PIN* gena pod uticajem istog tretmana. Izuzetak predstavlja promena u ekspresiji *LAX3* gena u korenovima klijanaca tretiranih sa EK, koja se odlikovala padom ekspresije ispod vrednosti koja se javlja kod kontrole i to 2 h i 12 h od početka tretmana (Slika 34D).

Geni za auksinske transportere *ABCB4* i *ABCB19* su ispoljili najmanje izražene promene ekspresije u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom ili eksudatom transformisanih korenova jabuke, u odnosu na odabrane predstavnike ostalih familija gena za transportere uključene u polarni transport auksina (Slika 35). Promene su bile najizražnije u slučaju *ABCB4* gena u izdancima tretiranih klijanaca, gde je pod dejstvom floretina došlo do povećanja nivoa ekspresije u svim ispitivanim vremenskim tačkama (Slika 35A).



Slika 35. Relativna ekspresija *ABCB4* i *ABCB19* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A.thaliana* 2, 6 i 12 h od početka nakon tretmana sa 500 μM floretinom (A i B) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (C) prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

4.6.2. Ekspresija gena uključenih u biosintezu auksina (*TAA1*, *YUC3*, *YUC4* i *YUC6*)

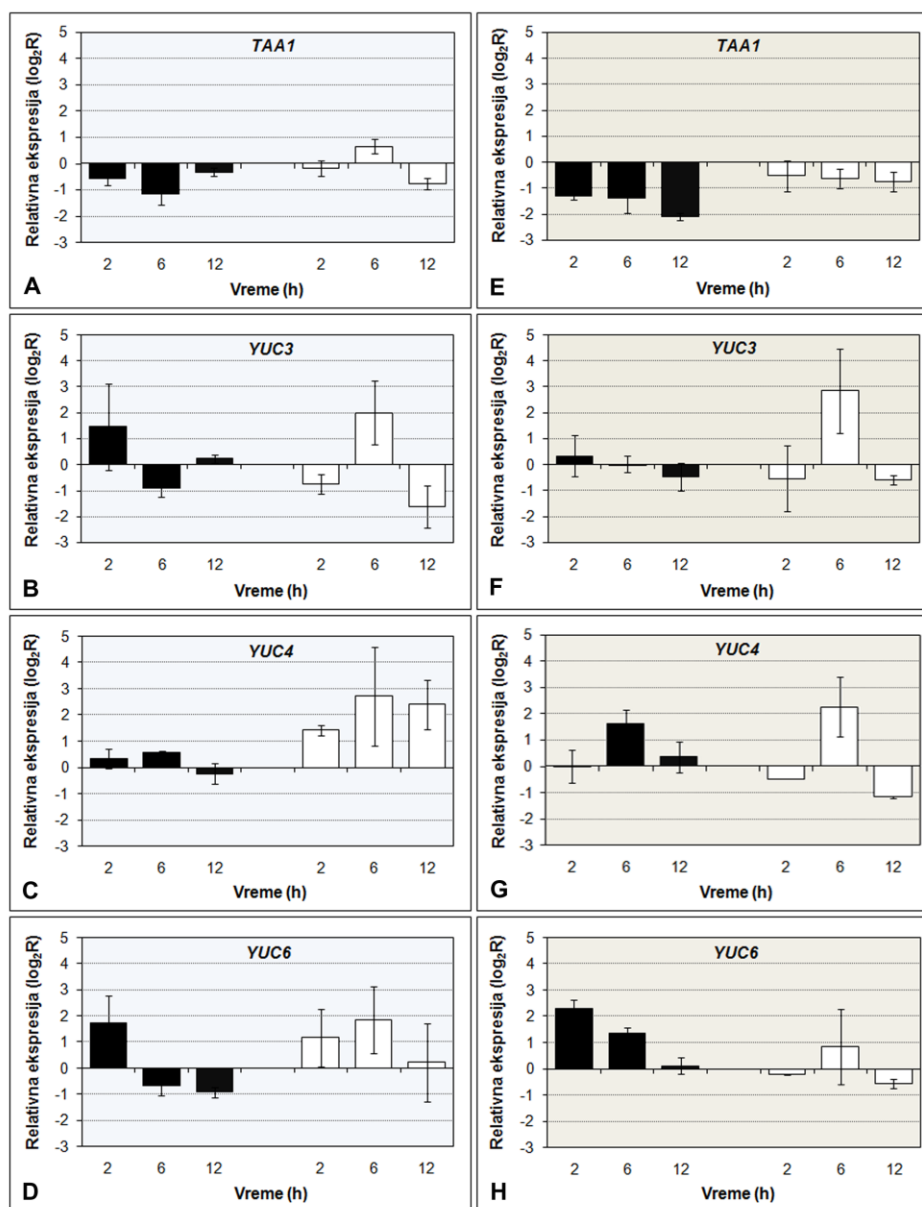
Ekspresija gena uključenih u biosintezu auksina u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa je takođe bila izmenjena pod uticajem tretmana 500 μ M floretinom i eksudatom transformisanih korenova jabuke (Slika 36).

Ekspresija *TAA1* gena u izdancima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom (Slika 36A) je bila blago snižena u odnosu na kontrolu u svim ispitivanim vremenskim tačkama, sa najizraženijim efektom nakon 6 h od početka tretmana. Kod gena *YUC3* i *YUC6*, vremenski profil promene ekspresije (Slika 36B i D) se odlikovao početnim povećanjem, a zatim sniženjem ispod nivoa ekspresije kod netretirane kontrole 6 h od početka tretmana floretinom. Tokom narednih šest časova, nivo ekspresije *YUC3* gena se povećao i postao blizak kontrolnom nivou, dok je u slučaju *YUC6* gena on ostao snižen i 12 h od početka tretmana. Zabeležena promena ekspresije *YUC4* gena u izdancima tretiranih floretinom (Slika 36C) je bila manje izražena nego u slučaju ostalih pomenutih članova *YUC* familije gena.

Za razliku od vremenskih profila promene ekspresije u izdancima klijanaca tretiranih floretinom, u korenovima su se mogla uočiti dva karakteristična obrazca promene ekspresije koje je odlikovalo maksimalno povećanje ekspresije 6 h od početka tretmana i manje sniženje ekspresije u preostale dve vremenske tačke kod *TAA1* i *YUC3* gena (Slika 36A i B) ili njeno povećanje u pomenutim vremenskim tačkama u slučaju *YUC4* i *YUC6* gena (Slika 36C i D). Trend promene ekspresije dva poslednja pomenuta gena bio je sličan onom koji je zapažen kod gena *PIN* familije, kao i *AUX1* i *LAX3* gena u korenu klijanaca tretiranih floretinom.

Eksudat transformisanih korenova jabuke je takođe uticao na promenu ekspresije gena uključenih u biosintezu auksina. Najizraženije promene u izdancima tretiranih klijanaca su bile zapažene kod *TAA1* gena (Slika 36E), kod koga se javlja sniženje ekspresije u svim ispitivanim vremenskim tačkama, što je bio slučaj i kod tretmana floretinom. Promene ekspresije *YUC* gena u izdancima klijanaca tretiranih sa EK su se razlikovale od

onih uočenih u izdancima tretiranim floretinom. Pomenute promene su bile najmanje izražene u slučaju *YUC3* gena (Slika 36F), dok su geni *YUC4* i *YUC6* (Slika 36G i H) pokazivali prolazno povećanje ekspresije koja je 12 h od početka tretmana sa EK opala do blizu nivoa netretirane kontrole.



Slika 36. Relativna ekspresija *TAA1*, *YUC3*, *YUC4* i *YUC6* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A.thaliana* 2, 6 i 12 h od početka nakon tretmana 500 μ M floretinom (A, B, C i D) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (E, F, G i H), prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

U korenovima klijanaca tretiranih sa EK, vremenski profil promene ekspresije sva tri *YUC* gena je imao isti trend i odlikovalo ga je početno blago sniženje ekspresije 2 h od početka tretmana, a zatim značajniji porast ekspresije nakon 6 h praćen ponovnim sniženjem koje se manifestovalo negativnom vrednošću relativne ekspresije 12 h od početka tretmana (Slika 36F, G i H). Ovakav trend promene ekspresije bio je sličan onom koji je uočen kod *YUC3* gena u korenovima klijanaca tretiranih floretinom, kao i *LAX3* gena u korenovima klijanaca tretiranih sa EK. Za razliku od *YUC* gena, ekspresija *TAA1* gena se odlikovala konstantnim i blagim sniženjem nivoa ekspresije u svim ispitivanim vremenskim tačkama (Slika 36E).

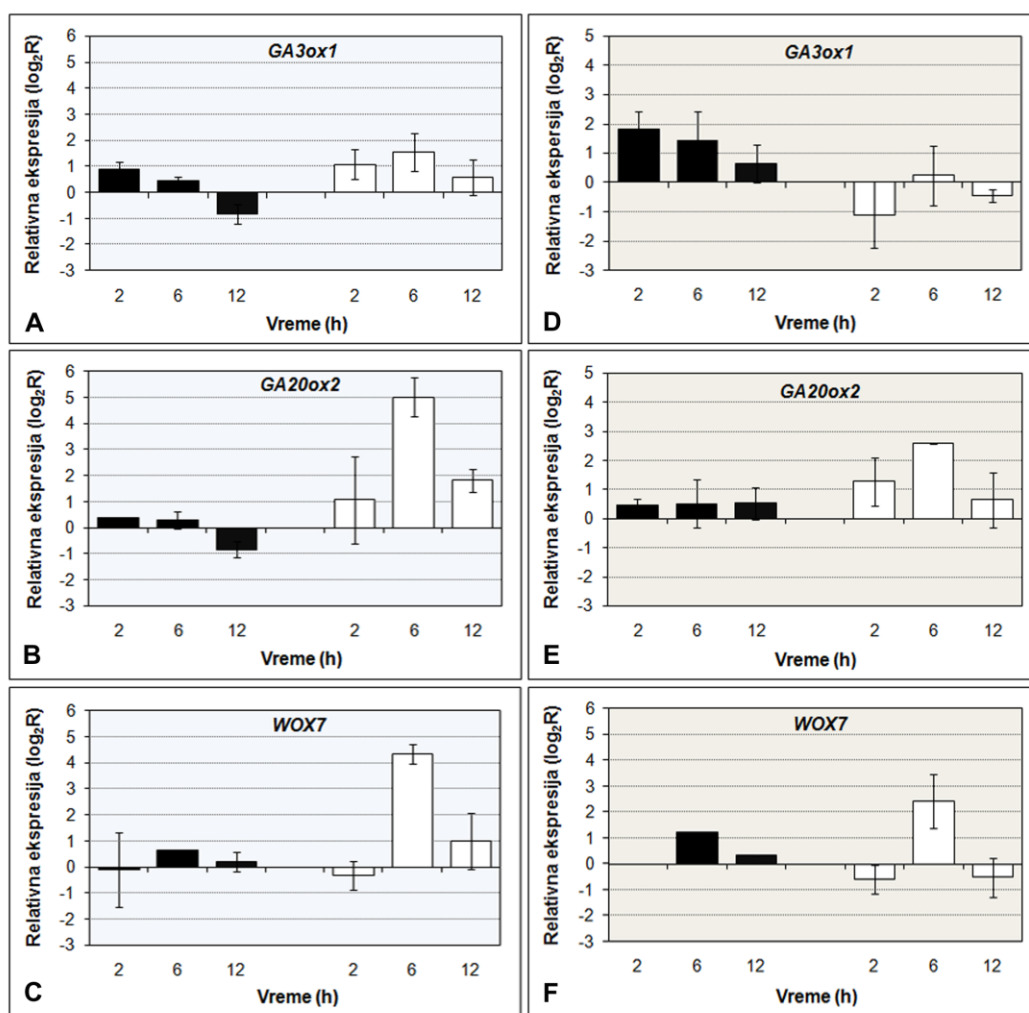
4.6.3. Ekspresija gena uključenih u biosintezu giberelina (*GA3ox1* i *GA20ox2*) i gena za transkripcioni faktor *WOX7*

Tretmani 500 μ M floretinom i eksudatom transformisanih korenova jabuke takođe su doveli i do promena ekspresije gena uključenih u biosintezu giberelina (*GA3ox1* i *GA20ox2*), kao i gena za transkripcioni faktor *WOX7* u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa (Slika 37).

Iako su promene nivoa ekspresije gena *GA3ox1* i *GA20ox2* u izdancima klijanaca tretiranih floretinom bile relativno male (Slika 37A i B), odlikovao ih je karakteristični obrazac koji je takođe zapažen i kod vremenskog profila promene ekspresije *AUX1* i *LAX3* gena koji kodiraju proteine uključene u influx auksina. I u korenovima tretiranih klijanaca, promene ekspresija *GA3ox1* i *GA20ox2* gena u posmatranim vremenskim tačkama su imale gotovo identičan trend promene kao i one zabeležene u korenovima kod ispitivanih gena PIN familije proteina, *AUX1*, *LAX3* gena, kao i *YUC4* i *YUC6* gena. Dodatno, promena u nivou ekspresije *GA20ox2* 6 h od početka tretmana je bila znatno izraženija nego u slučaju *GA3ox1* i ostalih pomenutih gena.

Slično situaciji u slučaju *PIN1* i *PIN3*, *AUX1* i *LAX3*, *YUC4* i *YUC6* gena obrasci promene ekspresije *GA3ox1* i *GA20ox2* gena u izdancima klijanaca tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke (Slika 37D i E) su se odlikovali porastom ekspresije iznad

nivoa zabeleženog kod netretiranih klijanaca u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Vremenski profil ekspresije *GA3ox1* gena u korenovima klijanaca tretiranih sa EK (Slika 37D) se razlikovao od onog koji je dobijen u slučaju tretmana floretinom, ali je odgovarao onom koji je uočen kod *LAX3* gena u korenovima klijanaca tretiranih sa EK. Za razliku od njega, promena ekspresije *GA20ox2* gena u korenovima klijanaca tretiranih sa EK (Slika 37D) je imala isti trend kao u korenovima klijanaca tretiranih floretinom, ali i u slučaju *PIN1*, *PIN3* i *AUX1* gena u korenovima klijanaca tretiranih sa EK.



Slika 37. Relativna ekspresija *GA3ox1*, *GA20ox2* i *WOX7* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A.thaliana* 2 h, 6 h i 12 h od početka tretmana sa 500 μM floretinom (A, B i C) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (D, E i F), prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

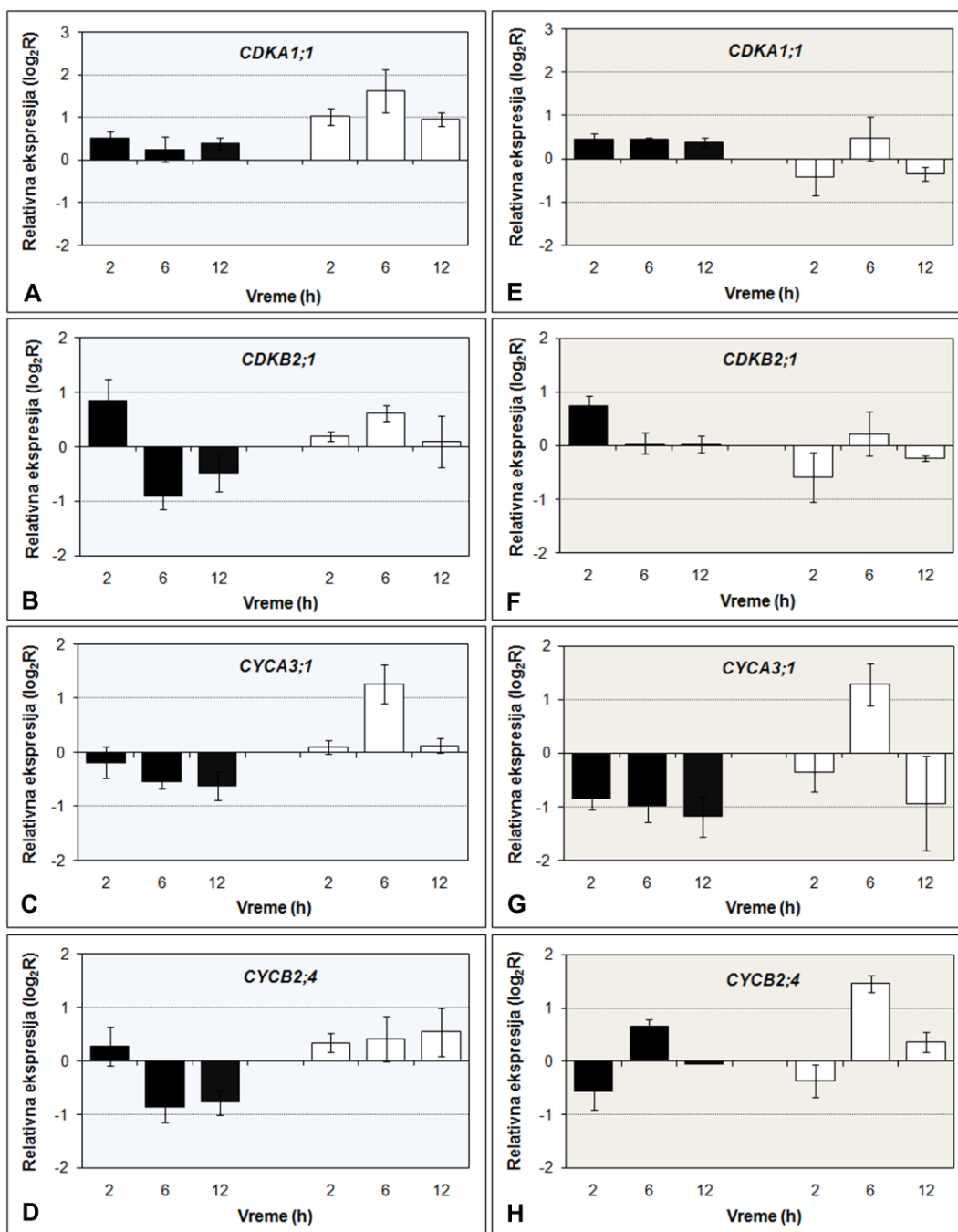
Promena ekspresije gena za transkripcioni faktor *WOX7* u izdancima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom je bila veoma mala, dok je u korenovima konstatovan porast ekspresije ovog gena koji je bio naročito intenzivan 6 h od početka tretmana (Slika 37C). Relativno slična situacija vezana za promene u ekspresiji *WOX7* gena je zabeležena kod klijanaca tretiranih sa EK (Slika 37F).

4.6.4. Ekspresija gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa (*CDKA;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* i *CYCB2;4*)

Tretman klijanaca arabidopsisa floretinom je doveo do promena u nivou ekspresije ispitivanih gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, tj. gena za kinaze zavisne od ciklina *CDKA1;1* i *CDKB2;1* i cikline *CYCA3;1* i *CYCB2;4* u izdancima i korenovima tretiranih klijanaca (Slike 38 i 39).

Ekspresija *CDKA1;1* gena u izdancima (Slika 38A) je bila blago povećana u svim ispitivanim vremenskim tačkama i nije se značajnije udaljila od nivoa ekspresije kod netretirane kontrole nakon produžetka trajanja tretmana (Slika 39A). Nasuprot tome, ekspresija *CYCA3;1* gena u izdancima arabidopsisa (Slika 38C) je bila blago snižena u svim ispitivanim vremenskim tačkama i zadržala se na sličnom nivou i nakon 10 dana tretmana (Slika 39C). Primećeno je da su vremenski profili promene ekspresije *CDKB2;1* i *CYCB2;4* gena u izdancima arabidopsisa (Slika 38B i D) bili slični i odlikovali su se početnim povećanjem ekspresije 2 h od početka tretmana, a zatim sniženjem koje je bilo najizraženije nakon 6 h tretmana. Produžetak trajanja tretmana od 10 dana je doveo do postepenog povratka nivoa ekspresije na nivo blizak onom kod netretirane kontrole (Slika 39B i D).

Ekspresija svih gena za pomenute kinaze zavisne od ciklina i cikline u korenovima klijanaca tretiranih floretinom je bila povećana i odlikovala se karakterističnim profilom sa maksimalnim povećanjem 6 h od početka tretmana, izuzev *CYCB2;4* gena čija ekspresija odlikovala konstantnim porastom tokom tretmana (Slika 38A, B, C i D).

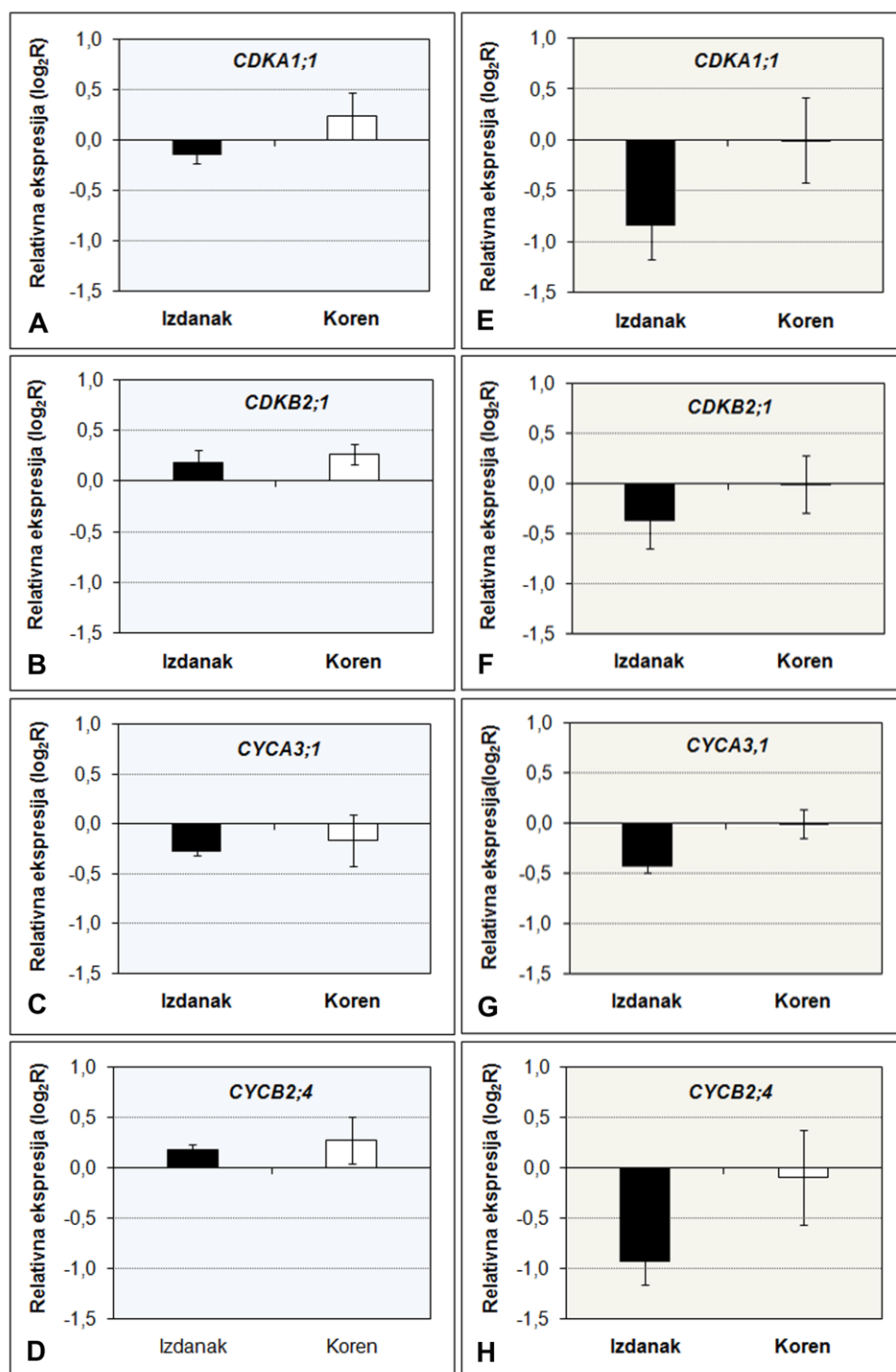


Slika 38. Relativna ekspresija *CDKA1;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* i *CYCB2;4* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A.thaliana* 2, 6 i 12 h od početka tretmana sa 500 μ M fletinom (A, B, C i D) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (E, F, G i H), prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

Opisani obrazac ekspresije je bio veoma sličan onom koji je zabeležen kod gena uključenih u polarni transport auksina (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN7*, *AUX1* i *LAX3*), sintezu auksina (*YUC4* i *YUC6*) i giberelina (*GA3ox1* i *GA20ox2*) i gena za transkripcioni faktor (*WOX7*) u korenovima klijanaca na istom tretmanu. Ekspresija pomenutih gena u korenovima klijanaca nakon 10 dana tretmana floretinom je bila na sličnom nivou kao kod netretiranih kontrolnih klijanaca (Slika 39A, B, C i D).

Vremenski profil promene ekspresije *CDKA1;1* i *CYCA3;1* gena u izdancima klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke (Slika 38E i G) je bio sličan onom koji je uočen pri tretmanu floretinom, što nije bio slučaj sa genima *CDKB2;1* i *CYCB2;4* (Slika 38F i H). Za razliku od tretmana floretinom, ekspresija svih ispitivanih gena ćelijskog ciklusa u izdancima klijanaca tretiranih sa EK ostala je snižena i posle 10 dana kontinuiranog gajenja izdanaka u prisustvu eksudata transformisanih korenova jabuke (Slika 39E, F, G i H).

U korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih sa EK, promene ekspresije svih posmatranih gena ćelijskog ciklusa (Slika 38E, F, G i H) su ispoljavale karakteristični trend koji se odlikovao početnim blažim padom u nivou ekspresije 2 h od početka tretmana, porastom nakon 6 h i ponovnim sniženjem nivoa ekspresije 12 h od početka tretmana. Jedino u slučaju *CYCB2;4* gena (Slika 38H), ekspresija je ostala blago povećana 12 h od početka tretmana. Trend promene ekspresije gena ćelijskog ciklusa u korenu klijanaca tretiranih sa EK je bio sličan onom koji odlikuje ekspresiju *LAX3*, *YUC3*, *YUC4*, *YUC6*, *GA3ox1* i *WOX7* gena kod klijanaca na istom tretmanu. U toku produženog tretiranja klijanaca arabidopsisa sa EK od 10 dana, pomenute početne promene nivoa ekspresija gena ćelijskog ciklusa u korenovima klijanaca su se vratile na nivo blizak onom kod netretirane kontrole (Slika 39E, F, G i H).



Slika 39. Relativna ekspresija *CDKA1;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* i *CYCB2;4* gena u izdancima (crni stubići) i korenu (beli stubići) klijanaca *A.thaliana* 10 dana od početka tretmana sa 500 μM floretinom (A, B, C i D) i eksudatom transformisanih korenova jabuke linije ZD12 (E, F, G i H), prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 0.

4.7. Ultrastruktura ćelija mezofila klijanaca *A. thaliana* tretiranih floretinom

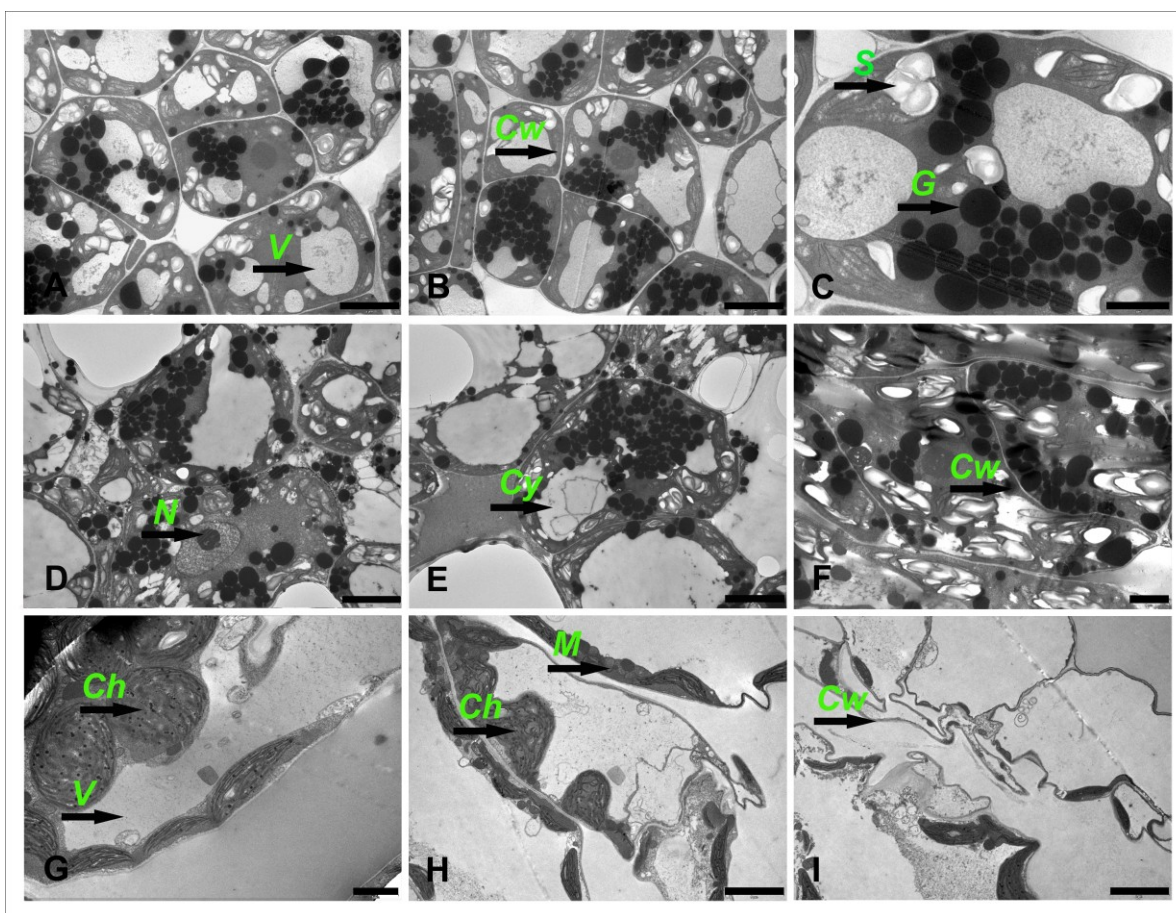
Potencijalne ultrastrukturne promene nastale na ćelijama klijanaca *A. thaliana* tokom njihovog gajenja na podlogama sa 500 μM floretinom u trajanju od tri dana i 250 μM floretinom u trajanju od 10 dana su analizirane pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM).

Ćelije listova klijanaca netretiranih kontrolnih biljaka (Slika 40A-C) su imale uobičajeni oblik, sa malom vakuolom (Slika 40A), tankim ćelijskim zidom pravilnog oblika (Slika 40B), gustom citoplazmom ispunjenom brojnim sitnim vezikulama, krupnim nukleusom i uočljivim nukleolusom. Primećene su mnogobrojne specifične granule sa nutrijentima, kao i granule skroba (Slika 40C). Hloroplasti i mitohondrije su bili standardnog oblika i strukture.

U ćelijama izdanaka klijanaca arabidopsisa koji su isključivani i gajeni na podlozi sa 500 μM floretinom u trajanju od tri dana uz pomoć TEM-a zabeležene su sitnije ultrastrukturne promene (Slika 40D-F). Uočene su krupnije vakuole u kojima su zapaženi citoplazmatični konci (Slika 40E), koji su inače prepoznatljivi kada je poremećen metabolizam ćelije. Granule skroba su bile brojne, ali sitnije u poređenju sa onim u ćelijama kontrolnih klijanaca. U ćelijama tretiranih klijanaca je takođe zabeleženo mnoštvo granula različitih oblika bogatih nutrijentima. Za razliku od ćelija kontrolnih klijanaca, zapažene su i nepravilnosti u vidu undulacija (izuvijanosti) ćelijskog zida (Slika 40F). Hloroplasti i mitohondrije su bili pravilnog oblika i strukture.

Produženo vreme izlaganja klijanaca floretinu (10 dana) dovelo je do veoma značajnih ultrastrukturnih promena na ćelijama i nakon tretmana sa nižom koncentracijom floretina (250 μM) (Slika 40G-I). Najveće promene su uočene na hloroplastima, koji od regularnog sočivastog oblika u ćelijama kontrolnih klijanaca, u ćelijama tretiranih klijanaca zadobijaju okrugao oblik i izmeštaju se i grupišu ka unutrašnjosti ćelije (Slika 40G i H). Značajna promena je zapažena i u orijentaciji tilakoida grana i tilakoida strome, koji od pravilne linearne zadobijaju kružnu formu. Strukturne promene na hloroplastima su se

odrazile i na pravilno funkcionisanje samih hloroplasta, tako da je u hloroplastima sa dezorganizovanim tilakoidima uočen i smanjen broj skrobnih zrna. Granule sa nutrijentima, kao i granule skroba u citoplazmi nisu bile vidljive, dok su u ćelijama uočene krupne vakuole (Slika 40G). Za razliku od hloroplasta, promene u strukturi mitohondrija nisu uočene (Slika 40H). Za ćelije tretiranih klijanaca bilo je karakteristično i prisustvo izražene izuvijanosti ćelijskog zida (Slika 40I).



Slika 40. Efekat floretina na ultrastrukturu ćelija listova *A. thaliana*. Ćelije listova klijanaca gajenih na ½MS podlozi (kontrola) (A-C). A - mala vakuola (*V*), bar = 5 µm; B - ćelijski zid (*Cw*), bar = 5 µm; C - granule skroba (*S*), brojne granule sa nutrijentima (*G*), bar =2 µm; Ćelije klijanaca gajenih tri dana na ½MS podlozi sa 500 µM floretinom (D-F). D - nukleus (*N*), bar = 5 µm; E - vakuole sa citoplazmatičnim koncima (*Cy*), bar = 5 µm; F - izvijeni ćelijski zid (*Cw*), bar = 2 µm; Ćelije klijanaca gajenih 10 dana na ½MS podlozi sa 250 µM floretinom (G-I). G - hloroplasti okruglog oblika (*Ch*), bar =2 µm; H - hloroplasti okruglog oblika (*Ch*), mitohondrija (*M*), bar = 5 µm; I - veoma izvijen ćelijski zid (*Cw*), bar = 5 µm.

5. DISKUSIJA

Alelopatija se u užem smislu najčešće definiše kao pojava da biljni organizam, putem sekundarnih metabolita koje proizvodi, utiče na klijanje, rastenje i razviće drugih biljaka u svom okruženju (Rice, 1984). Potencijalnu alelopatsku ulogu dominantnog sekundarnog metabolita jabuke florizina, kao i floretina i drugih fenolnih jedinjenja ove voćne vrste nagovestio je Börner davne 1959. godine, smatrajući ih odgovornim za razvoj bolesti poznate kao „*Specific Apple Replant Disease*“ (SARD). Ova bolest se manifestuje usporenim i zakržljanim rastom stabla i korena, kao i slabim plodonošenjem sadnica jabuke posađenim na mestima prethodnih voćnjaka jabuke (Wittenmayer i Szabó, 2000). Noviji literaturni podaci ukazuju da eksudati vrsta *Malus pumila* i *Malus prunifolia* mogu ispoljiti inhibitorno, odnosno autoalelopatsko dejstvo na klijanje semena i razvoj klijanaca sopstvene vrste (Zhang i sar., 2007b; Bai i sar., 2009a). Ovi rezultati su ponovo nagovestili da florizin, i floretin mogu biti ključni faktori u razvoju SARD (Nicola i sar., 2017; Yin i sar., 2018). Sekundarni metaboliti jabuke koji dospevaju u zemljište izlučivanjem putem korena ili razgradnjom biljnog materijala (listovi, plodovi, delovi korena ili stabla), bi mogli delovati inhibitorno i na druge biljne vrste, uključujući i korove. Upoznavanje sa potencijalom i mehanizmima alelopatskog delovanja sekundarnih metabolita jabuke bi moglo biti od značaja za razvoj novih strategija za kontrolu korova, uključujući i poboljšanje alelopatskog uticaja same jabuke.

Bitan ograničavajući faktor u pokušajima da se prošire saznanja o alelopatskim interakcijama u rizosferi predstavlja komplikovanost izolacije i identifikacije metabolita koji se izlučuju iz korena u zemljište, kao i kompleksnost samog ekosistema rizosfere i mogućnost interakcije različitih faktora pri alelopatskom delovanju. Uspostavljanje model sistema koji bi omogućio izlučivanje potencijalnih alelohemikalija od strane korenova jabuke direktno u tečnu sterilnu podlogu, u kontrolisanim *in vitro* uslovima, bi omogućilo da se otkloni uticaj i variranje faktora spoljašnje sredine, kao i prisustvo mikroorganizama. Otklanjanje ovih činilaca, koji mogu uticati na promenu kvaliteta i kvantiteta eksudovanih alelohemikalija, je izuzetno značajno za proučavanje procesa alelopatije. Uspostavljanje sterilne kulture transformisanih korenova jabuke sposobnih za rastenje nezavisno od izdanaka i regulatora rastanja, genetičkom transformacijom posredstvom *A. rhizogenes*

vektora, predstavlja osnovu za izučavanje produkcije sekundarnih metabolita i funkcionalnu karakterizaciju gena uključenih u metabolizam ovih metabolita u korenovima jabuke. Takođe, primena eksudata korenova jabuke dobijenih u kulturi *in vitro* bi olakšala izvođenje morfoloških testova i fizioloških i molekularnih analiza u cilju razotkrivanja mehanizama delovanja alelohemikalija koji uprkos intenzivnim biohemijskim i fiziološkim istraživanjima poslednjih godina još uvek predstavljaju veliku nepoznanicu.

5.1. Morfogeneza jabuke *in vitro*

Jabuka je kao drvenasta vrsta veoma zahtevna po pitanju uslova i vremena neophodnih za isključivanje semena i odgajanje eksperimentalnih biljaka. Stoga je uvođenje jabuke u kulturu *in vitro*, korišćenjem apeksa pazušnih pupoljaka lastara jabuke, kao i pažljiva optimizacija uslova za efikasnu regeneraciju putem *de novo* organogeneze izdanaka, umnožavanje i ožiljavanje u laboratorijskim uslovima, bitan preduslov za dobijanje velikog broja uniformnih biljaka i genetičku transformaciju jabuke, kao i za uspostavljanje *in vitro* kulture transformisanih korenova.

S obzirom na izuzetan ekonomski značaj jabuke kao voćne vrste i njenu široku rasprostranjenost, postoji veliki broj radova posvećenih *in vitro* regeneraciji različitih vrsta podloga za kalemljenje jabuke, ali i nekoliko sorti jabuke (kao što je prikazano u revijalnim radovima Bhatti i Jha, 2010; Magyar-Tábori i sar., 2010). Kako potencijal za regeneraciju jabuke izuzetno mnogo zavisi od genotipa, javlja se potreba za posebnom optimizacijom uslova za *in vitro* gajenje za svaku sortu ili tip eksplantata, koji će biti korišćen kao početni materijal. Regeneracija izdanaka sorte Zlatni Delišeš je opisana od strane većeg broja autora (Liu i sar., 1983; Theiler-Hedtrich i Theiler-Hedtrich, 1990; Belaizi i sar., 1991; Korban i sar., 1992; Graph i Wricke, 1998; Rugini i Muganu, 1998; Viršček-Marn i sar., 1999) i imala je efikasnost od 4% do 73%, sa izuzetkom protokola Yepes i Aldwinckle (1994) pomoću koga je ostvarena uspešna regeneracija sa učestalošću od 95%. S obzirom na umereno visoku i neujednačenu učestalost regeneracije Zlatnog Delišeša, kao i odsustvo literaturnih podataka o regeneraciji sorte Melrouz, u ovom radu je razvijen efikasan i pouzdan protokol za regeneraciju obe sorte sa visokom učestalošću koja je iznosila 97,4%.

Sa tim ciljem, najpre je ispitivan efekat predretmana eksplantata u mraku i agensa za učvršćivanje podloge, a potom i uticaj genotipa (sorte), tipa i orijentacije eksplantata na efikasnost regeneracije izdanaka iz odsečaka listova, kao i procena uticaja β -laktamskih antibiotika na proces regeneracije u cilju dodatnog povećanja regenerativnog odgovora jabuke. To je ujedno i neophodan uslov za uspešnu genetičku transformaciju jabuke posredstvom *Agrobacterium* vektora.

5.1.1. Optimizacija uslova za regeneraciju jabuke sorti Zlatni Delišes i Melrouz iz odsečaka listova *in vitro*

Rezultati ove disertacije ukazuju da je gajenje eksplantata u mraku bilo ključni faktor za indukciju regeneracije izdanaka iz odsečaka listova kod obe ispitivane sorte jabuke, Zlatni Delišes i Melrouz. Iako je na eksplantatima gajenim u uslovima dugog dana dolazilo do formiranja kalusa, ovi kalusi nisu bili regenerativni. Nasuprot njima, skoro 100% eksplantata obe sorte jabuke, koji su bili gajeni tri nedelje u mraku, a zatim izlagani uslovima dugog dana su produkovali kaluse sa izdancima, ali i izdanke koji su formirani direktno na površini liske. Formiranje izdanaka procesom direktne organogeneze primećeno je u slučaju regeneracije sa internodalnih segmenata kod sorte Zlatni Delišes (Belaizi i sar., 1991), kao i kod drugih sorti i podloga za kalemljenje jabuke (Dufour, 1990; Pawlicki i Welander, 1994). Predtretman mrakom se pokazao kao veoma bitan za indukciju procesa organogeneze kod mnogih drvenastih voćnih vrsta, uključujući i jabuku (Liu i sar., 1983; Fasolo i sar., 1989; Predieri i Fasolo, 1989; Famiani i sar., 1994; Magyar-Tábori i sar., 2010). Njegov efekat se povezuje sa povećanjem nivoa endogenih auksina (Korban i sar., 1992; Miguel i sar., 1996) i smanjenjem debljine ćelijskog zida, što olakšava translokaciju biljnih faktora rastenja (Herman i Hess, 1963). U skladu sa tim, izlaganje svetlosti je odložilo formiranje kalusa kod sorti jabuke Royal Gala i Freedom i potpuno inhibiralo indukciju izdanaka kod sorte Freedom (Dobránszki i Teixeira da Silva, 2010).

Agens za učvršćivanje hranljive podloge je imao značajan uticaj na regenerativni potencijal eksplantata i pojavu vitifikacije kod regenerisanih izdanaka jabuke Melrouz i Zlatni Delišes. Agar je prirodni polisaharid koji se prevashodno dobija iz crvenih algi

familija *Graciliaceae* i *Gelidiaceae*. Zbog svoje visoke cene i tendencije da dovede do pojave vitrifikacije i/ili nekroze *in vitro* kultura, često biva zamenjen drugim agensima za učvršćivanje podloga. Najčešće su to komercijalno dostupni galaktomanani: guar guma (fitagel) i kasia. Jedan od primera koji to ilustruje je poređenje novo formiranih izdanaka sorte Marubakaido, gajenih *in vitro* na podlogama sa kombinacijom agara i fitagela ($3+3 \text{ g L}^{-1}$) i agara i kasie ($3+3 \text{ g L}^{-1}$) sa kulturama na standardnoj podlozi koja je sadržala 6 g L^{-1} agara. Pokazano je da nije bilo većih razlika u stopi umnožavanja izdanaka na ovim podlogama. Međutim, procenat vitrifikacije izdanaka je bio najniži u slučaju smeše agar/kasia ($2,50 \pm 0,88\%$), nešto viši kod smeše agar/guar ($6,65 \pm 2,24\%$) i najviši na podlozi koja je sadržala samo agar ($19,35 \pm 1,90\%$) (Lucyszyn i sar., 2005). Nasuprot rezultatima autora koji su zapazili najbolji regenerativni odgovor eksplantata sorte jabuke Gala Gala gajenih na podlozi sa fitagelom (Bommineni i sar., 2001), najveća učestalost regeneracije sorti Melrouz (96,6%) i Zlatni Delišes (87,4%) je postignuta na M2 podlozi učvršćenoj pomoću agara. Pored toga, primećena je i povećana učestalost vitrifikacije izdanaka na podlozi sa fitagelom, koja je posebno bila izražena kod sorte Melrouz i iznosila čak do 90%. Slična pojava zapažena je od strane drugih autora u slučaju regeneracije izdanaka sorte Goldspur, kod koje se vitrifikacija javila isključivo na podlozi učvršćenoj kombinovanjem agara i fitagela (36,9%), dok na podlozi sa agarom ovakva pojava nije bila zabeležena (Viršček-Marn i sar., 1999). Prikazani rezultati ukazuju da uticaj agensa za učvršćivanje podloge na regenerativni potencijal jabuke i vitrifikaciju izdanaka u najvećoj meri zavisi od genotipa, što nameće potrebu ispitivanja njegove primene za svaku pojedinačnu sortu.

Poznato je da efikasnost regeneracije, pored brojnih drugih faktora, zavisi i od tipa ekplantata i njegove orijentacije prema podlozi na kojoj se vrši kultivacija (George, 1993). Orijehtacija odsečaka listova kao eksplantata sorti Zlatni Delišes i Melrouz je značajno uticala na učestalost regeneracije kod obe ispitivane sorte. Najviša vrednost učestalosti regeneracije od 97,4% je postignuta kada su eksplantati sorte Melrouz bili okrenuti svojom adaksijalnom stranom prema M2 podlozi, a eksplantati sorte Zlatni Delišes svojom abaksijalnom stranom. Međutim, tip eksplantata, tj. položaj odsečka lista duž aksijalne ose

nije imao statistički značajnog uticaja na regenerativni odgovor ovih sorti, za razliku od rezultata Yepes i Aldwinckle (1994), koji su uočili značajan porast regenerativnog kapaciteta odsečaka listova sorti Liberty i McIntoch, polazeći od vrha ka bazi liske. Slično, Sriskandarajah i saradnici (1990), kao i Caboni i saradnici (1996) su utvrdili da je najveći broj izdanaka regenerisan sa središnjih segmenata liske bližih petioli, kod nekoliko sorti jabuke.

Iako je BA je najčešće korišćen citokinin u protokolima za regeneraciju jabuke (Magyar-Tábori i sar., 2010), TDZ je manje podložan enzimatskoj degradaciji *in vivo* u poređenju sa BA, te stoga ima izraženije dejstvo na indukciju proliferacije aksilarnih pupoljaka, čak i pri niskim dozama (Magyar-Tábori i sar., 2010). Međutim, odgovor eksplantata na stimulaciju sa BA i TDZ-om prevashodno zavisi od genotipa. Theiler-Hedtrich i Theiler-Hedtrich (1990) su primetili da su Zlatni Delišes, Florina i M9 bolje regenerisali na podlozi sa TDZ-om, dok su Priscilla, M26 i M27 dali najbolji regenerativni odgovor na podlozi sa BA. Slična učestalost regeneracije je postignuta sa 1,0 μM TDZ-om i 22 μM BA kod sorte Gala (58 i 54%, redom), dok se BA pokazao pogodnijim za regeneraciju sorti Jork 9 i Mc Intosh (Caboni i Tonelli, 1999) i Bramley (McAdam-O Connell i sar., 2004). U našem eksperimentu na M1 podlozi, koja je pored auksina sadržala TDZ u relativno niskoj koncentraciji od 3,0 μM , 50% svih eksplantata kod obe sorte je imalo regenerativnu sposobnost. Na M2 podlozi koja je sadržala visoku koncentraciju TDZ-a od 22,0 μM dobijen je bolji regenerativni odgovor i kod sorte Melrouz (71,3%) i kod Zlatnog Delišesa (82%). Iako je došlo do formiranja kalusa na eksplantatima gajenim na M3 podlozi za indukciju kalusa, nakon prenošenja na M3 podlogu za regeneraciju koja je sadržala BA umesto TDZ-a, eksplantati su nekrozirali i nisu formirali izdanke. Time je nedvosmisleno pokazano da je produžena kultivacija na podlozi koja je pored auksina sadržala i TDZ, bila ključna za regeneraciju izdanaka iz odsečaka listova jabuke sorti Melrouz i Zlatni Delišes.

Poznato je da citokinini, a pogotovo više koncentracije TDZ-a, iako povećavaju regenerativni kapacitet, mogu da dovedu do pojave vitifikacije izdanaka kod mnogih drvenastih voćnih vrsta, uključujući i jabuku (Pawlicki i Welander, 1994; Caboni i sar.,

1996). Povećana učestalost vitrifikacije (36% - 100%, u zavisnosti od predretmana) je zabeležena na podlogama sa TDZ-om, u poređenju sa podlogama koje su sadržale BA (13,4 - 56,8%) (Dobránszki i sar., 2002). U našim studijama, vitrifikacija se javljala kod izdanaka sorti Melrouz i Zlatni Delišes sa relativno malom učestalošću na obe podloge za regeneraciju (M1 i M2,) ali je bila nešto veća na M2 podlozi koja je sadržala višu koncentraciju TDZ-a. Takođe, uočeno je da je sorta Melrouz bila podložnija vitrifikaciji (do 11,1%) nego sorta Zlatni Delišes (do 7,3%).

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da regenerativni odgovor jabuke indukovani TDZ-om pre svega zavisi od sorte. Uprkos istoj učestalosti regeneracije kod obe sorte (97,4%), pri najoptimalnijim uslovima (orijentacija eksplantata i podloga) prosečan broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu je bio manji kod sorte Zlatni Delišes, što je rezultiralo skoro dvostruko manjom SFC vrednošću za ovu sortu (5,30) u odnosu na Melrouz (10,02). Međutim, treba istaći da je učestalost regeneracije sorte Zlatni Delišes od 97,4% bila veća u našim ogledima u odnosu na vrednosti koje su prijavili drugi autori (4% do 73%) na podlogama sa TDZ-om u koncentracijama 10 ili 25 μM , (Dufour, 1990), 1 μM (Theiler-Hedtrich i Theiler-Hedtrich, 1990), 4,0 μM (Korban i sar., 1992) i 0,91 μM (Viršček-Marn i sar., 1999). Verovatno je da je povećana koncentracija TDZ-a u podlozi za regeneraciju bila jedan od ključnih faktora odgovornih za postizanje dobrog regenerativnog odgovora sorti Melrouz i Zlatni Delišes u našim ogledima. Na osnovu ovih rezultata, Melrouz i Zlatni Delišes se mogu svrstati među sorte koje za regeneraciju izdanaka procesom organogeneze *de novo* zahtevaju nešto više koncentracije TDZ-a (više od 10 μM), slično kao i M7, Macspur, Gala (Korban i sar., 1992), Paladino Spur McIntosh (Fasolo i sar., 1989) i Strakrimson (Gercheva i sar., 2000). Nasuprot tome, Alkmene, Greensleeves, Ajdared i M9 zahtevaju jako niske koncentracije TDZ-a za regeneraciju (0,44 μM) (Hanke i sar., 1991). Kod ovih sorti je sa povećanjem koncentracije TDZ-a u podlozi dobijena veća produkcija kalusa, ali manji broj regenerisanih izdanaka.

5.1.2. Uticaj β -laktamskih antibiotika na regeneraciju izdanaka jabuke

β -laktamski antibiotici su široko primenjivana grupa antibiotika čiji se mehanizam delovanja zasniva na interakciji sa penicilin-vezujućim proteinima u ćelijskom zidu bakterije i inhibiciji biosinteze peptidoglikanske mreže, što dovodi do lize i smrti bakterijske ćelije (Nauerby i sar., 1997). Poznato je da primena β -laktamskih antibiotika kod biljnih organizama može izazvati inhibiciju (da Silva Mendes i sar., 2009; Qin i sar., 2011) ili stimulaciju (Costa i sar., 2000; Tereso i sar., 2006; Bosela, 2009; Naderi i sar., 2016) regenerativnog procesa. Takođe, β -laktamski antibiotici mogu uticati na različite aspekte regeneracije kao što su indukcija kalusa (Qin i sar., 2011), formiranje izdanaka (Dai i Castillo, 2007), somatska embriogeneza (Mittal i sar., 2009) ili ožiljavanje izdanaka (da Silva Mendes i sar., 2009). Ovi antibiotici imaju široku primenu u procesu transformacije biljaka kao efikasno sredstvo za eliminaciju zaostalih agrobakterija nakon perioda kokultivacije. Prenamnožavanje bakterija, nakon što je završen proces transfera genetičkog materijala, dovodi do ugrožavanja procesa regeneracije i propadanja biljnog materijala. Iz tog razloga je odabir antibiotika koji bi efikasno eliminisao zaostale bakterije nakon procesa kokultivacije, a ujedno pospešio ili u najmanju ruku održao proces regeneracije, od ključnog značaja za uspešnost transformacije. S obzirom da osetljivost biljne ćelije na antibiotike zavisi od vrste, genotipa, pa čak i tkiva kojem ćelija pripada (Puite i sar., 1996; Maximova i sar., 1998; Padilla i Burgos, 2010; Dai i sar., 2013), bitno je posebnu pažnju obratiti odabiru tipa i koncentracije antibiotika u zavisnosti od sorte ili vrste početnog materijala za transformaciju. Ovo je posebno značajno za vrste kod kojih je efikasnost transformacije niska, kao što je jabuka (James i sar., 1989, Zhang i sar., 1997; Maximova i sar., 1998; Seong i sar., 2005; Dai i sar., 2013). Cefotaksim i karbenicilin su jedini β -laktamski antibiotici o čijem uticaju na organogenezu sorte Zlatni Delišeš postoje literaturni podaci (Yepes i Aldwinckle, 1994). Sa pojavom novijih β -laktamskih antibiotika, kao što su meropenem i timentin, javlja se potreba za opširnijim studijama njihovog efekta na proces organogeneze kod jabuke u cilju povećanja njenog regenerativnog potencijala, kao i primene u procesu transformacije ove biljne vrste.

Rezultati ove disertacije ukazuju da cefotaksim u koncentraciji 300 mg L⁻¹ deluje stimulatorno na proces regeneracije izdanaka sorte Zlatni Delišeš, povećavajući prosečan broj izdanaka po eksplantatu sa 7,67 kod kontrole na 9,39. Sličan efekat cefotaksima zabeležen je od strane Yepes i Aldwinckle (1994) koji su ukazali da je ovaj antibiotik u koncentraciji od 250 mg L⁻¹ delovao stimulatивно na regenerativni potencijal odsečaka listova nekoliko sorti jabuke (Empire, Freedom, Zlatni Delišeš, Liberty, McIntosh i Mutsu) kao i M7A podloge za kalemljenje. Ovaj efekat se ogledao kako u povećanju učestalosti regeneracije, tako i prosečnog broja regenerisanih izdanaka kod svih ispitivanih sorti. Stimulativni efekat cefotaksima u koncentraciji od 200 mg L⁻¹ i povećanje učestalost regeneracije i broja regenerisanih izdanaka na eksplantatima odsečaka listova je takođe zabeležen i kod podloge za kalemljenje MM106 (Modgil i Sharma, 2009).

Međutim, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da najniža testirana koncentracija cefotaksima od 100 mg L⁻¹ značajno smanjuje učestalost regeneracije u odnosu na kontrolu. Ovakav tip odstupanja od dozne zavisnosti su potvrdili i drugi autori u svojim istraživanjima dejstva antibiotika na procese regeneracije i rasteња. Tako je npr. timentin u koncentraciji od 200 mg L⁻¹ značajno inhibirao efikasnost regeneracije u kulturi protoplasta šargarepe, dok niže i više koncentracije od pomenute nisu imale uticaja na ovaj proces (Grzebelus i Skop, 2014). Takođe, cefotaksim i karbenicilin su uticali na smanjeno izduživanje izdanaka, razvoj biomase i broja listova biljaka hrizanteme gajenih na podlozi sa ovim antibioticima u koncentraciji od 100 mg L⁻¹, dok dvostruko viša koncentracija pomenutih antibiotika (200 mg L⁻¹) nije imala inhibitoran uticaj (Naing i sar., 2014).

Negativan efekat viših koncentracija cefotaksima je poznat u literaturi, a potvrđen je i u ovoj disertaciji. Rezultati su pokazali da koncentracije od 500 i 600 mg L⁻¹ značajno smanjuju učestalost regeneracije i prosečan broj pupoljaka po eksplantatu kod sorte Zlatni Delišeš. Upotreba cefotaksima u koncentraciji od 400 mg L⁻¹, u protokolu za *de novo* organogenezu iz odsečaka listova kod sorte za kalemljenje MM106, je dovela do smanjenja prosečnog boja regenerisanih izdanaka, a koncentracija od 500 mg L⁻¹ i do smanjenja procenta eksplantata sa regenerisanim izdancima (Modgil i Sharma, 2009). Pad regenerativnog potencijala pri upotrebi 500 mg L⁻¹ cefotaksima, zabeležen je kod svih sedam

ispitivanih sorti jabuke, kao i kod podloge za kalemljenje M7A u radu Yepes i Aldwinckle (1994). Prema rezultatima ovih autora, učestalost regeneracije Zlatnog Delišesa je opala sa 95% na podlozi bez antibiotika, na 68% koliko je zabeleženo na tretmanu sa 500 mg L⁻¹ cefotaksima. Takođe, prosečan broj izdanaka po eksplantatu snižen je sa 5,6 kod kontrole na 3,1 na tretmanu antibiotikom, nakon šest nedelja kultivacije. U odnosu na rezultate u radu Yepes i Aldwinckle (1994), rezultati izloženi u ovoj disertaciji ukazuju da je tretman sa 500 mg L⁻¹ cefotaksima izazvao nešto blaži pad učestalosti regeneracije sa 94,8% kod kontrole na 77,1 % kod tretmana, kao i prosečnog broja izdanaka po eksplantatu sa 7,67 na 6,34. Može se zaključiti da je uticaj individualne varijabilnosti genotipa jedan od činilaca koji fino moduliše proces *de novo* organogeneze kod jabuke.

Mehanizmi koji leže u osnovi dejstva cefotaksima na procese u biljnom organizmu još uvek nisu rasvetljeni. Primećeno je da cefotaksim značajno odlaže gubitak regenerativnog potencijala embriogenih kultura *Pennisetum americanum*, smanjujući sadržaj etilena u atmosferi ovih kultura, što može biti posledica sposobnosti ovog antibiotika da inhibira produkciju etilena (Pius i sar., 1993). Grewal i saradnici (2006) su primetili da su biljčice Basmati pirinča, regenerisane iz kalusa gajenog na podlozi sa cefotaksimom, bile intenzivnije boje u odnosu na izdanke dobijene regeneracijom iz kontrolnog kalusa. Na osnovu ovih zapažanja, pomenuti autori su pretpostavili da cefotaksim može delovati na proces sinteze hlorofila. S druge strane, postoji pretpostavka da biljne esterase mogu da razlože cefotaksim dajući nova jedinjenja koja mogu imati svojstva regulatora rastenja (Mathias i Boyd, 1986). Cefotaksim je polusintetički antibiotik koji pripada grupi cefalosporina (Bucourt i sar., 1980). Njegova sličnost sa karbenicilinom i penicilinom G se ogleda u posedovanju β-laktamskog prstena, koji je zajednička karakteristika dve velike grupe antibiotika: cefalosporina i penicilina. Primenom HPLC analize je potvrđeno da produženim skladištenjem karbenicilina ili pravljenjem njegovog vodenog rastvora, dolazi do razgradnje ovog antibiotika na fenilsirćetnu kiselinu ili fenilmalonsku kiselinu i 6-aminopenicilansku kiselinu, koja u svojoj strukturi sadrži β-laktamski prsten (Holford i Newbury, 1992). Fenilsirćetna kiselina je prirodni auksin identifikovan kod brojnih vrsta biljaka (Wightman i Lighty 1982). Holford i Newbury

(1992) su potvrdili da stimulacija formiranja kalusa na hipokotilu *Antirrhinum majus* nakon dodatka karbenicilina i penicilina G jeste posledica dejstva fenilsirćetne kiseline kao produkta njihove razgradnje. S druge strane, isti autori ukazuju da β -laktamski prsten u sastavu 6-aminopenicilanske kiseline, nastao razgradnjom penicilinskih antibiotika, ispoljava blag inhibitorni uticaj na rastenje koleoptila ovsu, a da je toksičan za kulture hipokotila *Antirrhinum majus* u koncentraciji od 25 mg L⁻¹. Postoji mogućnost da β -laktamski prsten u sastavu 7-aminocefalosporanske kiseline, koja nastaje razgradnjom cefalosporina, može ispoljiti inhibitorno dejstvo na proces *de novo* oraganogeneze jabuke pri većim koncentracijama cefotaksima.

Meropenem i timentin su u svim testiranim koncentracijama umanjili regenerativni odgovor eksplantata listova jabuke i generalno pokazali izraženije inhibitorno dejstvo u poređenju sa cefotaksimom. Uprkos ovim rezultatima, pupoljci regenerisani na podlozi sa meropenemom u koncentracijama od 25 to 125 mg L⁻¹ su rasli intenzivnije i dali veće, snažnije i bolje razvijene izdanke, nego oni koji su isti vremenski period gajeni na podlozi sa cefotaksimom. Slična pojava regeneracije krupnijih izdanaka na podlozi koja je sadržala meropenem u koncentraciji od 100 mg L⁻¹, kao i njihovo intenzivnije rastenje u odnosu na kontrolu bez antibiotika, je bila zapažena kod japanske sorte jabuke Orin (Komori i sar., 2009).

Timentin je sačinjen od tikarcilina kombinovanim sa K-klavulatom, soli klavulanske kiseline, koja je inhibitor enzima β -laktamaza, prisutnih kod sojeva bakterija rezistentnih na peniciline i cefalosporine (Demain i Elander, 1999). U literaturi je poznato stimulatívno delovanje timentina na regenerativni proces kod duvana (Nauerby i sar., 1997), pomorandže (da Silva Mendes i sar., 2009) i paradajza (Costa i sar., 2000; Mamidala i Nanna, 2009). Međutim, iako je primenjivan u protokolima za transformaciju jabuke u koncentracijama od 150 i 400 mg L⁻¹ (Szankowski i sar., 2003; De Bondt i sar., 2008), njegov efekat na morfogenezu nije proučavan. Rezultati ove disertacije su pokazali da je timentin imao inhibitoran uticaj na *de novo* organogenezu jabuke koji je zavisio od primenjene koncentracije. Negativno dejstvo timentina na morfogenezu je primećeno i kod somatske embriogeneze lešnika (Tang i sar., 2000) i kakaa (Silva i sar., 2009), a smatra se

da bi moglo biti posledica narušavanja hormonalnog balansa izazvanog prisustvom tikarcilina i K-klavulata ili produkata njihove razgradnje.

5.1.3. Umnožavanje regenerisanih izdanaka

Umnožavanje izdanaka zavisi od inicijacije i aktivnosti aksilarnih meristema, koji su prevashodno kontrolisani citokinima. Citokinini deluju u interakciji sa auksinima, iako je efekat auksina indirektan (Ward i Leyser, 2004). Umnožavanje izdanaka jabuke se zasniva na odabiru podloga koje sadrže citokinine, kao glavne regulatore rastenja, sa dodatkom nižih koncentracija auksina ili ponekad giberelina (Dobránszki i sar., 2010). Najveći broj autora je za umnožavanje pupoljaka jabuke koristio BA u koncentraciji od 2,25 μM do 9,0 μM (Baraldi i sar., 1991; Marin i sar., 1993; Yepes i Aldwinckle, 1994; Dobránszki i sar., 2000; Sharma i sar., 2000). U našim ogledima, podloga koja je sadržala 2,25 μM BA i 0,26 μM NAA omogućila je efikasno umnožavanje izdanaka sorti Melrouz i Zlatni Delišes. Interesantno je da je sastav podloga na kojoj su izdanci regenerisani značajno uticao, ne samo na proces regeneracije izdanaka iz odečaka listova, nego i na umnožavanje tako regenerisanih izdanaka na SMM podlozi. Tako je stopa umnožavanja kod obe sorte bila dvostruko veća u slučaju kada je za regeneraciju izdanaka korišćena M2 umesto M1 podloge. Ovo je u saglasnosti sa ranijim zapažanjima da je podloga sa koje su poticali eksplantati imala značajan uticaj na kasniju regeneraciju kod drvenastih voćnih vrsta kao što su višnja (Antonelli i Druart, 1990) i kajsija (Burgos i Alburquerque, 2003).

Poznato je da je genotip presudan faktor koji moduliše fiziološki odgovor na egzogeno dodate regulatore rastenja i time kontroliše efikasnost umnožavanja (Yepes i Aldwinckle, 1994; Karhu, 1995). Izdanci sorte Melrouz sa obe podloge za regeneraciju, su u našem radu pokazali veći potencijal za umnožavanje od sorte Zlatni Delišes. Primenjeni protokol za umnožavanje jabuke je rezultovao stopom multiplikacije od 13,4 izdanka/eksplantatu za Melrouz i 9,0 izdanka/eksplantatu za sortu Zlatni Delišes, poreklom sa M2 podloge. Stopa multiplikacije za sortu Zlatni Delišes je na podlozi sa 4,4 μM BA 0,5 μM IBA i 1,4 μM GA₃ iznosila 9,0 izdanaka/eksplantatu, a za sortu Jonatan samo 2,5 izdanaka/eksplantatu na podlozi istog sastava (Yepes i Aldwinckle, 1994). Ovi rezultati još

jednom potvrđuju da genotip ima izražen uticaj na stopu multiplikacije izdanaka jabuke i da protokol za njihovo umnožavanje mora biti pažljivo definisan za svaku pojedinačnu sortu.

5.1.4. Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka

Egzogeno dodati auksini imaju sposobnost da indukuju formiranje adventivnih korenova. Međutim, auksini su neophodni samo u ranim stupnjevima njihovog formiranja (Harbage i sar., 1998; Abel i Theologis, 1996). U kasnijim fazama, oni mogu modifikovati ili čak inhibirati razvoj korenovog sistema (Druart, 1997; De Klerk i sar., 1999). Iz tog razloga, najveći broj protokola podrazumeva primenu dvofaznog sistema za ožiljavanje, kod koga se u prvoj fazi odvija indukcija korenova uz prisustvo auksina, a pojava i elongacija korenova u njihovom odsustvu, u fazi koja sledi. Protokol primenjen za ožiljavanje sorti Melrouz i Zlatni Delišeš se sastojao od inkubacije izdanaka na podlozi sa dodatkom auksina IBA ili NAA u trajanju od sedam dana, a zatim njihovim prenosom na podlogu bez regulatora rasteinja, gde je došlo do pojave i elongacije korenova.

Sposobnost ožiljavanja u najvećoj meri zavisi od genotipa. Najveći procenat ožiljavanja od 74,3% je zabeležen kod izdanaka sorte Zlatni Delišeš kod kojih su korenovi indukovani na podlozi sa 2,5 μM IBA, što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih publikacija (65-80%) (Liu i sar., 1983; Belaizi i sar., 1991; Sriskindarajah i sar., 1994). Primećeno je da se učestalost ožiljavanja Zlatnog Delišeša smanjivala sa porastom koncentracije IBA u podlozi, tj. da ovoj sorti odgovara nešto niža koncentracija IBA za postizanje maksimalne stope ožiljavanja, slično kao i u slučaju sorte za kalemljenje M26 (Magyar-Tábori i sar., 2002). Nasuprot tome, Melrouz bi se mogla okarakterisati kao sorta sa umerenim potencijalom za ožiljavanje (62,1%) na podlozi sa povećanim sadržajem IBA (10 μM) i nešto manjim prosečnim brojem korenova po izdanku (2,4) u odnosu na Zlatni Delišeš (3,2).

NAA je imala manju sposobnost indukcije korenova kod sorti Melrouz i Zlatni Delišeš od IBA na svim ispitivanim koncentracijama. Neki autori su ukazali da je NAA indukovala formiranje veće količine kalusnog tkiva na bazi izdanaka i da korenovi koji su

se se formirali iz kalusa nisu imali vaskularnu vezu sa izdankom (Hicks, 1987; Harbage i sar., 1998; Yepes i Aldwinckle, 1994; Bommineni i sar., 2001). Oni su takođe primetili da je IBA uzrokovala pojavu manje količine kalusa od NAA, a da su formirani korenovi bili brojniji i povezani vaskularnom vezom sa izdankom.

Iako su genotip i auksini najuticajniji faktori koji koordinišu proces ožiljavanja *in vitro*, sadržaj i vrsta citokinina u podlozi za regeneraciju ili umnožavanje izdanaka mogu značajno uticati na kasnije formiranje korenova kod jabuke (Webster i Jones, 1991; Marin i sar., 1993; Magyar-Tábori i sar., 2011). Naročito visoke koncentracije TDZ-a mogu delovati inhibitorno na taj proces (van Nieuwkerk i sar., 1986; Magyar-Tábori i sar., 2011). Kod sorti Melrouz i Zlatni Delišes, regenerisanih na M1 i M2 podlogama koje sadrže različite koncentracije TDZ-a, nije zapažena razlika u stopi ožiljavanja. Moguće je da je period kultivacije izdanaka na podlozi za umnožavanje, koja nije sadržala TDZ, u trajanju od šest nedelja, posebno doprineo neutralizaciji njegovog potencijalno negativnog efekta. Slično, izdanci sorte Royal Gala, regenerisani na podlozi sa TDZ-om, su ostvarili značajno veću stopu ožiljavanja ukoliko su prethodno gajeni na podlozi za umnožavanje bez ovog regulatora rastanja (Magyar-Tábori i sar. 2011).

Različite sorte jabuke i podloge za kalemljenje, gajene i ožiljene *in vitro*, se relativno dobro aklimatizuju (Dufour, 1990; Pawlicki i Welander, 1994; Bolar i sar., 1998; Magyar-Tábori i sar., 2011). Uspešna aklimatizacija ožiljenih biljaka postignuta je i kod sorti Melrouz i Zlatni Delišes, zasađenih u mešavini zemlje i peska u razmeri 3:1. Iako je zemlja podložnija razvoju gljivica nego drugi kompoziti (Modgil i sar., 2009), efikasnost ožiljavanja je bila na zadovoljavajućem nivou (74% za Melrouz i 89% za Zlatni Delišes), što je u skladu sa stopama aklimatizacije (70-100%) koje su postignute kod drugih sorti jabuke kao što su Marshall, McIntosh Golden, Liberty, Royal Gala, Galaxy i M.26 (Bolar i sar., 1998).

5.2. Genetička transformacija jabuke

5.2.1. Genetička transformacija sa *Agrobacterium rhizogenes* 15834

Kod vrsta iz roda *Malus*, genetička transformacija uz pomoć *A. rhizogenes* vektora je primenjivana prevashodno sa ciljem povećanja stope ožiljavanja različitih podloga za kalemljenje jabuke (Sutter i Luza, 1993; Damiano i Monticelli, 1998; Yamashita i sar., 2004). Prema dostupnim literaturnim podacima, do sada nije bilo pokušaja izolacije transformisanih korenova i njihove nezavisne propagacije u kulturi *in vitro*. U ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put je postignuta uspešna transformacija sorti Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster korišćenjem *A. rhizogenes* vektora, kao i uspostavljanje permanentne *in vitro* kulture transformisanih korenova jabuke. Među faktorima koji utiču na uspešnost transformacije drvenastih voćnih vrsta, genotip se pominje kao najčešći limitirajući faktor za transfer željenih gena u biljnu ćeliju (Petri i sar., 2005). Prema rezultatima ove disertacije, metod inokulacije agrobakterija se pokazao podjednako važnim činiocem u transformacionom procesu, kao i sam genotip. Pokazano je da je sorta Melrouz znatno podložnija infekciji *A. rhizogenes* ukoliko su bakterije inokulisane ozleđivanjem stabljike izdanaka iglom (70,2%), nego u slučaju uranjanja presečenog kraja stabljike u bakterijsku suspenziju (3,3%). Iako je inokulacija ozleđivanjem iglom ili skalpelom najčešće primenjivan metod inokulacije agrobakterija i kod drugih biljnih vrsta (Gutiérrez-Pesce i sar., 1998; Vinterhalter i sar., 2006; Ninković i sar., 2010; Bogdanović i sar., 2014), drugi način inokulacije se pokazao znatno efikasnijim za transformaciju sorti Zlatni Delišes, Čadel i Gloster. Upravo ovaj metod uranjanja presečenog kraja stabljike u bakterijsku suspenziju je sa uspehom korišćen i za transformaciju dve podloge za kalemljenje jabuke: Jork 9 (Pawlicki-Jullian i sar., 2002) i *Malus baccata* (Wu i sar., 2012). Transformacija sorte Jork 9 je dovela do pojave transformisanih korenova sa različitom učestalošću (16,7% - 77,8%), u zavisnosti od soja *A. rhizogenes* kojim je vršena inokulacija (Pawlicki-Jullian i sar., 2002). Među raznim korišćenim sojevima, *A. rhizogenes* 15834 se pokazao najmanje efikasnim za transformaciju pomenute sorte. Međutim, isti soj korišćen u ovoj disertaciji je doveo do pojave korenova sa učestalošću od čak 39,29% kod sorte Zlatni Delišes, inokulisane na isti način kao Jork 9, što još jednom potvrđuje uticaj genotipa na

efikasnost transformacije. Kod izdanaka inokulisanih pomenutom metodom došlo je do formiranja korenova, ne samo na mestu preseka izdanka, već i iznad bazalnog kraja izdanka, npr. na stabljici ili čak listovima izdanka. Ova pojava je najverovatnije posledica infekcije ćelija listova, usled slučajnog ozleđivanja u toku manipulacije ili prodiranja bakterija sa mesta preseka preko sprovodnih elemenata.

Iako je najveći broj formiranih korenova ispoljavao izražen agravitropski rast, većina njih nije bila gusto razgranata, već je posedovala ređe raspoređene lateralne korenove bez korenskih dlaka karakterističnih za fenotip transformisanih korenova (Tepfer i Casse-Delbart, 1987). Ovakva morfologija korena je najverovatnije specifičnost roda *Malus*, s obzirom da su korenovi sličnih karakteristika dobijeni transformacijom kod nekoliko vrsta podloga za kalemljenje jabuke: *Malus pumila* (Sutter i Luza, 1993), Jork 9 (Pawlicki-Jullian i sar., 2002) i *Malus baccata* (Wu i sar., 2012).

Nasuprot relativno sličnoj morfologiji koju su transformisani korenovi imali dok su još bili na izdancima, linije različitih korenova gajene kao individualne *in vitro* kulture su se odlikovale veoma različitim stopom rastezanja i formiranja lateralnih korenova. Zapažene razlike su verovatno specifičnosti samih linija, s obzirom da su se različite karakteristike mogle primetiti kod linija koje potiču sa istog izdanka, a iste osobine kod linija različitih sorti. Ovakva pojava je veoma često zapažena i kod transformisanih korenova drugih vrsta (Chaudhuri i sar., 2005; Tiwari i sar., 2007; Taneja i sar., 2010; Mitić i sar., 2012). Mnogi autori fenotipske razlike transformisanih linija pripisuju različitoj integraciji gena sa T_L- i T_R-DNK u genom biljne ćelije prilikom transformacionog događaja (Batra i sar., 2004; Tiwari i sar., 2007; Taneja i sar., 2010). Poznato je da se T-DNK agropinskog tipa Ri plazmida sastoji od T_L-DNK i T_R-DNK koje su razdvojene intergenskim regionom (White i sar. 1985). T_L-DNK kodira *rolA*, *B*, *C* i *D* gene (Taylor i sar., 1985), dok T_R-DNA sadrži *aux1* i *aux2* gene koji su homologni *tms1(iaaM)* i *tms2(iaaH)* genima sa T-DNK Ti plazmida, a koji kodiraju enzime koji katalizuju dva uzastopna koraka na putu sinteze indol-3-sirćetne kiseline (IAA) (Huffman i sar., 1984; Jouanin, 1984). U našem radu je potvrđena ekspresija *rolA*, *B*, *C* i *D* gena u svim linijama transformisanih korenova jabuke, dok su se one razlikovale u ekspresiji *aux* gena. Međutim, nije uočena korelacija između

ekspresije *aux* gena i fenotipskih odlika odgovarajućih linija. Među linijama koje ne ekspimiraju *aux* gene ili ekspimiraju samo jedan od njih (*aux1* ili *aux2*) i samim tim nemaju sposobnost produkcije IAA, zapažaju se linije različite morfologije, stope rastenja i sposobnosti formiranja lateralnih korenova. Linija ZD12 koja ne ekspimirira *aux1* gen, odlikuje se većim prirastom biomase u poređenju sa tri linije kod kojih se ekspimiraju oba *aux* gena. Iako literaturni podaci ukazuju da je ekspresija *rolA*, *B* i *C* gena neophodna, ali i dovoljna za ispoljavanje tipičnog fenotipa transformisanih korenova duvana (Cardarelli i sar., 1987; Spena i sar., 1987; Vilaine i sar., 1998). Nemoto i saradnici (2009) ističu važnost isključivo *aux1* gena, čija je ekspresija u transformisanim BY-2 ćelijama duvana bila dovoljna da obezbedi ovim, inače auxin zavisnim ćelijama, nesmetano rastenje u odsustvu auksina. Rezultati ove teze ukazuju da *aux1* i *aux2* geni nisu odgovorni za fenotip transformisanih korenova jabuke u *in vitro* kulturi. Slično, prisustvo oba *aux* gena kod transformisanih korenova vrste *Catharanthus roseus*, uz kompletnu integraciju gena sa T_L-DNK, nije bilo uslov za dobro rastenje i granjanje takvih linija (Batra i sar., 2004; Taneja i sar., 2010).

S druge strane, s obzirom na prisustvo *rolA*, *B*, *C* i *D* gena kod svih 28 analiziranih linija, dodatne analize bi bile neophodne radi procene potencijalne povezanosti nivoa ekspresije ovih gena sa grananjem i rastom transformisanih linija korenova jabuke. Takođe, i drugi faktori kao što su broj kopija transgena, pozicioni ili epigenetički efekat mogu ležati u osnovi ove pojave. Poznato je da je ekspresija *rolB* gena indukovana auksinima i da sudbina meristema koji se razvija pod kordinacijom *rolB* gena zavisi od lokalnog hormonskog balansa u ćeliji (Baumann i sar., 1999). Samim tim, razlike između dobijenih linija mogu biti posledica različite osetljivosti na hormone i/ili različitog nivoa hormona u ćelijama od kojih transformisani korenovi vode poreklo.

Neočekivano, RT-PCR analizom su detektovani signali veoma slabog intenziteta za *rolA*, *C* i *D* gene i u uzorcima netransformisanih (kontrolnih) korenova jabuke. Sličan slučaj je bio zabeležen i kod podloge za kalemljenje M26, gde je utvrđena hibridizacija restrikcionihih fragmenata DNK iz netransformisanih biljaka jabuke i proba specifičnih za T_L- i T_R-region T-DNK, što je sugerisalo na mogući transfer gena između *A. rhizogenes* i

pretka jabuke u davnoj prošlosti (Lambert i Tepfer, 1992). Ovakva pojava je prvi put bila zabeležena kod vrste *Nicotiana glauca* čiji genom sadrži region homolog T_L-DNK označen kao celularna T-DNK (cT-DNK) (White i sar., 1983). *Southern-blot* analizom je otkriveno da cT-DNK sadrži region koji odgovara ORF11(*rolB*), 12 (*rolC*), 13, 14, i 15 (*rolD*) iz T-DNK. U početku su *c-rol* geni samatrani pseudogenima, dok njihovi aktivni transkripti nisu otkriveni kod drugih vrsta roda *Nicotiana* (Aoki i sar., 1994; Meyer i sar., 1995). Meyer i saradnici (1995) i Fründt i saradnici (1998) su otkrili da su *t-rolC* i *t-orf13* geni iz vrste *N. tabacum* homologni *rolC* i *orf13* genima iz agropinskog, mikimopinskog i manopinskog Ri plazmida, kao i *Ng-rolC* i *Ng-orf13* genima iz *N. glauca*. *Southern-blot* analiza je potvrdila da *t-rolC* i *t-orf13* geni potiču iz pretka današnjeg duvana *N. tomentosiformis*, a u čiji genom su najverovatnije dospeli horizontalnim genetičkim transferom usled infekcije sa *A.rhizogenes* u davnoj prošlosti (Meyer i sar., 1995; Fründt i sar., 1998). Slična pojava zabeležena je i kod drugih vrsta biljaka, pored duvana i jabuke, kao što su *Convolvulus arvensis* (Tepfer, 1983) i *Ajuga reptans* (Tanaka i sar., 1998).

5.2.2. Optimizacija uslova za gajenje kultura transformisanih korenova jabuke *in vitro*

Izvestan broj linija potencijalno transformisanih korenova jabuke je ubrzo nakon odvajanja od izdanka ili tokom prvih meseci gajenja u tečnoj podlozi u potpunosti prestao da raste. Uprkos evidentnom konstantnom raste, većinu preživelih linija odlikovalo je slabo grananje i mali prirast biomase tokom jedne subkulture. Radi stimulacije raste i formiranja lateralnih korenova transformisanih linija testirane su podloge različitog mineralnog sastava uz dodatak auksina (IBA i NAA) u više koncentracija.

MS mineralna podloga sa dvostruko manjom koncentracijom makro i mikro soli (½MS) se pokazala kao najoptimalnija za gajenje transformisanih korenova jabuke jer je indukovala najveći prirast biomase (231%) nakon šest nedelja kultivacije. Ista podloga se pokazala najpogodnijom i za raste transformisanih korenova *Fagopyrum esculentum* (Lee i sar., 2007), dok je u slučaju kultura transformisanih korenova *Panax* hibrida (Washida i sar., 1998) i *Platycodon grandiflorum* (Tada i sar., 1995) najefikasnija bila B5

(Gamborg i sar., 1968) podloga. Očigledno je da sadržaj i koncentracija makro i mikro soli u podlogama za rastenje kultura transformisanih korenova jabuke predstavlja značajan faktor i mora biti usklađena sa njihovim potrebama koje su pre svega *species* specifične.

Poznato je da transformisani korenovi imaju osobinu samostalnog rasteња (bez regulatora rasteња) i najčešće ih odlikuje bujno granjanje i intenzivni prirast biomase u kulturi *in vitro*. U osnovi takvog ponašanja leži njihova povećana senzitivnost na auksine, usled aktivnosti *rolB* gena (Shen i sar., 1988; Nilsson i Olsson, 1997; Baumann i sar., 1999). Primećeno je da dodatak egzogenih auksina može imati stimulatorni ili inhibitorni efekat na rastenje i razvoj transformisanih korenova, u zavisnosti od vrste auksina i njegove koncentracije (Liu i sar., 2002; Alpizar i sar., 2008). Rezultati ove disertacije ukazuju da dodavanje IBA u nižim koncentracijama ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ili $0,025 \text{ mg L}^{-1}$) u najvećoj meri stimuliše grananje i elongaciju lateralnih korenova, dok više koncentracije ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ili $0,2 \text{ mg L}^{-1}$) nemaju pozitivan efekat. Nasuprot tome, neki autori ističu da su više koncentracije IBA od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Alpizar i sar., 2008) i $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Washida i sar., 1998) imale najizraženiji stimulatorni efekat na rastenje i granjanje transformisanih korenova kafe i *Panax* hibrida. Liu i saradnici (2002) su zapazili da su grananje i elongacija lateralnih korenova transgenih kultura *Pueraria lobata* bili stimulisani na koncentraciji od $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, dok je 10 puta veća koncentracija ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) imala neutralan efekat, a nešto veća od nje ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) inhibitorno dejstvo. Očigledno je da endogeni sadržaj auksina, koji je karakterističan za svaku vrstu, moduliše efekat egzogenih auksina na granjanje i rastenje lateralnih korenova. Takođe, inhibitorni efekat viših koncentracija auksina može biti posledica interakcija sa kaskadnim procesom signalne transdukcije drugih endogenih hormona, uključenih u regulaciju rasteња i razvića lateralnih korenova, kao što su citokinini (Su i sar., 2011) i giberelini (Fu i Hardberd, 2003; Gou i sar., 2010). Iako je granjane i elongacija lateralnih korenova bila najizraženija u prisustvu nižih koncentracija IBA, najveći prirast biomase korenova je bio je zabeležen na $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Međutim, korenovi gajeni na ovoj koncentraciji NAA su bili deblji i kraći i formirali su znatnu količinu kalusnog tkiva koje je ubrzo inhibiralo dalje formiranje lateralnih korenova. Uopšte, dodavanje auksina u tečnu hranljivu podlogu je dovelo do pojave kalusiranja kod

transformisanih korenova jabuke s tim što je ovaj efekat je bio znatno izraženiji kada je tečna podloga sadržala NAA nego IBA u istim koncentracijama. Park i Facchini (2000) su zapazili da su $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA i $0,5 - 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA stimulisale rastenje transformisanih korenova dve vrste maka (*Papaver somniferum* i *Eschscholzia californica*), ali ujedno dovele do obrazovanja znatne količine kalusnog tkiva, što nije bio slučaj pri upotrebi iste koncentracije IAA. Kollárová i saradnici (2004) su, ispitujući efekte različitih auksina na rastenje kulture netransformisanih korenova vrste *Karwinskia humboldtiana*, primetili da su se korenovi gajeni u prisustvu $2,0$ i $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA odlikovali najvećim prirastom sveže mase, ali su bili veoma kratki, zadebljali i obrazovali su veliku količinu kalusa. Prirast suve mase ovih korenova je bio niži nego prirast suve mase korenova koji su gajeni na nižim koncentracijama NAA, a koji su imali niži prinos sveže mase. Autori smatraju da je porast sveže mase korenova gajenih na višim koncentracijama NAA pre svega posedica velike količine vode sadržane u kalusnom tkivu. Nasuprot tretmanima sa NAA i IAA, IBA je najviše stimulisala formiranje primordija lateralnih korenova i njihovo izduživanje, što je veoma slično našim rezultatima na kulturi transformisanih korenova jabuke.

Iako je IBA u koncentracijama od $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ povoljno delovala na inicijaciju i početno rastenje lateralnih korenova kod transformisanih linija jabuke sorti Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster, njeno prisustvo u dužem vremenskom periodu je je imalo negativan efekat jer je dovelo do pojačanog formiranja kalusa i zaostajanja u rastenju. Iz tog razloga, dodavanje IBA je preporučljivo isključivo nakon odvajanja transformisanih korenova jabuke sa izdanaka, to jest u početnim fazama uspostavljanja pojedinačnih kultura korenova, kako bi se stimulisala inicijacija primordija lateralnih korenova. Za dalje gajenje kultura bila bi pogodnija primena $\frac{1}{2}$ MS tečne podloge bez regulatora rasteња. Takođe, za stimulaciju sporo-rastućih linija transformisanih korenova mogla bi se preporučiti naizmjenična upotreba pomenute podloge i podloge sa IBA u kraćim vremenskim intervalima od nekoliko subkultura.

Za razliku od transformisanih korenova, *in vitro* kulturu netransformisanih korenova jabuke je bilo moguće uspostaviti isključivo egzogenom primenom IBA u koncentraciji od $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Međutim, produženo gajenje ovih korenova (duže od šest meseci) nije bilo

moguće čak ni uz upotrebu ovog auksina, jer su korenovi prestajali da se granaju, kalusirali su i ubrzo propadali. Sličan uticaj IBA na rastenje netransformisanih korenova vrste *Karwinskia humboldtiana* zabeležili su i Kollárová i saradnici (2004), primetivši postepen porast prirasta mase u prvih dva meseca gajenja na podlozi sa IBA (0,1-5 mg L⁻¹) nakon čega je došlo do prestanka rasteња kultura na svim koncentracijama IBA.

Linija ZD12, koja se odlikovala konstantnim rastenjem i umerenim prirastom biomase u tečnoj podlozi bez regulatora rasteња, je izabrana za dalji eksperimentalni rad. S obzirom na poznato dejstvo auksina na različite aspekte rasteња i razvića biljnog organizma (Teale i sar., 2006; Péret i sar., 2009; Kieffer i sar., 2010), odsustvo auksina u podlozi za uzgajanje transformisanih korenova je bilo od presudne važnosti za eksperimente u kojima je praćen efekat njihovog eksudata na klijanje, rastenje i razviće test-biljke *A. thaliana*.

5.3. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u transformisanim korenovima jabuke i u hranljivoj podlozi u kojoj su korenovi gajeni

Fenolna jedinjenja predstavljaju veliku grupu sekundarnih metabolita koji su odgovorni za mnoge alelopatske interakcije biljaka sa drugim biljkama ili mikroorganizmima (Blum, 1996; Reigosa i sar., 1999; Li i sar., 2010). Ona stoje u osnovi mnogih pojava u prirodnim i veštačkim ekosistemima, kao što su smanjenje prinosa žitarica usled alelohemijske inhibicije izazvane korovima, nemogućnost obnavljanja prirodnih šumskih ekosistema (Bais i sar., 2003; Hierro i Callaway, 2003) ili zakržljalog rasta sadnica posađenih na mestima prethodnih voćnjaka (Burger i Small, 1983). Sve ove pojave mogu proizvesti znatne ekološke štete i dovesti do značajnih ekonomskih gubitaka. S druge strane, raznovrsnost fenolnih jedinjenja i mehanizama njihovog alelopatskog delovanja pruža veliku mogućnost za razvoj novih herbicida čije bi se dejstvo ostvarivalo preko istih ciljnih mesta kao tokom alelopatske interakcije (Nimbal i sar., 1996).

Značajan broj fenolnih jedinjenja je detektovan u korenu, listovima, kori, plodovima i semenu jabuke (Hunter i Hull, 1993; Awad i sar., 2000; Treutter, 2001; Pontais i sar.,

2008). Neka od njih su pronađena i u zemljištu voćnjaka jabuke, kao posledica razgradnje opalih listova, kore, plodova i drugog organskog materijala poreklom od jabuke, ili eksudacije tih jedinjenja putem korenovog sistema u rizosferu (Hofmann i sar., 2009; Yin i sar., 2016).

Rezultati analize sadržaja sekundarnih metabolita transformisanih korenova linije ZD12 i netransformisanih korenova jabuke sorte Zlatni Delišeš su ukazali na prisustvo fenolnih kiselina, hlorogene, kafeinske, siringinske, p-kumarinske i ferulinske kiseline, kao i glikozilovanih flavonoida (florizin, rutin, kvercitrin, izokvercitrin i kemferol-3-glukozid). Za razliku od korena, u tečnoj hranljivoj podlozi u kojoj su gajeni transformisani korenovi su detektovana isključivo hlorogena i kafeinska kiselina i dihidrohalkoni florizin i floretin, što ukazuje da je samo mali broj jedinjenja sintetisanih u korenu bilo i eskudovano. Statistička analiza je ukazala da nije bilo značajne razlike između detektovanih količina florizina i drugih jedinjenja u transformisanim i netransformisanim korenovima jabuke, čime je potvrđeno da genetička transformacija jabuke *A. rhizogenes* vektorom nije dovela do promena u metabolizmu i dinamici sinteze ispitivanih sekundarnih metabolita. Takođe, biosinteza florizina i drugih flavonoida u transformisanim korenovima jabuke gajenim u kulturi *in vitro* u kojoj korenovi rastu nezavisno od nadzemnih delova biljke, potvrđuje rezultate Hoffmann-a i saradnika (2012) da su korenovi vrsta iz familije Rosaceae mesto ekspresije gena uključenih u biosintezu flavonola, među kojima je i gen za halkan sintazu, enzima koji katalizuje drugi korak sinteze florizina od *p*-kumaroil-CoA. Florizin je u tkivu transformisanih korenova bio prisutan u 100 do 1000 puta većoj količini u odnosu na ostala detektovana fenolna jedinjenja, što potvrđuje njegov status dominantnog sekundarnog metabolita jabuke utvrđenog od strane više autora (Hunter i Hull, 1993; Treutter, 2001; Pontais i sar., 2008). Uprkos velikoj zastupljenosti florizina u tkivu korena jabuke, manje od jednog procenta njegovog sadržaja (~0,13%) je bilo eskudovano u hranljivu podlogu. Iako mala, količina eskudovanog florizina je bila slična količini florizina koji je eskudovan iz korena sadnica jabuke gajenih u zemljištu (Hofmann i sar., 2009), što ukazuje da *in vitro* kultura transformisanih korenova jabuke u velikoj meri oponaša metabolizam korenova intaktne biljke, čineći je idealnim sistemom za karakterizaciju i izučavanja funkcije gena

uključenih u metabolizam sekundarnih metabolita ove vrste. S druge strane, poznato je da sadržaj florizina može dosta da varira u zavisnosti od vrste tkiva (Gosch i sar., 2010), sorte (Łata i sar., 2009), razvojnog stadijuma (Zhang i sar., 2007a), trenutka uzorkovanja (Hunter i Hull, 1993; Mikulic-Petkovšek i sar., 2009), kao i delovanja spoljašnjih faktora kao što su patogeni (Mikulic-Petkovšek i sar., 2008). U tom smislu, *in vitro* kultra transformisanih korenova jabuke koja predstavlja stabilan sistem u kome se korenovi gaje pod kontrolisanim i aseptičnim uslovima, omogućava otklanjanje uticaja sredinskih faktora i delovanja zemljišnjih mikroorganizama koji mogu menjati kvantitet i kvalitet izlučenih alelohemikalija (Inderjit, 2005) i pruža mogućnost za olakšano izučavanje alelopatskog potencijala eksudata korenova jabuke.

Poznato je da florizin u tkivima jabuke nastaje procesom glikozilacije svog aglikona floretina uz pomoć enzima 2'-O-glikoziltransferaze (Jugdé i sar., 2008; Gosch i sar., 2010). Međutim, intresantno je da floretin nije pronađen ni u transformisanim ni u netransformisanim korenovima Zlatnog Delišesa gajenim *in vitro*. U istraživanjima Hrazdina (2003) floretin takođe nije detektovan u korenovima *in vitro* gajenih biljaka jabuke sorti Liberty i McIntosh, dok su Mikulić Petkovšek i saradnici (2009) i u listovima 14 ispitivanih sorti jabuke detektovali isključivo florizin. Hemijska analiza sadržaja sekundarnih metabolita korena jabuke sprovedena u okviru ove teze je ukazala da koren jabuke sadrži isključivo glikozilovane forme flavonoida, dok aglikozilovana jedinjenja (floretin, kvercetin i naringenin) nije moguće detektovati ili su prisutna isključivo u tragovima. Moguće je da biljka teži rapidnom prevođenju metabolita neposredno po njihovoj sintezi u stabilne, rastvorljive i hemijski inertne glikozilovane forme i njihovom fizičkom odvajanju od glukozidaza koje ih aktiviraju, skladištenjem u različitim ćelijskim odeljcima (Jones i Vogt, 2001). Ovaj proces omogućava ćeliji kontrolu nad količinom fiziološki aktivnih metabolita i dinamikom odvijanja fizioloških procesa u biljnom organizmu, kao i zaštitu od delovanja endogenih ili egzogenih jedinjenja kao što su neki flavonoidi, fenilpropanoidi, alkaloidi, cijanogeni, glukozinolati itd., koja mogu imati toksično dejstvo na ćeliju (Sirikantaramas i sar., 2008). Poznato je da flavonoidi kao što je kvercetin mogu ispoljiti mutageno dejstvo ili dovesti do fragmentacije proteina koji sadrže

triptofan (Ahmed i sar., 1994; Rueff i sar., 1995), te ih stoga biljka prevodi u glikozilovane forme i aktivno transportuje u vakuole (Klein i sar., 2006).

Prisustvo floretina u tečnoj podlozi, u kojoj su korenovi jabuke bili gajeni, je najverovatnije rezultat aglikozilacije florizina. Poznato je da je florizin podložan degradaciji enzimima zemljišnjih mikroorganizama (Jayasankar i sar., 1969; Chatterjee i Gibbins, 1969; Natsume i sar., 1982). U aseptičnim uslovima *in vitro* kulture, takvo razlaganje je malo verovatno. Međutim, postoji mogućnost da dolazi do deglikozilacije florizina apoplastičnim glikozid hidrolazama (Günl i sar., 2011) ili citosolnim β -glikozilazama (Warzecha i sar., 1999; Czjzek i sar., 2000) koje bivaju oslobođene iz površinskih ćelija korena nakon njegovog oštećenja ili nekroze.

5.4. Efekat eksudata transformisanih korenova linije ZD12 na klijanje, rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana*

S obzirom na poznata dejstva fenolnih kiselina kao alelopatskih supstanci (Blum, 1996; Reigosa i sar., 1999; Li i sar., 2010), kao i potencijalnu ulogu florizina i floretina u razvoju simptoma bolesti poznate kao SARD (Börner, 1959; Nicola i sar., 2017; Yin i sar., 2018), ispitivan je uticaj eksudata korenova jabuke na test-biljku *A. thaliana*, ekotip Columbia. Mapiranje genoma *A. thaliana* (*The Arabidopsis Genome Initiative, 2000*) daje ogromnu prednost arabidopsisu kao test biljci, pružajući široku mogućnost ispitivanja alelopatskih interakcija i povezivanja njihovog dejstva sa morfološkom i fiziološkom stanovišta sa promenama na genskom nivou (Bais i sar., 2003).

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije ukazuju da eksudat korenova jabuke nema inhibitoran efekat na klijanje semena arabidopsisa, nasuprot drugim ispitivanim aleleohemikalijama (Pennacchio i sar., 2005; Reigosa i Pazos-Malvido, 2007). Međutim, njegov efekat na rastenje i razviće klijanaca je bio izuzetno izražen i ogledao se u značajnoj retardaciji rasteanja korena i izdanaka (smanjenje od 35,1 i 62,1%, redom), ali i promenama u njihovom izgledu. Eksudat korenova jabuke je najviše delovao na proces obrazovanja lateralnih primordija, smanjivši broj bočnih korenova za 74% nakon desetog dana tretmana.

Kao što je već pomenuto, analiza sadržaja sekundarnih metabolita u eksudatu transformisanih korenova jabuke je ukazala na nizak, ali veoma uravnotežen sadržaj dihidrohalkona florizina ($8,01 \text{ ng mL}^{-1}$ tj. $0,017 \text{ }\mu\text{M}$) i floretina ($7,49 \text{ ng mL}^{-1}$ tj. $0,027 \text{ }\mu\text{M}$), kao i kafeinske ($14,58 \text{ ng mL}^{-1}$ tj. $0,08 \text{ }\mu\text{M}$) i hlorogene kiseline ($8,82 \text{ ng mL}^{-1}$ tj. $0,025 \text{ }\mu\text{M}$). Brojni literaturni podaci ukazuju na alelopatsko delovanje hlorogene i kafeinske kiseline, bilo samostalno, bilo u okviru biljnih izolata (Patterson, 1981; Garg i Garg, 1989; Reigosa i Pazos-Malvido, 2007; Batish i sar., 2008b). Vodeni ekstrakt cvetova *Delonix regia*, ornamentalnog drveta sa Tajvana, koji sadrži nekoliko fenolnih jedinjenja među kojima hlorogenu i kafeinsku kiselinu, je imao izraženo inhibitorno dejstvo na rastenje klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*), kineskog kupusa (*Brassica chinensis*) i lucerke (*Medicago sativa*) (Chou i Leu, 1992). Kafeinska kiselina kojom su tretirana semena mango pasulja (*Phaseolus aureus*) je imala inhibitoran uticaj na izduživanje korena i izdanka klijanaca i dovela je do smanjenja prirasta njihove mase (Batish i sar., 2008). Kafeinska kiselina je inhibirala klijanje semena *A.thaliana* u opsegu od 1,5% do 100% zavisno od primenjene koncentracije (1-100 mM, redom) (Pennacchio i sar., 2005). S druge strane, hlorogena kiselina, primenjena u koncentracijama od 10 do 1000 μM , nije uticala na stopu klijavosti semena, ali je značajno inhibirala elongaciju korena klijanaca arabidopsisa (Reigosa i Pazos-Malvido, 2007). Vrlo je verovatno da bi alelopatski efekti eksudata korena jabuke bili mnogostruko izraženiji da su semena arabidopsisa isključavana na podlozi bez nutrijenata. Pokazano je da je 21 alelohemikalija, primenjena u fitotoksičnom bioeseju na arabidopsisu, ispoljila drastično intenzivniji efekat u pogledu inhibicije izduživanja korena klijanaca ove test biljke, kada su oni gajeni na podlozi bez nutrijenata, nego u njihovom prisustvu (Reigosa i Pazos-Malvido, 2007). Tako je na primer 96,3 μM hlorogena kiselina dovela do inhibicije dužine korena od 50% (IC_{50}), dok je 10 puta veća koncentracija (1035,3 μM) bila neophodna za dostizanje IC_{50} u prisustvu nutrijenata ($\frac{1}{2}\text{MS}$ soli, B5 vitamina i 1% (w/v) saharoze). Sličan efekat nutrijenata na smanjenje inhibitornog dejstva 2(3H)-benzokzazolinom (BOA) na morfološki parametre, enzimsku aktivnost i fluorescenciju hlorofila bele slačice (*Sinapis alba*) je opisan od strane Belz i Hurle (2004). Prema tome, moglo bi se pretpostaviti da bi alelohemijski efekat jedinjenja koje koren

jabuke izlučuje u rizosferu, u prirodnoj sredini bio modulisan količinom dostupnih nutrijenata i verovatno još izraženiji nego u kulturi *in vitro*.

Iako brojni literaturni podaci potvrđuju alelopatski potencijal hlorogene i kafeinske kiseline, eksudacija florizina, dominantnog jedinjenja prisutnog u eksudatu korenova jabuke, i njegovog aglikona floretina kao potencijalno nove alelohemikalije privlači veliku pažnju, posebno s toga što je njihova potencijalna uloga u razvoju simptoma bolesti SARD već nagoveštena od strane nekoliko autora (Börner, 1959; Nicola i sar., 2017; Yin i sar., 2018).

5.5. Efekat dihidrohalkona florizina i floretina na klijanje, rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana*

Alelopatski efekat biljnih izolata je najčešće posledica sinergističkog delovanja većeg broja jedinjenja prisutnih u relativno niskim koncentracijama (Einhellig i sar., 2004). Međutim, pojedinačna jedinjenja ostvaruju sličan alelopatski efekat kao i biljni izolati samo ukoliko su primenjeni u mnogostruko većim koncentracijama od onih u kojima su zastupljeni u biljnom izolatu. Tako npr. koncentracija hlorogene kiseline (1035,3 μM) koja je dovela do smanjenja dužine korena klijanaca arabidopsisa od 50% u ogledima Reigosa i Pazos-Malvido (2007) je približno 40 000 puta veća od koncentracije hlorogene kiseline detektovane u eksudatu korenova jabuke (0,025 μM) u našem eksperimentu. Takođe, koncentracija kafeinske kiseline (100 μM) koja je rezultovala smanjenjem prirasta korena pasulja od ~ 40% (Batish i sar., 2008) je oko 1000 puta veća od njene koncentracije (0,08 μM) u eksudatu korenova jabuke. Kao posledica navedenog, alelopatski potencijal florizina i floretina u našem slučaju je procenjivan na osnovu efekata koji su tretmani 125, 250 i 500 μM florizinom ili floretinom ostvarili na klijanje i prethodno pomenute morfološke parametre kod klijanaca arabidopsisa, iako su detektovane koncentracije ovih dihidrohalkona u tečnoj hranljivoj podlozi u kojoj su gajeni transformisani korenovi jabuke bile oko 10^4 puta niže (0,017 i 0,027 μM , redom).

Iako su sve testirane koncentracije florizina uzrokovale inhibiciju rastenja i razvića korena klijanaca arabidopsisa, koja se povećavala srazmerno primenjenoj koncentracij ovog

dihirohalkona, samo je koncentracija od 500 μM dovela do statistički značajnog smanjenja dužine korena (21,3%) i broja lateralnih korenova (63,5%). Inhibitorski uticaj ovog tretmana na posmatrane morfološke parametre je bio slabiji u poređenju sa efektom eksudata korenova jabuke, ali su oba tretmana imala izraženiji efekat na razviće lateralnih korenova, nego na izduživanje osnovnog korena klijanaca. Smanjenje dužine izdanaka klijanaca na 250 μM i 500 μM florizinu je bilo znatno manje izraženo. Alelopatski efekat eksudata korenova jabuke u odnosu na čist florizin bi se mogao pripisati sinergističkom dejstvu njegovih komponenti.

Na tretmanu sa 500 μM florizinom zapažena je i veoma karakteristična promena u izgledu korena klijanaca, koji je rastao uvijajući se i formirajući oblik nalik sinusoidi, dok su lateralni korenovi bili veoma retki i male dužine. Lewis i saradnici (2007) su, koristeći mutante za *ABCD19* (*MDR1*) i *ABCD4* (*MDR4*) gene iz ABCB familije transportera za efluks auksina, otkrili da su procesi rasteња i razvića korena arabidopsisa koji su posredovani akropetalnim i bazipetalnim transportom auksina više nezavisini nego preklapajući procesi. Zapravo, oni su nedvosmisleno pokazali da mutacije u alelima *MDR1* gena kod nezavisnih *mdr1-1* i *mdr1-2* mutanta arabidopsisa ekotipa Ws i *mdr1-3* mutanta ekotipa Columbia, dovode do smanjenja akropetalnog transporta auksina od ~80%, dok bazipetalni transport kod takvih mutanata ostaje neizmenjen. Nasuprot, kod *mdr4* mutanta, akropetalni transport nije bio narušen, dok je bazipetalni umanjen ~50%. Mutacija u *MDR1* genu dovodi do pojave sinusoidalnog rasteња korenova na podlozi koja je uspravno orjentisana na podlogu, dok se ta pojava ne zapaža kod *mdr4* mutanata, niti kontrolnih korenova. Ovi rezultati ukazuju da su defekti u akropetalnom transportu auksina od prvenstvenog značaja za ispoljavanje ovog fenomena. Dodatno, gravitropski odgovor kod *mdr1* mutanata je u potpunosti očuvan bez obzira na znatan poremećaj u akropetalnom transportu. To ukazuje da fenomen sinusoidnog rasteња korena nije povezan sa odgovorom biljke na gravitropski stimulus. Praćenje ekspresije gena za GFP protein sa *ProDR5:GFP* auksinskog reportera na preparatima apeksa korenova *mdr1* mutanata je ukazalo na prisustvo veće količine auksina u zoni elongacije korena u odnosu na kontrolu. Ova povećana količina auksina, ukoliko nije simetrično distribuirana, može uzrokovati disbalans

u stopi elongacije ćelija i dovesti do sinusoidnog rasteanja korena (Lewis i sar., 2007). Zaključeno je da je akropetalni transport auksina neophodan za balansiranu stopu elongacije ćelija duž vertikalne ose i da njegovo narušavanje, kao u slučaju *mdr1* mutanta, dovodi do pojave karakterističnog izgleda korena koji nalikuje sinusoidi (Lewis i sar., 2007).

Kao i florizin, i floretin nije imao uticaja na stopu klijavosti semena arabidopsisa, ali je doveo do veoma izražene dozno-zavisne inhibicije rasteanja i razvića korena i izdanaka klijanaca. Negativni efekat floretina na klijanace arabidopsisa je bio dosta izraženiji nego efekat florizina u pogledu svih merenih morfoloških parametara. Veći efekat floretina se ogledao i u izgledu klijanaca, pogotovo izdanaka, koji su na 500 μ M floretinu bili bledozelene-žučkaste boje i sa manjim brojem listova u lisnoj rozeti u poredjenju sa kontrolnim. Može se zapaziti da su efekti eksudata korenova jabuke na klijanace arabidopsisa dosta sličani efektima izazvanim dejstvom floretina, tako da postoji mogućnost da se inhibitorno dejstvo eksudata korena možda i većim delom zasniva na delovanju ovog dihidrohalkona.

Tretman floretinom je doveo i do promena u gravitropskom odgovoru, kako izdanaka, tako i korenova tretiranih klijanaca arabidopsisa. Araniti i saradnici (2016) su zapazili pojavu anizotropnog rasteanja korenova klijanaca arabidopsisa tretiranih isparljivim seskviterpenom farnesenom, koju su doveli u vezu sa uočenim poremećajem nivoa auksina i etilena u korenovima i njihovim efektom na kondenzaciju i dezorganizaciju mikrotubula ćelija korteksa korena. Slično ponašanje je zapaženo i kod klijanaca pšenice tretiranih eksudatom korena *C.murale* (Mitić i sar., 2018), kod kojih se agravitropsko rasteanje objašnjava kao posledica oksidativnih oštećenja izazvanih dejstvom slobodnih kiseoničnih radikala, a koja dovode do dezorganizacije kortikalnih mikrotubula i ultrastukturnih malformacija ćelije. Nepravilna organizacija mikrotubula može narušiti pravilno izduživanje (Morejohn, 1991; Fisher i Cyr, 1998; Hashimoto, 2002) i diferencijaciju ćelija (Green i Selker, 1991), pogotovo u zoni elongacije korena, a samim tim dovesti i do njegove atipične morfologije.

5.6. Analiza ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina, biosintezu auksina i giberelina, transkripcioni faktor WOX7 i kontrolu ćelijskog ciklusa kod klijanaca *A. thaliana* tretiranih eksudatom transformisanih korenova ili floretinom

Uočene morfološke promene, kao što su smanjenje dužine osnovnog korena i broja lateralnih korenova, kod klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom korenova jabuke i floretinom bi se mogle dovesti u vezu sa promenama u endogenom nivou auksina i giberelina, biljnih hormona koji predstavljaju bitne regulatore rasteња i razvića biljaka.

Auksini učestvuju u gotovo svim stadijumima rasteња i razvića biljaka regulišući ćelijsku deobu i elongaciju ćelija, rizogenezu, diferencijaciju sprovodnih elemenata, apikalnu dominaciju, fototropске i gravitropske reakcije, senescenciju itd. (Enders i Strader, 2015). Brojni literaturni podaci naročito ukazuju na ulogu auksina u inicijaciji formiranja lateralnih primordija korenova (Bennett i sar., 1996; Benková i sar., 2003; Santelia i sar., 2005; Swarup i sar., 2008). Ključni aspekt delovanja auksina je zasnovan na diferencijalnoj distribuciji u okviru biljnih tkiva, gde formiraju lokalne maksimume ili gradijente između ćelija (Muday i DeLong, 2001; Friml, 2003; Teale i sar., 2006). Osim procesa lokalne sinteze i oslobađanja aktivnih formi auksina iz neaktivnih konjugata, glavni uzročnik diferencijalne distribucije auksina jeste usmereni transport između ćelija, tzv. polarni auksinski transport (PAT). Osnovni mehanizam koji kontroliše PAT obuhvata procese aktivnog ulaska (influksa) i izlaska (efluksa) iz ćelija, preko nekoliko specifičnih grupa transportera označenih kao AUX1/LAX transporteri i PIN i ABCB (MDR) proteini. Biološki aktivan auksin, indol-3-sirćetna kiselina (IAA) u ćeliju ulazi u svom protonovanom obliku (IAAH), difuzijom ili aktivnim transportom pomoću $2H^+$ -IAA⁻ simportera koji su kodirani *AUX1* i *LAX* genima. IAA se u anjonskom obliku (IAA⁻) transportuje iz ćelije putem PIN i ABCB proteina, koji su uglavnom smešteni na membrani bazalnih ili lateralnih stranica ćelije. Na ovaj način se uspostavlja koncentracijski gradijent auksina duž apikalno-bazalne ose. Ovim putem se auksin iz meristema apeksa izdanka transportuje ka njegovoj morfološkoj bazi (bazipetalno), dok se auksin koji ulazi u koren iz izdanka transportuje ka vrhu korena akropetalnim transportom, gde se najverovatnije kombinuje sa auksinom sintetisanim u apeksu korena, a potom transportuje bazipetalno ka

lateralnim delovima i bazi korena (Swarup i Bennett, 2003). Kod arabidopsisa, AUX1 i LAX3 transporteri za influks su, zajedno sa PIN1, PIN3 i PIN7 transporterima za efluks, odgovorni za akropetalni transport auksina u korenu (Friml i sar., 2002; Blilou i sar., 2005), dok sa bazalno lokalizovanim PIN2 proteinom omogućavaju odvijanje bazipetalnog transporta (Müller i sar., 1998; Abas i sar., 2006).

U ovoj disertaciji je praćena ekspresija gena uključenih u polarni transport auksina (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3* i *PIN7*, *ABCB4*, *ABCB19*, *AUX1* i *LAX3*), gena za biosintezu auksina (*TAA1*, *YUC3*, *YUC4* i *YUC6*) i giberelina (*GA3ox1* i *GA20ox2*), kao i gena za transkripcioni faktor *WOX7*, i to 2, 6 i 12 h od trenutka izlaganja klijanaca arabidopsisa 500 μ M floretinu.

Lewis i saradnici (2011) su zabeležili povišenu ekspresiju gena za auksinske transportere AUX1, PIN3 i PIN7 kod klijanaca arabidopsisa starih šest dana, 6 h od trenutka izlaganja prekursoru etilena - 1-aminociklopropan-1-karboksilnoj kiselini (ACC), kao i značajan porast brzine akropetalnog transporta auksina. Pomenuto jedinjenje je dovelo do smanjenja broja lateralnih korenova (~43%) i ukupne dužine korena 10 dana starih klijanaca tretiranih ACC-om, što je slično rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Kod kontrolnih korenova, koji nisu bili izloženi ACC-u, u oblasti formiranja lateralnih primordija tj. na mestima savijanja korena, bila je primećena smanjena ekspresija *PIN3* i *PIN7* gena, u odnosu na deo korena iznad mesta savijanja. Ovakva diferencijalna ekspresija *PIN* gena je dovela do smanjenog efluksa auksina iz ćelije, što je za posledicu imalo lokalnu akumulaciju auksina i formiranje lokalnog auksinskog maksimuma neophodnog za formiranje lateralnih primordija. Kod korenova tretiranih sa ACC-om, ekspresija *PIN3* i *PIN7* gena je bila povećana duž čitavog korena, što je uticalo na povećanje ukupnog akropetalnog transporta. Zapravo, auksin se transportovao ka apeksu korena, gde se akumulirao, inhibirajući rastenje korena, dok je istovremeno onemogućavao formiranje lokalnih auksinskih maksimuma neophodnih za indukciju lateralnih primordija (Lewis i saradnici, 2011). Povećana ekspresija gena za auksinske transportere (*PIN*, *PIN3*, *PIN7*, *AUX1*, *LAX3*) u korenu petodnevnih klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, koja je kao i u radu Lewis i saradnika (2011) dostizala svoj maksimum nakon 6 h tretmana, bi

mogla ukazati na učešće etilena u inhibiciji izazavanoj floretinom preko povećanja akropetalnog transporta auksina u korenu ili alternativno, na potencijalno sličan mehanizam delovanja floretina i etilena. Ovako povećan akropetalni transport u korenu bi mogao uticati na smanjenje dužine osnovnog korena i broja lateralnih korenova klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, tako što bi izazvao akumulaciju auksina u apeksu korena i inhibiciju formiranja lokalnih auksinskih maksimuma neophodnih za indukciju lateralnih primordija, kao što je prethodno opisano.

Dodatnu potvrdu ovakvoj pretpostavci daju rezultati Yang i saradnika (2014), koji su pokazali da je inhibitorni efekat aluminijuma na rastenje osnovnog korena klijanaca arabidopsisa bio posredovan etilenom, koji je doveo do povećanja sinteze auksina u tranzicionoj zoni apeksa korena usled povećanja ekspresije *TAA1* gena. *TAA1* i *YUC* geni kodiraju enzime koji učestvuju u najznačajnijem putu sinteze IAA kod arabidopsisa, koji se odvija preko indol-3-piruvata (IPA). *TAA1* gen kodira triptofan aminotransferazu (TAA), koja katalizira reakciju deaminacije L-triptofana do IPA, dok *YUC* geni kodiraju monooksigenaze koje sadrže flavin i katalizuju reakciju konverzije IPA do IAA (Zhao, 2012). Povišena ekspresija *TAA1* gena u korenu klijanaca arabidopsisa nakon 6 h tretmana floretinom, ukazuje na moguće učešće etilena u mehanizmu delovanja floretina. Dodatno, rezultati Swarup i saradnika (2007) su ukazali da etilen stimuliše biosintezu auksina u apeksu korena, kao i da je inhibicija rasteња korena izazvana etilenom zavisna od bazipetalnog transporta sintetisanog auksina iz apeksa korena do zone elongacije koji se u velikoj meri bazira na funkciji *AUX1* transportera. Povećanje ekspresije *AUX1* gena u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, a koji prati profil ekspresije *PIN2* gena uključenog u bazipetalni transport auksina, kao i gena koji učestvuju u sintezi auksina (*TAA1*, *YUC3*, *YUC4* i *YUC6*), ide u prilog pretpostavci da je delovanje floretina u pogledu inhibicije rasteња glavnog korena i smanjenje broja lateralnih korenova arabidopsisa bar jednim delom posredovano etilenom.

Istraživanja Lewis i saradnika (2007) su ukazala da je ~80% akropetalnog transporta auksina u korenu arabidopsisa zavisno od ABCB19 (MDR1) transportera, a ~50% bazipetalnog transporta od ABCB4 (MDR4) transportera. Minimalne razlike u

ekspresiji gena za ABCB4 i ABCB19 transportere u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, ukazuju da se inhibicija razvoja i elongacije lateralnih korenova pod dejstvom ovog dihidrohalkona nije odigrala posredstvom ABCB transportera, uprkos njihovoj važnosti za PAT, već prvenstveno preko *AUX*, *LAX* i *PIN* transportera. Nije isključeno da bi minimalni porast nivoa ekspresije *ABCB19* gena u korenu klijanaca koji je zabeležen 6 h od početka tretmana floretinom, mogao dodatno da doprinese povećanju akropetalnog transporta auksina izazvanog povišenom ekspresijom *AUX1*, *LAX3*, *PIN1*, *PIN3* i *PIN7* gena.

GA20ox2 i *GA3ox1* su geni koji kodiraju enzime GA20 oksidazu (GA20-ox) i GA3 oksidazu (GA3-ox), koji katalizuju završne korake u biosintezi bioaktivnih giberelina (GA) u citoplazmi (Reid i sar., 2004). Kod arabidopsisa, GA20-ox kodira familija od 5 gena (Phillips i sar., 1995), a GA3-ox kodira familija od 4 gena (Hedden i Phillips, 2000). Znatno povišena ekspresija *GA20ox2* i *GA3ox1* gena u korenovima klijanaca arabidopsisa, koja je naročito bila izražena 6 h od početka tretmana floretinom, bi mogla da ukaže na povećanje nivoa endogenih giberelina u korenovima tretiranih klijanaca. Gou i saradnici (2010) su ukazali da porast giberelina utiče na inhibiciju ranih koraka u formiranju lateralnih korenova topole (*Populus sp.*). Tako su mutanti topole koji su imali smanjen nivo giberelina, kao i mutanti koji su bili neosetljivi na gibereline, imali povećan broj lateralnih korenova, dok su transformisane biljke kod kojih je dolazilo do prekomerne produkcije giberelina GA₁ i GA₄ u korenovima, produkovale smanjen broj lateralnih korenova (Gou i sar., 2010). Postoji mogućnost da bi povišena ekspresija *GA20ox2* i *GA3ox1* gena mogla da značajno doprinese smanjenju broja lateralnih korenova kod klijanaca arabidopsisa izloženih dejstvu floretina.

Postoje i indikacije koje ukazuju na interakciju giberelina i auksina u procesima regulacije formiranja lateralnih korenova kod topole. One se baziraju na pojavi sniženog nivoa ekspresije homologa *PIN3* gena arabidopsisa, kod oba tipa, giberelin-deficijentnih i giberelin-neosetljivih mutanata topole (Gou i sar., 2010). Moguće je da je povišena ekspresija *PIN3* gena u korenovima arabidopsisa tretiranih floretinom u korelaciji sa

povišenom ekspresijom *GA20ox2* i *GA3ox1* gena i mogućom povećanom sintezom giberelina u korenovima.

Smanjen broj lateralnih korenova klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom može da se dovede u vezu i sa značajnim povećanjem ekspresije gena za transkripcioni faktor *WOX7* u tkivu korena klijanaca. Gen *WOX7* se eksprimira u svim fazama razvića lateralnih korenova, a pogotovo je važan pri formiranju lateralnih primordija (Kong i sar., 2016). *Wox7* mutanti arabidopsisa, koji su imali značajno sniženu ekspresiju *WOX7* gena, razvili su veći broj lateralnih korenova nego divlji tip *wt* (eng. *wild type*), dok suprotno, *35S:WOX7-GFP* linije sa povećanom ekspresijom *WOX7* gena su se karakterisale značajnim smanjenjem broja lateralnih korenova (Kong i sar., 2016). Smatra se da se inhibicija razvoja lateralnih korenova ne odigrava posredstvom modulacije auksinskog transporta ili homeostaze auksina od strane *WOX7* transkripcionog faktora. Naprotiv, utvrđeno je da *WOX7* deluje nizvodno na putu signalne transdukcije auksina (Kong i sar., 2016). Moguće je da bi potencijalno povećanje polarnog transporta auksina usled povećane ekspresije *AUX1*, *LAX3* i *PIN* gena u korenu klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom moglo da dovede do gubitka lokalnih auksinskih maksimuma u oblasti začetaka lateralnih primordija, kao što je to nagovešteno u radu Lewis i saradnika (2011) i posledično do povećanja ekspresije *WOX7* gena (Kong i sar., 2016) na mestima formiranja lateralnih primordija i inhibicije procesa njihovog formiranja.

Narušavanje gravitropskog odgovora se najčešće povezuje sa poremećajima u polarnom transportu auksina (Müller i sar., 1998; Rashotte i sar., 2000; Friml i sar., 2002; Lewis i sar., 2007). S obzirom na zavisnost gravitropskog odgovora korena od bazipetalnog transporta auksina (Rashotte i sar., 2000; Lewis i sar., 2007) i uloge *PIN2* transportera u odigravanju bazipetalnog transporta (Müller i sar., 1998), porast ekspresije *PIN2* gena u korenu klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom bi se mogao povezati sa potencijalnim povećanjem bazipetalnog transporta auksina u korenu i remećenjem njegovog gravitropskog odgovora. Slično, alkaloid narciklasin, koji je izolovan iz lukovica *Narcissus tazetta* je doveo do agravitropskog rastevanja korena i povećanja ekspresije *PIN2* gena i nivoa

bazipetalnog transporta i distribucije auksina u korenu klijanaca arabidopsisa (Na i sar., 2011).

Promene u ekspresiji ispitivanih gena u izdancima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom su uglavnom bile manje izražene nego što je to bio slučaj u korenovima. Manje promene ekspresije *PIN* gena, koje su se uglavnom odlikovale blagim sniženjem ekspresije u svim vremenskim tačkama, bi se potencijalno mogle povezati sa neobičnim rastom izdanaka mladih klijanaca arabidopsisa gajenih na floretinu, a koji je verovatno posledica gubitka pravilnog gravitropskog odgovora (Gälweiler i sar., 1998; Friml i sar., 2002; Rakusová i sar., 2016). Smanjene ekspresije *TAA1*, *YUC3* i *YUC6* gena u izdancima, nakon 6 i 12 h od početka tretmana floretinom, bi mogle imati za posledicu smanjenje sinteze auksina i remećenje auksinske homestaze što bi moglo dovesti do gubitka normalnog gravitropskog odgovora izdanaka.

Za razliku od korena, gde se javlja višestruko povećanje ekspresije *GA20ox2* i *GA3ox1* gena, u izdancima arabidopsisa tretiranih floretinom je njihova promena bila zanemarljiva. Sniženje ekspresije zabeleženo 12 h od početka tretmana floretinom može ukazati na blagi pad u sintezi giberelina i shodno tome njegovom doprinosu ukupnoj inhibiciji izduživanja tretiranih izdanaka arabidopsisa.

Tretmani floretinom i eksudatom korenova jabuke su kod nekih od ispitivanih gena, kao što su *PIN1*, *PIN3*, *AUX1*, *YUC3*, *GA20ox2*, doveli do veoma sličnih promena ekspresije u korenovima klijanaca arabidopsisa, dok su se kod ostalih gena vremenski profili promene ekspresije veoma razlikovali između ova dva tretmana. Isti trend promene koji je bio najviše izražen kod gena uključenih u polarni transport auksina i sintezu giberelina bi mogao da ukaže da bi floretin, koji je sadržan u eksudatu korenova jabuke, mogao biti odgovoran za promene ekspresije gorepomenutih gena u korenovima klijanaca tretiranih datim eksudatom. Razlike u ekspresionim profilima ispitivanih gena u izdancima klijanaca koji su dobijeni u tretmanima floretinom i eksudatom korenova jabuke, su bile izraženije nego u korenovima i samo kod *ABCB4*, *TAA1* i *WOX7* gena se mogao uočiti isti trend promene ekspresije. Možda bi se moglo zaključiti da je uticaj floretina prisutnog u

eksudatu korenova jabuke na ekspresiju gena u izdancima arabidopsisa bio dosta slabiji nego u korenovima i snažnije modulisan drugim alelohemikalijama eksudata.

5.7. Ekspresija gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa kod klijanaca *A.thaliana* tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke i floretinom

Razviće biljaka, u poređenju sa životinjama, u većoj meri zavisi od uslova sredine u kojoj žive, pa su samim tim biljke kroz evoluciju razvile znatno složenije mehanizme regulacije ćelijskog ciklusa, prvenstveno zasnovane na stimulusima iz spoljašnje sredine. Genom arabidopsisa sadrži set regulatornih gena, koji je izuzetno veliki (71 gen) u poređenju sa drugim eukariotima, uključujući i čoveka kod koga su identifikovana 23 takva gena (Menges i sar., 2005). Međutim, sam mehanizam ćelijske deobe je evolutivno očuvan kod eukariotskih organizama. Centralnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa imaju kinaze zavisne od ciklina (CDK) (De Veylder i sar., 2007; Berckmans i De Veylder 2009). One pripadaju familiji serinskih/treoninskih protein kinaza, čija je specifičnost prema supstratu određena vezivanjem za odgovarajući ciklin (CYC), a aktivnost regulisana od strane serije različitih CDK aktivatora i inhibitora (Inzé i De Veylder, 2006). Specifični kompleksi ciklina i kinaza zavisnih od ciklina kontrolišu prolazak ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa na različitim kontrolnim tačkama. Istraživanja ukazuju da su alelohemikalije jedan od faktora koji može uticati na različite aspekte kontrole ćelijskog ciklusa kod biljaka (Nishida i sar., 2005; Sanchez-Moreiras i sar., 2008; Zhang i sar., 2010; Soltys i sar., 2011; Dmitrović i sar., 2015).

U ovoj disertaciji praćena je ekspresija gena za CDKA1;1 i CDKB2;1 kinaze zavisne od ciklina i CYCA3;1 i CYCB2;4 cikline u izdancima i korenovima klijanaca arabidopsisa starim pet dana, i to 2, 6 i 12 h od početka tretmana floretinom ili eksudata korenova jabuke, kao i nakon 10 dana kontinuiranog gajenja klijanaca na podlozi koja je sadržala pomenute alelohemikalije. Poznato je da se CDKA1;1 kinaza kontinuirano eksprimira tokom ćelijskog ciklusa i učestvuje u regulaciji ulaska u ćelijski ciklus, kao i prolazak ćelije kroz G1→S i G2→M kontrolne tačke (Vandepoele i sar., 2002; Van Leene i sar., 2010). Kinaze zavisne od ciklina klase B2 (CDKB2) su uključene u regulaciju ulaska

ćelije u mitotičku deobu, sudelujući u kontroli G2→M kontrolne tačke ćelijskog ciklusa. Ciklin CYCA3;1 ima najvišu ekspresiju tokom S faze, dok se CYCB2;4 akumulira tokom G2→M tranzicije (Menges i sar., 2005; Van Leene i sar., 2010).

Dobijeni rezultati ukazuju da je ekspresija *CDKA1;1* i *CYCA3;1* gena u korenovima klijanaca arabidopsisa nakon tretmana floretinom bila povećana u svim ispitivanim vremenskim tačkama, sa maksimumom nakon 6 h dugog tretmana, dok je u slučaju tretmana eksudatima korena promena ekspresije oba gena imala identični trend koji se karakterisao padom nakon 2 h, porastom nakon 6 h i ponovnim padom nakon 12 h od primene tretmana. Sličnost vremenskih profila promene ekspresije pomenutih gena arabidopsisa tokom tretmana floretinom ili eksudatom korenova jabuke, ukazuje da bi CDKA1;1 kinaza i ciklin CYCA3;1 mogli imati identičan odgovor na stimulus specifičnim alelohemikalijama, formirajući aktivan kompleks koji učestvuje u S fazi ćelijskog ciklusa. Opsežni eksperimenti van Leene i saradnika (2010) ukazuju upravo da CDKA;1 kinaza interaguje isključivo sa ciklinima tipa D (CYCD) i specifičnim S-faznim ciklinima tipa A, kao što je CYCA3;1. Kao što je pomenuto, kinaza zavisna od ciklina CDKB2;1 i ciklin CYCB2;4 su uključeni u regulaciju G2→M kontrolne tačke ćelijskog ciklusa (Fobert i sar., 1996; Magyar i sar., 1997; Umeda i sar., 1999). Istraživanja Lee i saradnika (2003) pokazala su da se CDKB2;1 kinaza izolovana iz pirinča vezuje za B2 tip ciklina (CYCB2;1 i CYCB2;2), ali ne i za CYCA1;1, što ukazuje na specifičnost interakcije CDKB2;1 i CYCB ciklina. Dodatno, proteinski kompleksi CDKB2;1/CYCB2;1 i CDKB2;1/CYCB2;2 su ispoljavali enzimsku aktivnost, što je ukazivalo na funkcionalnost kompleksa i zavisnost kinazne aktivnosti CDKB2;1 od interakcije sa specifičnim CYCB ciklinima (Lee i sar., 2003). Rezultati q-PCR analize ukazuju na to da postoji identičan profil promena ekspresije *CDKB2;1* i *CYCB2;4* gena u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom i donekle sličan profil u slučaju tretmana eksudatom korena jabuke. Prema tome, može se pretpostaviti da u korenovima arabidopsisa dolazi do formiranja specifičnog kompleksa između CDKB2;1 kinaze i CYCB2;4 ciklina koji učestvuje u regulaciji G2→M kontrolne tačke ćelijskog ciklusa.

Interesantno je da su vremenski profili promene ekspresije svih ispitivanih gena ćelijskog ciklusa (*CDKAI;1*, *CYCA3;1*, *CDKB2;1* i *CYCB2;4*) u korenovima bili veoma slični u okviru određenog tretmana (florelin ili eksudat korenova jabuke), ali su se njihovi profili razlikovali između tretmana. To ukazuje da je trend promene ekspresije ispitivanih gena u korenovima bio isti pod dejstvom specifičnog stimulusa i da je on karakterističan za taj stimulus. Očigledno je da florelin i eksudati korenova jabuke ispoljavaju različito dejstvo na ekspresiju gena ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa. Tako su, proučavajući uzroke autotoksičnosti vodenog ekstrakta korenova krastavca i hidrofobnih eksudata korena na elongaciju radikule klijanaca krastavca, Zhang i saradnici (2010) utvrdili da oba tretmana dovode do značajnog utišavanja *CYCA*, *CYCB* i *CDKB* gena, ali je samo primena eksudata korena imala efekat i na gene *CDKA* i *CYCD3;1*. Za razliku od florelina, trenutno povećanje ekspresije *CDKAI;1*, *CYCA3;1*, *CDKB2;1* gena u korenu klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom korenova jabuke, koje se javilo nakon 6 h od početka tretmana, je dalje brzo opadalo ispod kontrolnog nivoa, a zatim se postepeno vraćalo na nivo blizak kontrolnom, nakon 10 dana gajenja klijanaca arabidopsisa u prisustvu alelohemikalija. Možemo pretpostaviti da je smanjena ekspresija ovih gena ćelijskog ciklusa, nakon kratkotrajnog skoka, uslovlila usporenu replikaciju ili ulazak ćelije u mitozu na drugom (G2→M) kontrolnom mestu ćelijskog ciklusa i mogućnost ćeliji da uđu u deobu. Drugi autori su takođe pokazali vezu između usporenog rastenja izazvanog alelohemikalijama, naročito inhibicije izduživanja radikule ili korena, sa narušavanjem ćelijskog ciklusa. Tako je isparljivi monotrepen iz *Salvia leucophylla* inhibirao klijanje i rastenje korena *Brassica campestris*, snižavajući mitotički indeks i inhibirajući sintezu DNK u apikalnom meristemu korena (Nishida i sar., 2005), a cinamid iz maljave graorice (*Vicia villosa* Roth.) uzrokovao retardaciju rastenja korena *Allium cepa*, izazivajući izražene poremećaje u ćelijskoj deobi, modifikujući organizaciju citoskeleta i inhibirajući proliferaciju meristemskih ćelija (Soltys i sar., 2011).

Interesantno je da je trend promene ekspresije ispitivanih gena ćelijskog ciklusa u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih florelinom bio veoma sličan trendu koji je zabeležen kod gena uključenih u polarni transport auksina (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN7*, *AUX1*

i *LAX3*), biosintezu auksina (*YUC4* i *YUC6*) i giberelina (*GA3ox1* i *GA20ox2*), kao i gena za transkripcijski faktor (*WOX7*). Sa druge strane, trend promene ekspresije gena ćelijskog ciklusa u korenu klijanaca tretiranih eksudatom korenova jabuke je bio veoma sličan onom koji odlikuje ekspresiju *LAX3*, *YUC3*, *YUC4*, *YUC6*, *GA3ox1* i *WOX7* gena kod klijanaca na istom tretmanu. Očigledno je da tretmani floretinom ili eksudatom korenova jabuke, istovremeno izazivaju promene u ekspresiji gena pomenutih grupa, tako da nije moguće sa sigurnošću tvrditi da promene u nivou endogenih giberelina i auksina ili njihovom fluksu u korenu utiču na ekspresiju gena ćelijskog ciklusa. Svakako, u literaturi su poznati primeri auksinskog i giberelinskog delovanja na aktivnost gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa (Sauter i Kende, 1992; Sauter i sar., 1995; Stals i Inzé, 2001; Achard i sar., 2009). Casimiro i saradnici (2001) su ukazali da je regulacija ćelijskog ciklusa u ksilemskim ćelijama pericikla, koje predstavljaju mesto inicijacije lateralnih primordija korena arabidopsisa, posredovana auksinima, kao i da inhibitori auksinskog transporta efektivno blokiraju prve ćelijske deobe uključene u inicijaciju lateralnih korenova. Takođe je utvrđeno da auksini promovišu formiranje lateralnih primordija inicijacijom ćelijskih deoba preko G1→S kontrolne tačke, stimulacijom ekspresije *CYCB1;1* gena. Količina i pravac auksinskog toka u korenovima determinišu učestalost i poziciju inicijacije lateralnih primordija (Himanen i sar., 2002). Roudier i saradnici (2003) su ukazali da je ekspresija gena za ciklin *CYCA2;2* bila stimulirana auksinom tokom inicijacije i elongacije lateralnih primordija kod *Medicago sativa*. Giberelini regulišu ekspresiju *CDC2Os-3* i *CYCA1* gene pirinča čiji se transkripti akumuliraju u G2 fazi ćelijskog ciklusa, a čiji produkti formiraju aktivan kompleks koji najverovatnije reguliše G2→M progresiju (Fabian i sar., 2000).

Nivo ekspresije svih ispitivanih gena ćelijskog ciklusa u korenovima klijanaca arabidopsisa se vratio na nivo blizak netretiranoj kontroli nakon deset dana tretmana floretinom ili eksudatom korenova jabuke, što ukazuje da se njihovom produženom primenom ćelije korena navikavaju na delovanje ovih stimulusa, ne menjajući ekspresiju pomenutih gena.

Za razliku od korenova, profil promena u ekspresiji *CDKA1;1* i *CYCA3;1* gena u izdancima klijanaca arabidopsisa je bio identičan kod oba tretmana, floretina i eksudata

korenova jabuke. *CDKA1;1* gen je karakteriso blagi porast ekspresije, dok je kod *CYCA3;1* gena bio zabeležen pad. Moguće je da kinaza *CDKA1;1* i ciklin *CYCA3;1* ne formiraju aktivan kompleks u izdancima s obzirom na izuzetno složenu mrežu interakcija *CDKA1;1* kinaze sa velikim brojem drugih ciklina klase A i D tokom čitavog ćelijskog ciklusa (van Leene i sar., 2010; Komaki i Sugimoto., 2012). Ekspresioni profili *CDKB2;1* i *CYCB2;4* gena u izdancima tretiranih floretinom su identični, dok se kod tretmana eksudatom korena jabuke razlikuju međusobno, kao i od profila dobijenih kod tretmana floretinom. To iznova ukazuje na razlike u mehanizmu delovanja ovih tretmana u pogledu regulacije gena ćelijskog ciklusa.

Generalno se može zaključiti da je ekspresija gena ćelijskog ciklusa u izdancima arabidopsisa u prvih 12 h od izlaganja klijanaca dejstvu testiranih alelohemikalija dosta promenljiva. Međutim, produženo dejstvo tretmanom eksudata dovodi do sniženja ekspresije svih analiziranih gena ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu, što bi moglo doprineti izraženijem inhibitornom efektu eksudata korenova jabuke na rastenje izdanka klijanaca (62,1%) u odnosu na tretman 500 μ M floretinom (48,2%). Na osnovu dobijenih rezultata, kao i znanja o izuzetnoj kompleksnosti procesa regulacije ćelijskog ciklusa, praćenje ekspresije gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa bi se moralo proširiti, kako na druge gene za cikline i kinaze zavisne od ciklina, tako i na druge klase proteina uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa kao što su CDK-inhibitorni proteini (ICK; eng. *Kip-Related Proteins* (KRP) i *Siamese* (SIM)/*Siamese-Related* (SMR)) i CDK-aktivirajuće kinaze (eng. *CDK Activating Kinases* - CAKs) (Inzé i De Veylder, 2006; De Veylder i sar., 2007).

5.8. Uticaj floretina na ultrastrukturu ćelija mezofila listova klijanaca *A. thaliana*

Ultrastruktorna analiza ćelija mezofila listova klijanaca *A. thaliana* tretiranih floretinom su ukazala na promene koje su se pre svega ogledale u morfologiji ćelijskog zida, ali i u strukturi i položaju hloroplasta u ćeliji.

Već nakon trećeg dana tretmana floretinom primećena je blaga izuvijanost ćelijskog zida koja se povećavala rezultujući desetog dana formiranjem izraženih ulegnuća i ispuščenja. Slične promene u izgledu ćelijskog zida su primećene kod ćelija korena i listova klijanaca pšenice nakon tretmana eksudatom korena *C. murale* (Mitić i sar., 2018), kao i kod ćelija korena pšenice izloženih dejstvu olova (Kaur i sar., 2013). Moguće je da izvesne alelohemikalije ili drugi stresni činioci mogu da modifikuju celuloznu i hemi-celuloznu mrežu degradacijom određenih komponenti ćelijskog zida. Ovako izmenjena struktura ćelijskog zida može da dovede do gubitka njegove čvrstine i pojave izuvijanosti (Chanliaud i sar., 2002).

Značajne promene u strukturi hloroplasta ćelija mezofila su primećene kod klijanaca arabidopsisa nakon 10 dana izloženosti dejstvu floretina. Hloroplasti zadobijaju okrugao oblik i izmeštaju se ka unutrašnjosti ćelije i grupišu, dok tilakoidi grana i tilakoidi strome od pravilne linearne, zadobijaju kružnu formu i gube pravilnu orijentaciju. Poznato je da se promene u organizaciji tilakoida mogu javiti kao posledica delovanja toplotnog stresa (Gounaris i sar., 1984; Semenova, 2004), prisustva teških metala (Angelov i sar., 1993), salicilne kiseline (Uzunova i Popova, 2000) ili egzogenog tretmana regulatorima rasteња (Wilhelmová i Kutik, 1995; Popova i Uzunova, 1996). Pošto je očigledno da različiti stresni faktori mogu uticati na strukturu hloroplasta i poremetiti njihovu funkciju, nije iznenađujuće i da neke alelohemikalije mogu imati slično dejstvo. Tako je npr. ekstrakt kore biljke mačija kandža (*Urtica tomentosa*) doveo do strukturnih promena na hloroplastima tretiranih listova *Capsicum anum* (Tykarska i sar., 2003), dok je sekalonična kiselina, koju proizvodi *Aspergillus japonicas*, narušila strukturnu organizaciju hloroplasta pirinča (Zeng i sar., 2001). Poznato je da alelohemikalije mogu da naruše proces fotosinteze delujući na tri glavne faze fotosintetičkog procesa: snabdevanje ugljen-dioksidom na nivou stoma, elektron-transport u tilakoidima i redukcioni ciklus ugljenika (Zhou i Yu, 2006) ili razgradnjom hlorofila (Ervin i Wetzel, 2000; Oyerinde i sar., 2009). Najbolje okarakterisan fitotoksični mehanizam indukovani alelohemikalijama jeste inhibicija fotosinteze preko interakcija njegovih komponenti sa fotosistemom II (PSII) (Einhellig i sar., 1993; Einhellig, 1995; Rimando i sar., 1998). Sorgoleon, lipofilni benzikvinon izolovan iz eksudata korena

Sorgum bicolor, je dobro proučen inhibitor PSII (Nimbal i sar., 1996; Gonzales i sar., 1997; Czarnota i sar., 2001) koji specifično inhibira elektron-transportni lanac u hloroplastima, delujući slično triazinskim herbicidima kao što je atrazin (Nimbal i sar., 1996). Nekoliko jedinjenja srodnih sorgoleonu, kao i drugi fitotoksini izolovani iz akvatičnih biljaka, ispoljavali su slične efekte na PSII (Srivastava i sar., 1998; Keating, 1999; Leu i sar., 2002).

Intaktnost strukture i membrane mitohondrija u ćelijama listova arabidopsisa izloženim floretinu ukazuje na njegovo selektivno dejstvo, koje je prvenstveno usmereno na hloroplaste i proces fotosinteze. Moglo bi se pretpostaviti da se narušena struktura hloroplasta ćelija mezofila odrazila i na njihovu funkciju, što je nagovešteno smanjenjem rezervi skroba u hloroplastima nakon desetog dana izlaganja floretinu, kao i potpunim odsustvom skrobnih granula i granula sa nutrijentima u citoplazmi takvih ćelija. Smanjen broj skrobnih granula u citoplazmi je primećen već nakon trećeg dana primene floretina, što bi moglo da ukaže na smanjenje funkcije hloroplasta koje je verovatno nastupilo veoma rano i prethodilo kasnijim, vidljivim promenama u obliku i organizaciji tilakoida. Moguće je da ćelija nije bila u mogućnosti da nadomesti utrošene rezerve skroba i drugih nutrijenata usled narušene strukture i funkcije hloroplasta, ali da je preživela zahvaljujući heterotrofnim procesima koji su se odvijajali na račun saharoze i mineralnih soli prisutnih u podlozi na kojoj su klijanci uzgajani. Ova pretpostavka može biti potkrepljena rezultatima Gleason-a (1990) da cijanobakterin, prirodni produkt modrozeline alge *Scytonema hofmanni*, može da inhibira elektronski transport u fotosistemu II i selektivno naruši tilakoidni sistem membrana hloroplasta, ne uzrokujući oštećenja na drugim membranama u ćeliji i ne narušavajući njen heterotrofni rast.

Narušena strukturna organizacija ćelije, prvenstveno ćelijskog zida i hloroplasta, se direktno odražava na njeno funkcionisanje, a može biti povezana sa disbalansom u sintezi i transportu auksina i giberelina kao ključnih regulatora esencijalnih procesa u biljnom organizmu. Narušavanje bilo koje komponente složenog sistema interakcija, neizostavno rezultuje promenama koje se odražavaju na nivou morfologije kao najviše instance.

Izraženo fitotoksično dejstvo floretina, objedinjeno sa florizinom, hlorogenom i kafeinskom kiselinom u eksudatu korena jabuke, svrstava ga u grupu značajnih alelohemikalija i otvara vrata daljim istraživanjima u cilju saznanja molekularnih i fizioloških mehanizma njegovog dejstva. Dalja istraživanja bi mogla doprineti rasvetljavanju uloge florizina i floretina u razvoju simptoma bolesti SARD jabuke, ali i utrti put primeni ovih dihidrohalkona kao novih ekološko-bezbednih herbicida u skladu sa sve većim svetskim potrebama za organskom proizvodnjom.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja realizovanih u ovoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ Razvijen je pouzdan i efikasan protokol za regeneraciju izdanaka jabuke iz odsečaka listova sorti Melrouz i Zlatni Delišes putem *de novo* organogeneze. Tronedeljni predtretman eksplantata u mraku i gajenje na hranljivoj podlozi koja pored auksina sadrži i visoku koncentraciju TDZ-a su ključni faktori za efikasnu regeneraciju izdanaka.
- ❖ Uključivanje β -laktamskog antibiotika cefotaksima u podlogu za regeneraciju doprinosi povećanju regenerativnog odgovora sorte Zlatni Delišes, dok s druge strane antibiotik meropenem favorizuje rastenje i razviće izdanaka.
- ❖ Uspostavljeni su efikasni protokoli za indukciju transformisanih korenova pomoću *Agrobacterium rhizogenes* 15834 kod sorti jabuka Melrouz, Zlatni Delišes, Čadel i Gloster.
- ❖ Permanentna *in vitro* kultura izolovanih transformisanih korenova jabuke je uspešno uspostavljena po prvi put smenom hranljivih podloga sa i bez auksina.
- ❖ Sve linije transformisanih korenova eksprimiraju *rol* gene, dok je ekspresija *aux* gena sporadična. Ne postoji korelacija između ekspresije *aux* gena i morfoloških karakteristika, kao i stope rasteња pojedinačnih linija.
- ❖ Genetička transformacija ne dovodi do promena u sadržaju glavnih sekundarnih metabolita jabuke, glikozilovanih flavonoida i fenolnih kiselina. Prema tome, kultura transformisanih korenova se može koristiti kao pogodan model sistem za izučavanje alelopatskog potencijala jabuke.
- ❖ Florizin je detektovan, kako u samim transformisanim korenovima kao dominantan sekundarni metabolit, tako i u njihovom eksudatu. Floretin je zastupljen samo u eksudatu transformisanih korenova.

- ❖ Eksudat transformisanih korenova jabuke, kao i čiste substance florizin i floretin, ne utiču na klijanje semena, ali deluju inhibitory na rastenje i razviće korenova i izdanaka klijanaca *Arabidopsis thaliana*.
- ❖ Tretman floretinom utiče na gubitak normalnog gravitropskog odgovora klijanaca arabidopsisa, dok tretman florizinom izaziva pojavu specifičnog sinusoidnog oblika korena.
- ❖ Veoma sličan obrazac promene ekspresije gena uključenih u polarni transport auksina (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN7*, *AUX1*, *LAX3*), biosintezu auksina (*YUC4* i *YUC6*), biosintezu giberelina (*GA3ox1* i *GA20ox2*), i gena za transkripcioni faktor *WOX7* u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih floretinom, ukazuje na mogućnost da se alelopatski efekat floretina zasniva na promenama nivoa auksina i giberelina, kao i interakciji ove dve grupe hormona.
- ❖ Sličnost u promenama nivoa ekspresije većine analiziranih gena uključenih u polarni transport auksina (*PIN1*, *PIN3* i *AUX1*), kao i gena uključenih u sintezu auksina (*YUC3*) i giberelina (*GA20ox2*) u korenovima klijanaca arabidopsisa tretiranih eksudatom transformisanih korenova jabuke sa onim koje su izazvane tretmanom floretinom, ukazuje da bi floretin iz eksudata mogao biti odgovoran za alelopatsko delovanje korenova jabuke.
- ❖ Alelopatski efekat floretina se odražava i na strukturu ćelija mezofila listova klijanaca arabidopsisa, izazivajući značajne ultrastrukturne promene, pre svega na ćelijskom zidu i hloroplastima.
- ❖ Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju polaznu osnovu za dalja izučavanja mehanizama alelopatskog dejstva sekundarnih metabolita jabuke, floretina i florizina, koja bi mogla doprineti rasvetljavanju njihove potencijalne uloge u razvoju simptoma bolesti SARD, ali i razmatranju njihove moguće primene kao novih ekološko-bezbednih herbicida.



7. LITERATURA



Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology* 8: 249-256.

Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111: 9-17.

Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster G, Genschik P (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Current Biology* 19: 1188-1193.

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 196: 67-76.

Ahmed MS, Ainley K, Parish JH, Hadi SM (1994) Free radical induced fragmentation of proteins by quercetin. *Carcinogenesis* 15: 1627-1630.

Alpizar E, Dechamp E, Lapeyre-Montes F, Guilhaumon C, Bertrand B, Jourdan C, Lashermes P, Etienne H (2008) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Annals of Botany* 101: 929-940.

Alvardo F, Crane R (1962) Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* 56: 170-172.

Anaya AL, Pelayo-Benavides HR (1997) Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae): Effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy Journal* 4: 57-68.

Angelov M, Tsonev T, Dobrinova K, Velikova V, Stoynaova T (1993) Changes in some photosynthetic parameters in pea plants after treatment with cobalt. *Photosynthetica* 28: 289-289.

Antonelli M, Druart P (1990) The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens*. *Acta Horticulturae* 280: 45-50.

Aoki S, Kawaoka A, Sekine M, Ichikawa T, Fujita T, Shinmyo A, Syono K (1994) Sequence of the cellular T-DNA in the untransformed genome of *Nicotiana glauca* that is homologous to ORFs 13 and 14 of the Ri plasmid and analysis of its expression in genetic tumors of *N. glauca* x *N. langsdorffii*. *Molecular and General Genetics* 243: 706-710.

Araniti F, Graña E, Krasuska U, Bogatek R, Reigosa MJ, Abenavoli MR, Sánchez-Moreiras AM (2016) Loss of gravitropism in farnesene-treated arabidopsis is due to microtubule malformations related to hormonal and ROS unbalance. *PloS one* 11, e0160202.

Auf'mkolk M, Koehle J, Hesch RD, Ingbar SH, Cody V (1896) Crystal structure of phlorizin and the iodothyronine deiodinase inhibitory activity of phloretin analogues. *Biochemical Pharmacology* 35: 2221-2227.

Avadhani PN, Towers GHN (1961) Fate of phenylalanine-C14 and cinnamic acid C14 in *Malus* in relation to phloridzin synthesis. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 39: 1605-1616.

Awad MA, de Jager A, van Westing LM (2000) Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae* 83: 249-263.

Bai R, Zhao X, Ma F, Li C (2009a) Identification and bioassay of allelopathic substances from the root exudates of *Malus prunifolia*. *Allelopathy Journal* 23: 477-484.

Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.

Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191-203.

Baleroni CRS, Ferrarese MLL, Souza NE, Ferrarese-Filho O (2000) Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biologia Plantarum* 43: 313-316.

Barbieri C, Morini S (1987) *In vitro* regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. *Advances in Horticultural Science* 1: 8-10.

Batish DR, Kaur S, Singh HP, Kohli RK (2008a) Role of root-mediated interactions in phytotoxic interference of *Ageratum conyzoides* with rice (*Oryza sativa*). *Flora* 204: 388-395.

Batish DR, Singh HP, Kaur S, Kohli RK, Yadav SS (2008b) Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology* 165: 297-305.

Batra J, Dutta A, Singh D, Kumar S, Sen J (2004) Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. *Plant Cell Reports*, 23: 148-154.

Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue specific and auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants. *Plant Cell* 11: 323-333.

Belaizi M, Paul H, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1991) Direct organogenesis from internodal segments of *in vitro* grown shoots of apple cv. Golden Delicious. *Plant Cell Reports* 9: 471-474.

Bell, AC (2004) Host plant resistance to fire blight (*Erwinia amylovora*) in the Rosaceae subfamily Maloideae. North Carolina State University.

Belz RG, Hurle K (2004) A novel laboratory screening bioassay for crop seedling allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 30: 175-198.

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens, G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Shulz B, Feldmann KA (1996) Arabidopsis *AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.

Berckmans B, De Veylder L (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 599-605.

Bernat W, Gawronska H, Gawronski SW (2004) Physiological effects of allelopathic activity of sunflower on mustard. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 496: 275-287.

Bertin C, Yang X, Weston LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67-83.

Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. New York. Springer.

Bido GDS, Ferrarese MDLL, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O (2010) Naringenin inhibits the growth and stimulates the lignification of soybean root. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 533-542.

Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme, K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39-44.

Blum U (1996) Allelopathic interactions involving phenolic acids. *Journal of Nematology* 28: 259-267.

Bogatek R, Zakrzewska W, Vinel D, Sliwinska E, Gawronska H, Come D (2002) Effects of sun flower allelopathics on membrane integrity and energy status of mustard seeds during germination. In: Fuji Y, Hiradate S, Araya H (eds.) *Abstracts of Third Congress on Allelopathy*, Tsukuba, Japan pp. 157.

Bogdanović MD, Todorović SI, Banjanac T, Dragičević MB, Verstappen FW, Bouwmeester HJ, Simonović AD (2014) Production of guaianolides in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed chicory regenerants flowering *in vitro*. *Industrial Crops and Products* 60: 52-59.

Bolar JP, Norelli JL, Aldwinckle HS (1998) An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. *HortScience* 33: 1251-1252.

Bommineni VR, Mathews H, Samuel SB, Kramer M, Wagner DR (2001) A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. *HortScience* 36: 1102-1106.

Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux MA (2000) Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *Journal of Natural Products* 63: 1249-1252.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Van Dillen PW, Van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503.

Börner H (1959) The apple replant problem. I. The excretion of phlorizin from apple root residues. *Contributions Boyce from Thompson Institute* 20: 39-56.

Bosela MJ (2009) Effects of β -lactam antibiotics, auxins, and cytokinins on shoot regeneration from callus cultures of two hybrid aspens, *Populus tremuloides* x *P. tremula* and *P. canescens* x *P. gradidentata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98: 249-61.

Brady NC, Weil RR (1999) *The Nature and Property of Soils*. Prentice Hall, Upper Saddle Hall, NJ.

Braun PG (1995) Effects of *Cylindrocarpon* and *Pythium* species on apple seedlings and potential role in apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17: 336-341.

Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333.

Brimecombe MJ, De Leij Frans AAM, Lynch JM (2001) Nematode community structure as a sensitive indicator of microbial perturbations induced by a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biology and Fertility of Soils* 34: 270-275.

Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 126: 524-535.

Bucourt R, Bormann D, Heymes R, Perronnet M (1980) Chemistry of cefotaxime. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 6: 63-67.

Buer CS, Djordjevic MA (2009) Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 60: 751-763.

Buer CS, Imin N, Djordjevic MA (2010) Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 98-111.

Bulgakov VP (2008) Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 26: 318-324.

Bulgakov VP, Khodakovskaya MV, Labetskaya NV, Chernoded GK, Zhuravlev YN (1998) The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry* 49: 1929-1934.

Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Khodakovskaya MV, Glazunov VP, Zvereva EV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN (2002) Effects of salicylic acid, methyl jasmonate, etephone and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with *rolB* and *rolC* genes. *Journal of Biotechnology* 97: 213-221.

Burger WP, Small JGC (1983) Allelopathy in citrus orchards. *Scientia Horticulturae*, 20: 361-375.

Burgos L, Albuquerque N (2003) Low kanamycin concentration and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports* 21: 1167-1174.

Burgos NR, Talbert RE, Kim KS, Kuk YI (2004) Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology* 30: 671-689.

Caboni E, Lauri P, D'Angeli S (2000) *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports* 19: 755-760.

Caboni E, Tonelli M, Falasca G, Damiano C (1996) Factors affecting adventitious shoot regeneration *in vitro* in the apple rootstock 'Jork 9'. *Advances in Horticultural Science* 10: 146-150.

Caboni E, Tonelli MG (1999) Effect of 1, 2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple. *Plant Cell Reports* 18: 985-988.

Capone I, Spano L, Cardarelli M, Bellincampi D, Petit A, Costantino P (1989) Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Molecular Biology* 13: 43-52.

Cardarelli M, Spano L, Mariotti D, Mauro ML, Van Sluys MA, Costantino P (1987) The role of auxin in hairy root induction. *Molecular and General Genetics* 208: 457-463.

Cardarelli M, Spano L, Mariotti D, Mauro ML, Van Sluys MA, Costantino P (1987) The role of auxin in hairy root induction. *Molecular and General Genetics* 208: 457-463.

Caruso FL, Neubauer BF, Begin MD (1989) A histological study of apple roots affected by replant disease. *Canadian Journal of Botany* 67: 742-749.

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.

Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G, Gidley MJ (2002) Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta* 215: 989-996.

Chatterjee AK, Gibbins LN (1969) Metabolism of phloridzin by *Erwinia herbicola*: nature of the degradation products, and the purification and properties of phloretin hydrolase. *Journal of Bacteriology* 100: 594-600.

Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D, Jha S (2005) Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. *Plant Cell Reports*, 24: 25-35.

Chen W, Yun, MS, Deng F, Yogo Y (2004) Effects of root-applied naringenin and chalcone on the growth of annual plants. *Weed Biology and Management* 4: 118-122.

Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, Casse-Delbart F, Tempé J (1982) *Agrobacterium rhizogens* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. *Nature* 29: 5432-434.

Chou CH, Lee YY (1991) Allelopathic dominance of *Miscanthus transmorrisonensis* in an alpine grassland community in Taiwan. *Journal of Chemical Ecology* (1991) 17: 2267-2281.

Chou CH, Leu LL (1992) Allelopathic substances and interactions of *Delonix regia* (Boj) Raf. *Journal of Chemical Ecology* 18: 2285-2303.

Chou CH, Lin HJ (1976) Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* L. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. *Journal of Chemical Ecology* 2: 353-367.

Chou CH, Muller CH (1972) Allelopathic mechanisms of *Arctostaphylos glandulosa* var. *zacaensis*. *American Midland Naturalist* 88: 34-347.

Coart E, Van Glabeke S, De Loose M, Larsen AS, Roldan-Ruiz I. (2006) Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology* 15: 2171-2182.

Colpas, FT, Ono EO, Rodrigues JD, Passos JRS (2003) Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 155-161.

Combard A, Baucher MF (1988) A common organization of the T-DNA genes expressed in plant hairy roots induced by different plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology* 10: 499-509.

Come D, Tissaoui T (1973) Interrelated effect of imbibition temperature and oxygen on seed germination. In: Heydecker W (ed.). *Seed ecology*. Butterworths, London. pp. 157-168.

Corcuera LJ (1993) Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. Review article number 78. *Phytochemistry* 33: 741-747.

Costa MGC, Nogueira FTS, Figueira ML, Otoni WC, Brommonschenkel SH, Cecon PR (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports* 19: 327-332.

Cruz OR, Anaya AL, Hernandez-Bautista BE (1998) Effects of allelochemical stress produced by *sicyosdeppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolous vulgaris* and *Cucubita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology* 24: 2039-2057.

Cruz-Ortega R, Anaya AL, Ramos L (1988) Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of water melon. *Journal of Chemical Ecology* 14: 71-86.

Cui X, Wang Y, Zhen W (2010) The effects of phlorizin stress on the protective enzyme and metabolic regulation substances in the root of *M. micromalus*. *Frontiers of Agriculture in China* 4: 323-327.

Curl EA, Truelove B (1986) *The Rhizosphere*. Springer, NewYork.

Cvikrova M, Hrubcova M, Eder J, Binarova P (1996) Changes in the levels of endogenous phenolics, aromatic monoamines, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and auxin oxidase activities during initiation of alfalfa embryogenic and nonembryogenic calli. *Plant Physiology and Biochemistry*.

Czarnota MA, Paul RN, Dayan FE, Nimbale CI, Weston LA (2001) Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. *Weed Technology* 15: 813-825.

Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Bevan DR, Henrissat B, Esen A (2000) The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of

mutant maize β -glucosidase-DIMBOA,-DIMBOAGlc, and-dhurrin complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 13555-13560.

D'Angeli S, Lauri P, Dewitte W, Van Onckelen H, Caboni E (2001) Factors affecting in vitro shoot formation from vegetative shoot apices of apple and relationship between organogenic responses and cytokinin localisation. Plant Biosystems 135: 95-100.

da Silva Mendes AF, Cidale LC, de Oliveira MLP, Otoni WC, Soares-Filho WDS, Costa MGC (2009) Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison to cefotaxime on plant regeneration of *Citrus sinensis* L. Osb. Plant Cell Tissue and Organ Culture 97: 331-336.

Dai H, Li W, Han G, Yang Y, Ma Y, Li H, Zhang Z (2013) Development of a seedling clone with high regeneration capacity and susceptibility to *Agrobacterium* in apple. Scientia Horticulturae 16: 202-208.

Dai W, Castillo C (2007) Factors affecting plant regeneration from leaf tissues of *Buddleia* species. HortScience 42: 1509-1517.

Daigny G, Paul H, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1996) Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh.(cv 'Gloster 69'). Plant cell reports 16: 153-157.

Damiano C, Monticelli S (1998) In vitro fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. Electronic Journal of Biotechnology 1: 12-13.

Dare AP, Tomes S, Cooney JM, Greenwood DR, Hellens RP (2013) The role of enoyl reductase genes in phloridzin biosynthesis in apple. Plant physiology and biochemistry 72: 54-61.

Davies KM, Albert NW, Schwinn KE (2012) From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Functional Plant Biology* 39: 619-638.

Dayan FE, Hernandez A, Allen SN, Moraes RM, Vroman JA, Avery MA, Duke SO (1999) Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry* 50: 607- 614.

Dayan FE, Romagni JG, Duke SO (2000) Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2079-2094.

De Klerk GJ, van der Krieken W, De Jong JC (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35: 189-199.

De Koninck L (1835) Ueber das phloridzin (phlorrhizin). *European Journal of Organic Chemistry* 15: 75-77.

De Veylder L, Beeckman T, Inze' D (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 655-665.

Demain AL, Elander RP (1999) The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75: 5-19.

Djordjevic MA, Redmond JW, Batley M, Rolfe BG (1987) Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6: 1173-1179.

Dmitrović S, Simonović A, Mitić N, Savić J, Cingel A, Filipović B, Ninković S (2015) Hairy root exudates of allelopathic weed *Chenopodium murale* L. induce oxidative stress and down-regulate core cell cycle genes in *Arabidopsis* and wheat seedlings. *Plant Growth Regulation* 75: 365-382.

Dobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Bubán T, Szalai J (2000) *In vitro* shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. *International Journal of Horticultural Science* 6: 36–39.

Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Kiss E, Lazányi J, Bubán T (2002) Effects of conditioning of apple shoots with meta-topolin on the morphogenic activity of *in vitro* leaves. *Acta Agronomica Hungarica* 50: 117–126.

Dobránszki J, Teixeira da Silva JA (2010) Micropropagation of apple - A review. *Biotechnology Advances* 28: 462–488.

Dong H, Ning Z, Yu L, Li L, Lin L, Huang J (2007) Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. *Molecules* 12: 552–562.

Dong Q, Zhao Y, Jiang H, He H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y (2011) Genome-wide identification and characterization of the cyclin gene family in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 55-67.

Doughty S, Power JB (1988) Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of *Malus x domestica* Borkh. cv. Greensleeves. *Plant Cell Reports*, 7: 200-201.

Druart P (1997) Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum* 39: 67–77.

Dufour M (1990) Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Horticulturae* 280: 51-61.

Dugé de Bernonville T, Guyot S, Paulin JP, Gaucher M, Loufrani L, Henrion D, Derbré S, Guilet D, Richomme P, Dat JF, Brisset MN (2010) Dihydrochalcones: implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry* 71: 443–452.

Einhellig FA (1995) Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: Inderjit, Einhellig FA, Dakshini KMM (eds.) Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications. American Chemical Society Symposium Series, Vol. 582. Washington DC. pp. 96-116.

Einhellig FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG (2004) Mode of allelochemical action of phenolic compounds. Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals, 217-238.

Einhellig FA, Rasmussen JA, Hejl AH, Souza IF, Hejl AH, Souza IF (1993) Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. Journal of Chemical Ecology 19: 369-375.

Einhellig FA, Souza IF (1992) Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. Journal of Chemical Ecology 18: 1-11.

Enders TA, Strader LC (2015) „Auxin activity: Past, present, and future“, American Journal of Botany, 102: 180-196.

Ervin GN, Wetzel RG (2000) Allelochemical autotoxicity in the emergent wetland macrophyte *Juncus effusus* (Juncaceae). American Journal of Botany 87: 853-860.

Estruch JJ, Chriqui D, Grossmann K, Schell J, Spena A (1991a) The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. The European Molecular Biology Organization Journal 10: 2889 - 2895.

Estruch JJ, Parets-Soler A, Schmulling T, Spena A (1991b) Cytosolic localization in transgenic plants of the *rolC* peptide from *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Molecular Biology 17: 547-550.

Fabian T, Lorbiecke R, Umeda M, Sauter M (2000) The cell cycle genes *cycA1; 1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. Planta 211: 376-383.

Famiani F, Ferradini N, Staffolani P, Standardi A (1994) Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. *Journal of Horticultural Science* 69: 679–685.

Fan TWM, Lane AM, Crowley D, Higashi RM (1997) Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudate using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 251: 57-68.

Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I (1989) Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 75-87.

Ferrer JL, Austin MB, Stewart JrC, Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 356-370.

Filippini F, Rossi V, Marin O, Trovato M, Costantino P, Downey PM, Lo Schiavo FL, Terzi M (1996) A plant oncogene as a phosphatase. *Nature* 379: 499-500.

Fisher DD, Cyr RJ (1998) Extending the microtubule/microfibril paradigm cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiology* 116: 1043–1051.

Floss DS, Walter MH (2009) Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signaling & Behavior* 4: 172-175.

Fobert PR, Gaudin V, Lunness P, Coen ES, Doonan JH (1996) Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* 8: 1465-1476.

Forte AV, Ignatov AN, Ponomarenko VV, Dorokhov DB, Savelyev NI (2002) Phylogeny of the *Malus* (apple tree) species, inferred from the morphological traits and molecular data analysis. Russian Journal of Genetics 38: 1150–1160.

Friml J, Wiśniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. Nature 415: 806-809.

Friml J. (2003) Auxin transport - Shaping the plant. Current Opinion in Plant Biology 6: 7-12.

Fründt C, Meyer AD, Ichikawa T, Meins F (1998) A tobacco homologue of the Ri-plasmid *orf13* gene causes cell proliferation in carrot root disks. Molecular and General Genetics 259: 559-568.

Fu X, Harberd NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. Nature 421: 740-743.

Fujita KI, Kubo I (2003) Synergism of polygodial and trans-cinnamic acid on inhibition of root elongation in lettuce seedling growth bioassays. Journal of Chemical Ecology 29: 2253-2262.

Fulcher AF, Ranney TG, Burton JD, Walgenbach JF, Danehower DA (1998) Role of foliar phenolics in host plant resistance of *Malus* taxa to adult Japanese beetles. HortScience33: 862-865.

Gahan PB, George EF (2008) Adventitious regeneration. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds.) Plant propagation by tissue culture, 3rd Edn. Springer, Dordrecht, pp. 355-401.

Gaisano H, Ostenson C, Sheu L, Wheeler M, Efendic S (2002) Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble Nethylmaleimide- sensitive factor attachment protein

receptors in Got-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 2002 143: 4218-4226.

Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.

Gao XB, Zhao FX, Xiang Shen, Hu YL, Hao YH, Yang SQ, Su LT, Mao ZQ (2010) Effects of cinnamom acid on respiratory rate and its related enzymes activity in roots of seedlings of *Malus hupehensis* Rehd. *Agricultural Sciences in China* 9: 833-839.

Garg N, Garg OP (1989) Effect of exogenous treatment with some phenolic compounds on nitrogen fixation, growth and yield in *Cicer arietinum* L. (chickpea). *Current Science* 58: 31-32.

Garrett SD, Lee HA, Morgan MR (1999) A nonisotopic estrogen receptor-based assay to detect estrogenic compounds. *Nature Biotechnology* 17: 1219–1222.

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.

Gaucher M, de Bernonville TD, Lohou D, Guyot S, Guillemette T, Brisset MN, Dat JF (2013) Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* 90: 78-89.

George EF (1993) Factors affecting growth and morphogenesis. In: George EF (ed.) *Plant propagated by tissue culture*. Exegetics Ltd., London, UK, pp. 231-271.

Gercheva P, Andinova T, Ivanova K (2000) Plant regeneration from leaf tissues of apple cultivars Granny Smith, Morspur Golden and Starkrimson. Bulgarian Journal of Agricultural Science 6: 637-643.

Gercheva P, Nacheva L, Dineva V (2007) The rate of shoot regeneration from apple (*Malus domestica*) leaves depending on the in vitro culture conditions of the source plants. In I Balkan Symposium on Fruit Growing 825 pp. 71-76.

Gleason FK (1990) The natural herbicide, cyanobacterin, specifically disrupts thylakoid membrane structure in *Euglena gracilis* strain Z. Federation of European Microbiological Society Letters 68: 77-82

Gniazdowska A, Bogatek R (2005) Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. Acta Physiologiae Plantarum 27: 395-407.

Gonzales VM, Kazimir J, Nimbal C, Weston LA, Cheniae GM (1997) Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 1415-1421.

Gosch C, Halbwirth H, Kuhn J, Miosic S, Stich K (2009) Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). Plant Science 176: 223-231.

Gosch C, Halbwirth H, Schneider B, Hölscher D, Stich K (2010a) Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus x domestica* and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 2'-O-glucoside (phloridzin). Plant science, 178: 299-306.

Gosch C, Halbwirth H, Stich K (2010b) Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. Phytochemistry 71: 838-843.

Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *The Plant Cell* 22: 623-639.

Gounaris K, Brain ARR, Quinn PJ, Williams WP (1984) Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 766: 198-208.

Graph C, Wricke G (1998) Increase of *in vitro* regeneration in *Malus domestica* by the application of phosphatase inhibitors. *Plant Breeding* 117: 563-566.

Green P, Selker J (1991) Mutual alignments of cell walls, cellulose, and cytoskeletons: their role in meristems. *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Academic Press, San Diego

Grewal D, Gill R, Gosal SS (2006) Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. *Biotechnology Journal* 1: 1158-1162.

Grochowska MJ (1963) Studies on natural growth regulators in apple trees in relation to biennial bearing. *Bulletin De L'Academie Polonaise des Sciences*, XI, 585-590.

Grochowska MJ (1964) Identification of the growth inhibitor connected with flower bud formation in apple. *Bulletin De L'Academie Polonaise des Sciences* 12: 379-393.

Grzebelus E, Skop L (2014) Effect of β -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. *In Vitro Cell Developmental Biology - Plant* 50: 568-75.

Günl M, Neumetzler L, Kraemer F, de Souza A, Schultink A, Pena M, York WS, Pauly M (2011) AXY8 encodes an α -fucosidase, underscoring the importance of apoplastic metabolism on the fine structure of Arabidopsis cell wall polysaccharides. *Plant Cell* 23: 4025-4040.

Gutbrodt B, Mody K, Wittwer R, Dorn S (2011) Within-plant distribution of induced resistance in apple seedlings: rapid acropetal and delayed basipetal responses. *Planta* 133: 1199-1207.

Gutierrez-Pesce P, Taylor K, Muleo R, Rugini E (1998) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 17: 574-580.

Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* 32: 345-353.

Hallak AMG, Davide LC, Souza IF (1999) Effects of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. *Genetics and Molecular Biology* 22: 95-99.

Han X, Cheng ZH, Meng HW, Yang XL, Ahmad I (2013) Allelopathic effect of decomposed garlic (*Allium Sativum* L.) stalk on lettuce (*L. Sativa* var. *Crispa* L.). *Pakistan Journal of Botany* 45: 225-233.

Hancock CR, Barlow HWB, Lacey HJ (1962) The behaviour of phloridzin in the coleoptile straight growth test. *Journal of Experimental Botany* 12: 401-408.

Hanke V, Rohde A, Grafe C (1991) Adventitious shoot formation on leaf explants in apple (*Malus domestica* Borkh). *Gartenbauwiss* 56: 214–220

Hanower J, Hanower P (1984) Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de palmiers à huile. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 298: 45-48.

Harbage JF, Stimart DP, Auer C (1998) pH affects 1H-indole-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induction in apple microcuttings. *Journal of American Society for Horticultural Science* 123: 6-10.

Harborne JB, Baxter H, Moss GP (1999). *Phytochemical dictionary. Handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London: Taylor & Francis

Harris SA, Robinson JP, Juniper BE (2002) Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18: 426-430.

Hasegawa K, Togo S, Urashima M, Mizutani J, Kosemura S, Yamamura S (1992) An auxin-inhibiting substance from light-grown maize shoots. *Phytochemistry* 31: 3673-3676.

Hashimoto T (2002) Molecular genetic analysis of left-right handedness in plants. *Philosophical transactions of the royal society of London B: Biological Sciences* 357: 799-808.

He HQ, Lin WX (2001) Studies on allelopathicphysiobiochemical characteristics of rice. *Chin. J. Eco Agriculture Resarch* 9: 56-57.

Hedden P (1990) Gibberellin biosynthesis enzymes and the regulation of gibberellin concentration. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J (eds) *Gibberellins*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 94-105.

Hejl AM, Einhellig FA, Rasmussen JA (1993) Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration. *Journal of Chemical Ecology* 19: 559-568.

Herman DE, Hess CE (1963) The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. *The international plant propagators' society* 13:42-62.

Hicks GS (1987) Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. *Canadian Journal of Botany* 65: 1913-20.

Hierro JL, Callaway RM (2003) Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil* 256: 29-39.

Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, Beifuss U, Carle R (2003) Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2896-2899.

Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, De Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339-2351.

Hoestra H, (1968) Replant diseases of apple in the Netherlands. Ph.D. thesis. Meded. Landbouwhoges. Wageningen, the Netherlands.

Hoffmann T, Friedlhuber R, Steinhauser C, Tittel I, Skowranek K, Schwab W, Fischer TC (2012) Histochemical screening, metabolite profiling and expression analysis reveal Rosaceae roots as the site of flavan-3-ol biosynthesis. *Plant Biology* 14: 33-40.

Hofmann A, Wittenmayer L, Arnold G, Schieber A, Merbach W (2009) Root exudation of phloridzin by apple seedlings (*Malus × domestica* Borkh.) with symptoms of apple replant disease. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 82: 193-198.

Hokanson SC, Lamboy WF, Szewc-McFadden AK, McFerson JR (2001) Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118: 281-294.

Holford P, Newbury HJ (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Reports* 11: 93-96.

Hollman PCH, Katan MB (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* 37: 937-942.

Hrazdina G (2003) Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* 64: 485-492.

Huffman GA, White FF, Gordon MP, Nester EW (1984) Hairy root inducing plasmid, physical map and homology to tumor inducing plasmids. *Journal of Bacteriology* 157: 269-276.

Hunter LD, Hull LA (1993) Variation in the concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry* 34: 1251-1254.

Hvattum E (2002) Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 655-662.

Inderjit, Weston LA (2003) Root exudation: an overview. In: de Kroon, Visser EJW (eds) *Root Ecology*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany

Inderjit (2005) Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil* 274: 227-236.

Inoguchi M, Ogawa S, Furukawa S, Kondo H (2003) Production of an allelopathic polyacetylene in hairy root cultures of goldenrod (*Solidago altissima* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67: 863-868.

Inzé D, De Veylder L(2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 40: 77-105.

Iqbal J, Cheema ZA, An M (2007) Intercropping of field crops in cotton for the management of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.). *Plant and Soil* 300: 163-171.

Jabran K, Mahajan G, Sardana V, Chauhan BS (2015) Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection* 72: 57-65.

Jaffee BA, Abawi GS, Mai WF (1982) Role of soil microflora and *Pratylenchus penetrans* in an apple replant disease. *Phytopathology* 72: 247-251.

James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* 7: 658-61.

James DJ, Passey AJ, Rugini E (1988) Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 132: 148-154.

James DJ, Thurbon IJ (1979) Rapid *in-vitro* rooting of the apple rootstock M9. *Journal of Horticultural Sciences* 54: 309-311.

Jayasankar NP, Bandoni RJ, Towers GHN (1969) Fungal degradation of phloridzin. *Phytochemistry* 8: 379-383.

Jez JM, Noel JP (2002) Reaction mechanism of chalcone isomerase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 1361-1369.

Jianghong Z, Zhiquan M, Liqin W (2007) Effect of phloridzin on physiological characteristics of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Scientia Agricultura Sinica* 40: 492-498.

John J, Sarada S (2012). Role of phenolics in allelopathic interactions. *Allelopathy Journal* 29: 215-230.

Jones OP (1976) Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature* 262: 392-393.

Jones P, Vogt T (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174.

Jouanin L (1984) Restriction map of an agropine type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid* 12: 91-102

Jouanin L, Guerche P, Pamboukdjian N, Tourneur C, Casse-Delbart F, Tourneur J (1987) Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Molecular and General Genetics* 206: 387-392.

Jugd  H, Nguy D, Moller I, Cooney JM, Atkinson RG (2008) Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *The FEBS journal* 275: 3804-3814.

K hkk nen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954-3962.

Kajikawa M, Hirai N, Hashimoto T (2009) A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Molecular Biology* 69: 287.

Karhu ST (1995) The quality of applied carbohydrates affects the axillary branching of apple microshoots. *Bulletin des Recherches Agronomiques Gembloux* 30: 21-27.

Kathrin K, Michael K, Elke R (2005) Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 797-806.

Kato-Naguchi H, Macias FA (2004) Mode of action of MBOA on inhibition of plant germination. In: *Proceedings of Second European Allelopathy Symposium "Allelopathy – from understanding to application"*. Pu awy, Poland. pp. 96-97.

Keating KI (1999) Allelochemicals in plankton communities. In: Inderjit, Chester LF, Dakshini KMM (eds). *Principles and Practice in Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. Boca Raton, CRC Press. pp. 165-178.

Keulemans J, De Witte K (1994) Plant regeneration from cotyledons and embryonic axes in apple: Sites of reaction and effect of pre-culture in the light. In *Progress in Temperate Fruit Breeding* Springer, Dordrecht. pp. 371-375.

Khanh TD, Elzaawely AA, Chung IM, Ahn JK, Tawata S, Xuan TD (2007) Role of allelochemical for weed management in rice. *Allelopathy Journal* 19: 85-96.

Kholi RK, Singh HP, Batish DR (2004) *Allelopathy in agroecosystems*. Food Products Press. New York, USA.

Kieffer M, Neve J, Kepinski S (2010) Defining auxin response contexts in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 12-20.

Kim YK, Li X, Xu H, Park NI, Uddin MR, Pyon JY, Park SU (2009) Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Journal of Crop Science and Biotechnology* 12: 53-57.

Kiselev KV, Dubrovina AS, Veselova MV, Bulgakov VP, Fedoreyev SA, Zhuravlev Y (2007) The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology* 128: 681-92

Klein M, Burla B, Martinoia E (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS letters*, 580: 1112-1122.

Klingauf F (1971) Die wirkung des glucosids phlorizin auf das wirtswhalverhalten von *Rhopalosiphum insertum* und *Aphis pomi* de geer (Homoptera: Aphididae) *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie* 68: 41-55.

Kollárová K, Lišková D, Kákoniová D, Lux A (2004) Effect of auxins on *Karwinskia humboldtiana* root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 79: 213-221.

Komaki S, Sugimoto K (2012) Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant and Cell Physiology* 53: 953-964.

Komori S, Watanabe M, Tanaka N, Suzuki A, Wada M, Soejima J, Matsumoto S, Adachi Y, Li J (2009) Antibiotics for *Agrobacterium* elimination in apple transformation. *Horticultural Research (Japan)* 8: 419-426.

Kong D, Hao Y, Cui H (2016) The WUSCHEL related homeobox protein WOX7 regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* 9: 261-270.

Korban SS, O'Connor PA, Elobeidy A (1992). Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *Journal of Horticultural Science* 67: 341-349.

Kupidłowska E, Dobrzynska K, Parys E, Zobel AM (1994) Effect of coumarin and xantoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. *Journal of Chemical Ecology* 20: 2471-2480.

Lahners K, Byrne MC, Chilton MD (1984) T-DNA fragments of hairy root plasmid pRi8196 are distantly related to octopine and nopaline Ti plasmid T-DNA. *Plasmid* 11: 130-140.

Lambert C, Bianco J, Garelo G, Le Page-Degivry MT (1998) Alteration of hormonal levels and hormone sensitivity by Ri T-DNA-transformation of apple cuttings. *Journal of Plant Physiology* 153: 677-683.

Lambert C, Tepfer D (1992) Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 105-109.

Lane WD (1978) Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters*, 13: 281-285.

Łata B, Trampczynska A, Paczesna J (2009) Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* 121: 176-181.

Lattanzio V, Di Venere D, Linsalata V, Bertolini P, Ippolito A, Salerno, M (2001) Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5817-5821.

Lauzon CR, Potter SE, Prokopy RJ (2003) Degradation and detoxification of the dihydrochalcone phloridzin by *Enterobacter agglomerans*, a bacterium associated with the apple pest, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae) *Environmental Entomology* 32: 953-962.

Lee J, Das A, Yamaguchi M, Hashimoto J, Nobuhiro Tsutsumi N, Uchimiya H, Umeda M (2003) Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *The Plant Journal* 34: 417-425.

Lee KC, Campbell RW (1969) nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra*. *Hortscience* 4: 297-298.

Lee SY, Cho SI, Park MH, Kim YK, Choi JE, Park SU (2007) Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). *Preparative biochemistry & biotechnology* 37: 239-246.

Lee TT, Skoog F (1965) Effects of hydroxybenzoic acids on indoleacetic acid inactivation by tobacco callus extracts. *Physiologia Plantarum* 18: 577-585.

Lefevre PB (1961) Sugar transport in the red blood cell. *Pharmacological Reviews* 13: 39.

Lemcke K, Schmulling T (1998) Gain of function assays identify non-*rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA that alter plant morphogenesis or hormone sensitivity. *Plant Journal* 15: 423-433.

Leser C, Treutter D (2007) Competition between growth, secondary metabolism and resistance of apple. Acta Horticulturae Proceedings VIIIth IS on Orchard Systems.

Leu E, Kreiger-Liszky A, Goussias C, Gross EM (2002) Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. Plant Physiol 130: 2011-2018.

Levitt J, Lovett JV, Garlick PR (1984) Datura stramonium allelochemicals: longevity in soil, and ultrastructural effects on root tip cells of *Helianthus annuus* L. New Phytol. 97: 213-218.

Levizou E, Karageorgou P, Petropoulou Y, Grammatikopoulos G, Manetas Y (2004) Induction of ageotropic response in lettuce radicle growth by epicuticular flavonoid aglycons of *Dittrichia viscosa*. Biologia Plantarum 48: 305-307.

Lewis DR, Miller ND, Splitt BL, Wu G, Spalding EP (2007) Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. The Plant Cell 19: 1838-1850.

Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK (2011) Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. Development 138: 3485-3495.

Li HH, Lajide L, Nishimura H, Hasegawa K, Mizutani J (1993a) Allelochemicals in the soil beneath *Quercus mangolica* Fisch var. *grosseserrata* Rehd Wils. Weed Research 38: 282-295.

Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Jiang DA (2010) Phenolics and plant allelopathy. Molecules 15: 8933-8952.

Likhonos FD (1974) Obzor vidov v rode *Malus* Mill.: geografiya i sistematika. (A survey of the species in the genus *Malus* Mill.). Trudy Prikl. Bot. Genet. Selek 52: 16-34.

Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.

Liu C, Zhu J, Liu Z, Li L, Pan R, Jin L (2002) Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Growth Regulation* 38: 37-43.

Liu JR, Sink KC, Dennis FG (1983) Plant regeneration from apple seedling explants and callus cultures. *Plant Cell Tissue and Organe Culture* 2: 293- 304.

Liu Q, Salih S, Hammerschlag F (1998) Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes highfrequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Reports* 18:32–36

Liu XF, Hu XJ (2001) Effects of allelochemical ferulic acid on endogenous hormone level of wheat seedling. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* 1: 31.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 25: 402-408.

Lloyd G, McCown B (1981) Micropropagation of mountain laurel (*Kalsmia latifolia*). pp. 421-427.

Lucyszyn N, Quoirin M, Anjos A, Sierakowski MR (2005). Blends of agar/galactomannan for Marubakaido apple rootstock shoot proliferation. *Polímeros Ciên Tecnol* 15: 146-50.

Lyu SW, Blum U, Gerig TM, O'Brien TE (1990) Effect of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake of cucumber seedling. *Journal of Chemical Ecology* 16: 2559-2567.

Macey RI, Farmer R (1970) Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 211: 104-106.

Macías FA, Chinchilla N, Varela RM, Molinillo JMG (2006) Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. Steroids 71: 603-608.

Macias FA, Marin D, Oliveros-Bastidas A, Varela RM, Simonet AM, Carrera C, Molinillo JM (2003) Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. Biology Science Space 17: 18-23.

Maffei M, Bertea CM, Garneri F, Scanneri S (1999) Effect of benzoic acid hydroxy- and methoxy- ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. Isocitrate lyase and catalase activity. Plant Science 141: 139-147.

Magyar- Tábóri K, Dobránszki J, Hudák I (2011) Effect of cytokinin content of the regeneration media on *in vitro* rooting ability of adventitious apple shoots. Scientia Horticulturae 129: 910-913.

Magyar-Tábóri K, Dobránszki J, Jámbor- Benczúr E, Lazányi J, Szalai J, Ferenczy A (2002) Effects of indole-3-butyric acid levels and activated charcoal on rooting of *in vitro* shoots of apple rootstocks. Intl. Journal Hort Science 8: 25-28.

Magyar-Tábóri K, Dobránszki J, Teixeira da Silva JA, Bulley SM, Hudák I (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tissue and Organ Culture 101: 251-267.

Maheswaran G, Pridmore L, Franz P, Anderson MA (2007) A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. Plant Cell Report 26: 773-782.

Mamidala P, Nanna RS (2009) Efficient *in vitro* plant regeneration, flowering and fruiting of dwarf tomato cv. Micro-Msk. Plant Omics Journal 2: 98-102.

Mannan A, Shaheen N, Rehman A, Arshad W, Zia M, Mirza B (2007) Production and release of allelopathic compounds by *Artemisia* hairy root cultures. *Allelopathy Journal* 20: 379.

Marin JA, Jones OP, Hadlow WCC (1993) Micropropagation of columnar apple trees. *Journal of Horticultural Science* 68: 289-297.

Massardo F, Zuniga GE, Perez LM, Corcuera LJ (1994) Effects of hydroxamic acids on electron transport and their cellular location in corn. *Phytochemistry* 35: 873-876.

Masuda T, Bessho H, Komori S, Tsuchiya S (1988) Studies on cell culture and plant regeneration in apple. II. Adventitious shoot formation from the roots of intact micropropagated plantlets. *Bulletin of the Fruit Research Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Series C (Morioka)* 15: 13-19.

Mathias RJ, Boyd LA (1986) Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Science* 46: 217-23.

Mato MC, Mendez J, Vazquez (1994) Polyphenolic auxin protectors in bud of juvenile and adult chestnut. *Physiology Plant* 91: 23-26.

Maurel C, Brevet J, Barbier-Brygoo H, Guern J, Tempe J (1990) Auxin regulates the promoter of the root inducing *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics* 223: 58-64.

Maximova SN, Dandekar M, Gultinan MJ (1998) Investigation of *Agrobacterium* mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T DNA transfer are rate limiting. *Plant Molecular Biology* 37: 549-59.

Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgen G, Laux T (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.

Mazzola M (1998) Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. *Phytopathology* 88: 930-938.

McAdam-O Connell D, Mac An tSaoir S, Copeland R (2004) Development of leaf disk regeneration system for ‘Bramley’s’ seedling apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Acta Horticulturae* 663: 483–486.

McCoy E, O’Connor SE (2008) Natural products from plant cell cultures. In: *Natural Compounds as Drugs Volume I*. Birkhäuser Basel. pp. 329-370.

McCrimmon R, Evans M, Jacob R, Fan X, Zhu Y, Shulman GI, Sherwin RS (2002) AICAR and phlorizin reverse the hypoglycemia-specific defect in glucagon secretion in the diabetic BB rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 283: 1076-1083.

McGhie TK, Hunt M, Barnett LE (2005) Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3065-3070.

McLaughlin JC, Smith SM (1994) Metabolic regulation of glyoxylate cycle enzyme synthesis in detached cucumber cotyledons and protoplasts. *Planta* 33: 87-95.

Meazza G, Scheffler BE, Tellez MR, Rimando AM, Romagni JG, Duke SO, Nanayakkara D, Khan IA, Abourashed EA, Dayan FE (2002) The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxy phenylpyruvate dioxygenase. *Phytochemistry* 59: 281-288.

Memon AA, Memon N, Luthria DL, Bhangar MI, Pitafi AA (2010) Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L.,

Morus alba L.) leaves and fruits grown in Pakistan. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 60.

Menges M, De Jager SM, Gruijssem W, Murray JA (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. Plant Journal 41: 546–566.

Merken HM, Beecher GR (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 577-599.

Meyer A, Tempe J, Costantino P (2000) Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. Plant-microbe Interactions 5: 93-139.

Meyer AD, Ichikawa T, Meins F (1995) Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. Molecular and General Genetics 24: 265-273.

Michelet B, Boutry M (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase. A highly regulated enzyme with multiply physiological functions. Plant Physiology 108: 1-6.

Miguel CM, Druart P, Oliveira MM (1996) Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 32: 148-153.

Miksicek RJ (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. Molecular Pharmaceutics 44: 37-43.

Mikulic Petkovsek M, Stampar F, Veberic R (2008) Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. Journal of Plant Pathology 90: 49-55.

Mikulic Petkovšek M, Stampar F, Veberic, R. (2009). Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. *Canadian journal of plant science* 89: 745-753.

Mitić N, Dmitrović S, Djordjević M, Zdravković-Korać S, Nikolić R, Raspor M, Đorđević T, Maksimović V, Živković S, Krstić-Milišević D, Stanišić M, Ninković S (2012) Use of *Chenopodium murale* L. transgenic hairy root in vitro culture system as a new tool for allelopathic assays. *Journal of Plant Physiology* 169: 1203-1211.

Mitić N, Stanišić M, Savić J, Ćosić T, Stanisavljević N, Miljuš-Đukić J, Marin M, Radović S, Ninković S (2018). Physiological and cell ultrastructure disturbances in wheat seedlings generated by *Chenopodium murale* hairy root exudate. *Protoplasma* 255: 1683-1692.

Mitić N, Stanišić M, Savić J, Ćosić T, Stanisavljević N, Miljuš-Đukić J, Marin M, Svetlana Radović S, Ninković S (2018) Physiological and cell ultrastructure disturbances in wheat seedlings generated by *Chenopodium murale* hairy root exudate. *Protoplasma*, 1-10.

Mittal P, Gosal SS, Senger A, Kumar P (2009) Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15: 257-265.

Modgil M, Sharma R (2009) Effect of antibiotics on regeneration and elimination of bacteria during gene transfer in apple. In: Hanke V (ed.). *Proc. 1st IS on Biotechnology of Fruit Species. Acta Horticulturae* 839: 353-9.

Modgil M, Sharma T, Thakur M (2009) Commercially feasible protocol for rooting and acclimatization of micropropagated apple rootstocks. *Acta Horticulturae* 839: 209-14.

Montecelli S, Gentile A, Damiano C (2000) *In vitro* shoot regeneration of apple cultivar Gala. *Acta Horticulturae* 530: 219-223.

Moore JN, Ballington JR (1991) Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *Acta Horticulturae* 290: 1-63.

Morejohn L (1991) The molecular pharmacology of plant tubulin and microtubules. *The cytoskeletal basis of plant growth and form* 29–43.

Movius EG, Phyllaier MM, Robbins J (1989) Phloretin inhibits cellular uptake and nuclear receptor binding of triiodothyronine in human Hep G2 hepatocarcinoma cells. *Endocrinology* 124: 1988-1997.

Mucciarelli M, Gallino M, Maffei M, Scannerini S (2000) Effects of 3, 4-dihydroxybenzoic acid on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultured *in vitro*. Growth regulation in callus and organ cultures. *Plant Biosystems* 134: 185-192.

Muday GK, DeLong A (2001) Polar auxin transport: Controlling where and how much. *Trends in Plant Science* 6: 535-542.

Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennet M, Wisman E, Palme K (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *The European Molecular Biology Organization Journal* 17: 6903-6911.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Muscolo A, Panuccio MR, Sidari M (2001) The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. Respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *Plant Growth Regulation* 35: 31-35.

Na X, Hu Y, Yue K, Lu H, Jia P, Wang H, Wang X, Bi Y (2011) Narciclasine modulates polar auxin transport in Arabidopsis roots. *Journal of Plant Physiology* 168: 1149-1156.

Naderi D, Askari-Khorasgani O, Mahmoudi E (2016) Cefotaxime and benzyladenine improve melon regeneration. *Iranian Journal of Biotechnology* 14:56-60.

Naing AH, Park KI, Lim SH, Kim CK (2014) Appropriate choice of antibiotics for plant regeneration and optimization of selective agents to be used in genetic transformation of chrysanthemum. *Plant Omics* 7: 237-43.

Natsume H, Seto H, Ōtake N (1982) Studies on Apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 2101-2106.

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* 12: 169-77.

Nemoto K, Hara M, Goto S, Kasai K, Seki H, Suzuki M, Oka A, Muranaka T, Mano Y (2009) The *aux1* gene of the Ri plasmid is sufficient to confer auxin autotrophy in tobacco BY-2 cells. *Journal of plant physiology* 166: 729-738.

Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L (2001) The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant Cell* 13: 2099-2114.

Nicola L, Vrhovsek U, Soini E, Insam H, Pertot I (2017) Phlorizin released by apple root debris is related to apple replant disease. *Phytopathologia Mediterranea* 55: 432-442.

NiemeyerHM (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4- benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27:3349-3358.

Nikolić R, Mitić N, Ninković S, Miljuš-Djukić J, Nešković M (2003) Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. and growth of transformed plants in field. *Biologia Plantarum* 47: 137-140.

Nilsson O, Little CHA, Sandberg G, Olsson O (1996a) Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy. *Plant Molecular Biology* 31: 887-895.

Nilsson O, Moritz T, Sundberg B, Sandberg G, Olsson O (1996b) Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiology* 112: 493-502.

Nilsson O, Olsson O (1997) Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum* 100: 463-473.

Nimbal CI, Yerkes CN, Weston LA, Weller SC (1996) Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54:73-83.

Ninković S, Djordjević T, Vinterhalter B, Uzelac B, Cingel A, Savić J, Radović S (2010) Embryogenic responses of *Beta vulgaris* L. callus induced from transgenic hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 81-91.

Nishida N, Tamotsu S, Nagata N, Saito C, Sakai A (2005) Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1187-1203.

O'Rourke D (2003) World production, trade, consumption and economic outlook for apples. In: Ferree D.C. and Warrington I.J. (eds.) *Apples: botany, production, and uses*. CABI publishing, CAB international, UK. pp: 15-28.

Oerke EC, Dehne HW, Schonbeck F, Weber A (1995) *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops*. Elsevier Science B.V. Amsterdam.

Ono NN, Tian L (2011) The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant science* 180: 439-446.

Oono Y, Satomi T, Uchimiya H (1991) *Agrobacterium rhizogenes lacZ-rolC* gene expression in *Escherichia coli*: detection of the product in transgenic plants using RolC-specific antibodies. *Gene* 104: 95-98.

Ou CQ, Li LG, He P, Zhang ZH (2008) *In vitro* adventitious shoot regeneration and induction of tetraploid from leaves of Hanfu apple. *Journal of Fruit Science* 25: 293-297.

Oyerinde RO, Otusanya OO, Akpor OB (2009) Allelopathic effect of *Tithonia diversifolia* on the germination, growth and chlorophyll contents of maize (*Zea mays* L.). *Scientific Research and Essays* 4: 1553-1558.

Padhy B, Patnaik PK, Tripathy AK (2000) Allelopathic potential of *Eucalyptus* leaf litter leachates on germination of seedling growth of finger millet. *Allelopathy Journal* 7: 69-78.

Padilla IMG, Burgos L (2010) Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports* 29: 1203-1213.

Palazón J, Cusidó RM, Gonzalo J, Bonfill M, Morales S, Piñol MT (1998b) Relation between the amount the *rolC* gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharantus roseus* transformed root cultures. *Journal of Plant Physiology* 153: 712-718.

Palazón J, Cusidó RM, Roig C, Piñol MT (1998a) Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. *Plant Cell Reports* 17: 384-390.

Palmgren MG (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Power houses for nutrient uptake. In: Pawar KB, Chavan PD (eds) *Annual Review of Plant Molecular Biology* 52: 817-845.

Pan Z, Deng X (2000) Plant regeneration from protoplasts of apple. *Acta Horticulturae Sinica* 27: 95-101.

Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Wright EM (1995) Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 270: 27099-27105.

Park SU, Facchini PJ (2000) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal Experimental Botany* 51: 1005-1016.

Patat-Ochatt EM, Boccon-Gibod J, Duron M, Ochatt SJ (1993) Organogenesis of stem and leaf protoplasts of a haploid golden delicious apple clone (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant cell reports* 12: 118-120.

Patat-Ochatt EM, Ochatt SJ, Power JB (1988) Plant regeneration from protoplasts of apple rootstocks and scion varieties (*Malus x domestica* Borkh.). *Journal of plant physiology* 133: 460-465.

Patena L, Sutter EG, Dandekar AM (1987) Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in a difficult-to-root woody species. In: *International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species* 227 pp. 324-329.

Patterson DT (1981) Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of Soybean (*Glycine max*). *Weed Science* 29: 53-59.

Paul H, Belaizi M, Sangwan-Norreel BS (1994) Somatic embryogenesis in apple. *Journal of plant physiology* 143: 78-86.

Pawlicki N, Welander M (1994) Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. *Journal for Horticultural Science* 69: 687-696.

Pawlicki-Jullian N, Sedira M, Welande M (2002) The use of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots to obtain transgenic shoots of the apple rootstock Jork 9. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 163–171.

Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in plant science* 12: 556-563.

Pennacchio M, Jefferson LV, Havens K (2005) *Arabidopsis thaliana*: a new test species for phytotoxic bioassays. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1877-1885.

Perales EH, Schieder O (1993) Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 34: 71-76.

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett, MJ (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* 14: 399-408.

Petkovšek MM, Stampar F, Veberic R (2009) Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 60-67.

Petri C, Burgos L (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research* 14: 15-26.

Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 108: 1049-1057.

Phipps JB, Robertson KR, Smith PG, Rohrer JR (1990) A checklist of the subfamily *Maloideae* (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany* 68: 2209-2269.

Picinelli A, Dapena E, Mangas JJ (2002) Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2273-2278.

Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.

Pius J, George L, Eapen S, Rao PS (1993) Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 91-96.

Politycka B (1997) Free and glucosylated phenolics, phenol-beta-glucosyltransferase activity and membrane permeability in cucumber roots affected by derivatives of cinnamic and benzoic acid. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 311-317.

Politycka B, Kozłowska M, Mielcarz B (2004) Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. *Allelopathy Journal* 13: 29-36.

Ponomarenko VV (1986) Obzor vidov roda *Malus* Mill. (Review of the species comprised in the genus *Malus* Mill.) *Sborn. Nauch. Tr. Prikl. Bot. Genet. Selek* 106, 16-27.

Pontais I, Treutter D, Paulin JP, Brisset MN (2008) *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum* 132: 262-271.

Popova LP, Uzunova AN (1996) Changes in the chloroplast ultrastructure of barley leaves under treatment with jasmonic acid. *Photosynthetica* 32: 635-639.

Pramanik MHR, Nagal M, Asao M, Matsui Y (2000) Effect of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) in hydroponic culture. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1953-1967.

Predieri S, Fasolo FM (1989) High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 17:133-

Puite KJ, Schaart JG (1996) Genetic modification of the commercial *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation method. *Plant Science* 119: 125-33.

Puthoff DP, Smigocki AC (2007) Insect feeding-induced differential expression of *Beta vulgaris* root genes and their regulation by defense-associated signals. *Plant Cell Reports* 26: 71-84.

Qasem JR, Foy CL (2001) Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects: a review. *Journal of Crop Production* 4: 43-92.

Qin L, Li M, Wang YX, Han LX, Huang ZG, Zhao GR (2002) Effects of different cytokinins on leaves *in vitro* regeneration of Fuji 2001 apple variety. *Journal of Fruit Science* 19: 215-218.

Qin YH, Teixeira da Silva JA, Bi JH, Zhang SL, Hu GB (2011) Response of *in vitro* strawberry to antibiotics. *Plant Growth Regulation* 65: 183-93.

Raa J (1968) Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis* *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74: 37-45.

Ragan WH (1926) Nomenclature of the apple: a catalogue index of the known varieties referred to in American publications from 1804 to 1904. *USDA Bur Plant Ind Bull* 56.

Rakusová H, Abbas M, Han H, Song S, Robert HS, Friml J (2016) Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity. *Current Biology* 26: 3026-3032.

Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant physiology* 122: 481-490.

Reid JB, Symons GM, Ross JJ (2004) Regulation of gibberellin and brassinosteroid biosynthesis by genetic, environmental and hormonal factors. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 179-203.

Reigosa MJ, Pazos-Malvido E (2007) Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* 33: 1456-1466.

Reigosa MJ, Souto XC, Gonz L (1999) Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation* 28: 83-88.

Rice EL(1984) *Allelopathy*, Second Edition edition. Academic Press,Inc., Orlando.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* 20: 933-956.

Rieger M (2006) *Introduction to Fruit Crops*. Boca Raton: CRC Press

RimandoAM, Dayan FE, Czarnota MA, Weston LA, Duke SO (1998) A new photosystem II electron transport inhibitor from *Sorghum bicolor*. *Journal of Natural Products* 61: 927-930.

Rizvi SJH, Haque H, Singh VK, Rizvi V (1992) A discipline called allelopathy. In *Allelopathy*. Springer, Dordrecht, pp. 1-10.

Rizvi SJH, Rizvi V (1992) Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: Rizvi SJH, Rizvi V(eds) *Allelopathy: Basics and Applied Aspects*. Chapman and Hall, London pp. 443-472.

Robinson JP, Harris SA, Juniper BE (2001) Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus x domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution* 226: 35-58.

Roudier F, Fedorova E, Lebris M, Lecomte P, Gyorgyey J, Vaubert D, Horvath G, Abad P, Kondorosi A, Kondorosi E (2003) The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiology* 131: 1091-1103.

Rudrappa T, Bonsall J, Gallagher JL, Seliskar DM, Bais HP (2007) Root-secreted allelochemical in the noxious weed *Phragmites australis* deploys a reactive oxygen species response and microtubule assembly disruption to execute rhizotoxicity. *Journal of Chemical Ecology* 33: 1898-1918.

Rueff J, Gaspar J, Laires A (1995) Structural requirements for mutagenicity of flavonoids upon nitrosation. A structureactivity study. *Mutagenesis* 10: 325-328.

Rugini E, Mariotti D (1990) *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes and rooting in woody species. *In Vitro Culture*, XXIII IHC 300: 301-308.

Rugini E, Muganu M (1998) A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple (*Malus x domestica* Borkh.) cv. Golden Delicious. *Plant Cell Reports* 17: 581-585.

Rui-Lin N, Tanaka T, Zhou J, Tanaka O (1982) Phlorizin and trilobatin, sweetdihydrochalcone-glucosides from leaves of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Rehd.(Fagaceae). *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 1933-1934.

Ryder MH, Tate ME, Kerr A (1985) Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. *Plant Physiology* 77: 215-221.

Sanchez-Moreiras AM, De La Pena TC, Reigosa MJ (2008) The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry* 69: 2172-2179.

Sánchez-Rabaneda F, Jauregui O, Lamuela-Raventós RM, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2004) Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 553-563.

Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau JF (1999) Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 4847-4853.

Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Düchtig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M (2005) MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. FEBS letters 579: 5399-5406.

Sauerbeck D, Nonnen S, Allard JL (1981) Consumption and turnover of photosynthesis in the rhizosphere depending on plant species and growth conditions. Landw. Forschung Sonderheft 37: 207-216.

Sauter M, Kende H (1992) Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. Planta 188: 362-368 74.

Sauter M, Mekhedov SL, Kende H (1995) Gibberellin promotes histone H1 kinase activity and the expression of *cdc2* and cyclin genes during the induction of rapid growth in deepwater rice internodes. Plant Journal 7: 623-632.

Savory BM (1966) Studies on the occurrence and aetiology of specific replant diseases of perennial fruit crops. Ph.D. thesis. University of London, London

Saxena VK, Nigam SS, Singh RB (1976) Glycosidic principles from the leaves of *Flemingia strobilifera*. Planta Medica 29: 94-97.

Schell J, Van Montagu M, De Beuckeleer M, De Block M, Depicker A, De Wilde M, Engler C, Genetello J, Hernalsteens M, Holsters J, Silva F, Seurinck J, Van Villet R, Villarroel R (1979). Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. Proceedings of the Royal Society London B 204: 251-266.

Schieber A, Keller P, Carle R (2001) Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 910: 265-273.

Schröder G, Waffenschmidt S, Weiler EW, Schroder J (1984) The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *European Journal of Biochemistry* 138: 387-39.

Segura-Aguilar J, Hakman I, Rydstrom J (1992) The effect of 5OH-1,4-naphtoquinone on Norway spruce seeds during germination. *Plant Physiology* 100: 1955-1961.

Semenova GA (2004) Structural reorganization of thylakoid systems in response to heat treatment. *Photosynthetica* 42: 521-527.

Seong ES, Song KJ (2008) Factors affecting the early gene transfer step in the development of transgenic 'Fuji' apple plants. *Plant Growth Regulation* 54: 89-95.

Seong ES, Song KJ, Jegal S, Yu CY, Chung IM (2005) Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine effect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Regulation* 45: 75-82.

Shahidi F, Naczki M (1995) *Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster PA: Technomic Publishing Company Inc.

Sharma M, Modgil M, Sharma DR (2000) Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. *Indian Journal of Experimental Biology* 38: 1236--1240.

Shen WH, Petit A, Guern J, Tempé J (1988) Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 3417-3421.

Shkryl YN, Veremeichik GN, Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN (2007) Individual and combined effects of the rolA, B and C genes on

anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. Biotechnology and Bioengineering.

Shkryl YN, Veremeichik GN, Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Fedoreyev S A, Zhuravlev YN (2008) Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. Biotechnology and bioengineering 100: 118-125.

Sikorska MA, Matlawska IR, Glowniak KA, Zgorzka GR (2000) Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Asclepias syriaca* L. Acta Poloniae Pharmaceutica 57: 69-72.

Silva TER, Cidade LC, Alvim FC, Cascardo JCM, Costa MGC (2009) Studies on genetic transformation of *Theobroma cacao* L.: evaluation of different polyamines and antibiotics on somatic embryogenesis and the efficiency of *uidA* gene transfer by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 99: 287-298.

Simonovska B, Vovk I, Andrenšek S, Valentová K, Ulrichová J (2003) Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. Journal of Chromatography A 1016: 89-98.

Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K (2008) Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. Phytochemistry Reviews 7: 467-477.

Soares MC, Taciana Ribeiro É, Kuskoski EM, Valdemiro Gonzaga L, Lima A, Mancini Filho J, Fett R (2008) Composition of phenolic acids content in apple (*Malus* sp) pomace. Semina: Ciências Agrárias 29.

Soltys D, Rudzinska–Langwald A, Kurek W, Gniazdowska A, Sliwinska E, Bogatek R. (2011): Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. Planta 234: 609-621.

Spena A, Schmulling T, Koncz C, Schell J (1987) Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* in stimulating abnormal growth in plants. European Molecular Biology Organization Journal 6: 3891-3899.

Sriskandarajah S, Skirvin RM, Abu-Quaoud H, Korban SS (1990) Factors involved in shoot elongation and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*. Journal of Horticultural Science 65:113-121.

Sriskandarajah S, Goodwin PB, Speirs J (1994) Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 36: 317-329.

Srivastava A, Juttner F, Strasser RJ (1998) Action of the allelochemical fischerellin A on photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta 1998 1364: 326-336.

Stals H Inzé D (2001) When plant cells decide to divide. Trends in Plant Science 6: 359-364.

Su YH, Liu YB, Zhang XS (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. Molecular plant 4: 616-625.

Sutter EG, Luza J (1993) Development Anatomy of Roots Induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* 'M. 26' shoots grown *In vitro*. International Journal of Plant Sciences 154: 59-67.

Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones DGJ, Taylor GC, Schachtman PD, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennet JM (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. Nature Cell Biology 10: 946.

Swarup R, Bennett M (2003) Auxin transport: The fountain of life in plants? *Developmental Cell* 5: 824-826.

Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GT, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant Cell* 19: 2186-2196.

Szankowski I, Briviba K, Fleschhut J, Schönherr J, Jacobsen HJ, Kiesecker H (2003) Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Reports* 2003 22: 141-9.

Szankowski I, Lübke A, Jacobsen HJ (2000) Influence of sonication on regeneration and transformation efficiencies in apple. In IV International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding 560 pp. 505-508.

Tada H, Shimomura K, Ishimaru K (1995) Polyacetylenes in *Platycodon grandiflorum* hairy root and Campanulaceous Plants. *Journal of Plant Physiology*, 145: 7-10.

Takahashi L, Sert MA, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (1998) Effects of rutin and quercetin on mitochondrial metabolism and on ATP levels in germinating tissues of *Glycine max*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 495-501.

Tanaka N, Yamakawa M, Yamashita I (1998) Characterization of transcription of genes involved in hairy root induction on pRi1724 core-T-DNA in two *Ajuga reptans* hairy root lines. *Plant Science* 137: 95-105.

Taneja J, Jaggi M, Wankhede DP, Sinha AK (2010) Effect of loss of T-DNA genes on MIA biosynthetic pathway gene regulation and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Reports* 29: 1119-1129.

Tang CS (1986) Continuous trapping techniques for the study of allelochemicals from higher plants. In: Putnam AR, Tang CS (eds) *The Science of Allelopathy*, Wiley, New York. pp. 113-131.

Tang H, Ren Z, Krczal G (2000) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19: 881-887.

Taylor BH, Amasino RM, White FF, Nester EW, Gordon MP (1985) T-DNA analysis of plants regenerated from hairy root tumors. *Molecular and General Genetics* 201: 554-557.

Taylor JB, Wallace BD (1970) Root canker in stone fruit caused by the fungus *Peniophora sacrata*. *Orchardist of New Zeland* 434: 263-265.

Taylor LP, Grotewold E (2005) Flavonoids as developmental regulators. *Current opinion in plant biology* 8: 317-323.

Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 847-859.

Tepfer D (1983) The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In: Pühler, A. (ed.) *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 248-258.

Tepfer M, Casse-Delbart F (1987) *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Sciences* 4: 24-28.

Tereso S, Miguel C, Maroco J, Oliveira MM (2006) Susceptibility of embryogenic and organogenic tissues of maritime pine (*Pinus pinaster*) to antibiotics used in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 33-40.

Terra WR, Ferreira C, Jordao BP, Dillon RJ (1996) Digestive enzymes. In Biology of the insect midgut. Springer, Dordrecht. pp. 153-194

Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verriès C, Cheynier V, Romieu C (2009) Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiology* 49: 1028-1041.

Theiler-Hedtrich C, Theiler-Hedtrich R (1990) Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. *Acta Horticulturae* 280: 195-199.

Thorpe TA (1980) Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. *International review of cytology - Supplement* 11A: 71-111.

Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC (2007) Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports* 26: 199-210.

Torres A, Oliva RM, Castellano D, Cross P (1996) First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future., SAI (University of Cadiz). Spain, Cadiz. pp. 278.

Treutter D (2001) Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* 34: 71-89.

Treutter D (2001) Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* 34: 71-89.

Trovato M, Maras B, Linhares F, Costantino P (2001) The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 13449-13453.

Turner A, Chen SN, Joike MK, Pendland SL, Pauli GF, Farnsworth NR (2005) Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: a new antiadherence assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8940-8947.

Tykarska T, Gulewicz K, Zobel A, Augustynowicz J, Zurowska K, Kuras M (2003) Structural and ultrastructural study of *Capsicum annuum* leaves after treatment with *Uncaria tomentosa* bark extracts. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72: 195-205.

Uddin MR, Park SU, Dayan FE, Pyon JY (2014) Herbicidal activity of formulated sorgoleone, a natural product of sorghum root exudate. *Pest Management Science* 70: 252-257.

Umeda M, Umeda-Hara C, Yamaguchi M, Hashimoto J, Uchimiya H (1999) Differential expression of genes for cyclin dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiology* 119: 31-40.

Uozumi N (2004) Large-scale production of hairy root. In: *Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan II*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 75-103.

Uren NC (2000) Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil- Plant Interface*. Eds. R Pinton, Z Varanini and P Nannipieri. Marcel Dekker, Inc, New York. pp. 19-40.

Uzunova AN, Popova LP (2000) Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* 38: 243-250.

Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Sheltz M, Vlasseraers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R (2001) Intensive insulin therapy in critically ill patients. *The New England Journal of Medicine* 345: 1359–1367.

Van der Werf A, Kooijan A, Welschen R, Lambers H (1988) Respiratory energy costs for the main tenance of biomass, for growth and for ion uptake in roots of *Carex diandra* and *Carex acutiformis*. *Physiologia Plantarum* 72: 483-491.

Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PC, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G (2010) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 6: 1-10.

Van Nieuwkerk JP, Zimmerman RH, Fordham I (1986) Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience* 21:516-518.

Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze' P, Rombauts S, Inze' D (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 903–916.

Veberic R, Trobec M, Herbinger K, Hofer M, Grill D, Stampar F (2005) Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1687-1694.

Veena V, Taylor CG (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*43: 383-403.

Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova, V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchiatti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P,

Lespinasse Y, Allan, A C, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* borkh.). Nature Genetics 42: 833-839.

Vick H, Diedrich DF, Baumann K (1973) Reevaluation of renal tubular glucose transport inhibition by phlorizin analogs. American Journal of Physiology-Legacy Content, 224: 552-557.

Vilaine F, Charbonnier C, Casse-Delbart F (1987) Further insight concerning the TL region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4: transfer of a 1.9 kbp fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments. Molecular and General Genetics 210: 111-115.

Vilaine F, Rembur J, Chriqui D, Tepfer M (1998) Modified development in transgenic tobacco plants expressing a *rolA::GUS* translation fusion and subcellular localization of the fusion protein. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 855-859.

Vinterhalter B, Ninković S, Cingel A, Vinterhalter D (2006) Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. Biologia Plantarum 50: 767-770.

Vinterhalter D, Vinterhalter B (1996) Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljka. Axial, Beograd pp. 131.

Viršček-Marn M, Bohanec B, Javornik B (1999) Adventitious shoot regeneration from apple leaves: Optimisation of the protocol and assessment of genetic variation among regenerants. Phytion (Horn) 39: 61-70.

von Mering J (1886) Ueber kunstlichen Diabetes. Centralbl Med Wiss xxii: 531.

Wallin A, Johansson L (1990) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *in vitro* cultured shoots of a columnar apple. *Journal of Plant Physiology* 135: 565-570.

Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P (1984) Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462

Wang M, Wu C, Cheng Z, Meng H (2015) Growth and physiological changes in continuously cropped eggplant (*Solanum melongena* L.) upon relay intercropping with garlic (*Allium sativum* L.). *Frontiers in Plant Science* 6: 262.

Wang QQ, Hu YL, Zhou H, Zhan X, Mao ZQ, Zhu SH (2012) Effects of phloridzin on the tri-carboxylic acid cycle enzymes of roots of *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Agricultura Sinica*, 45: 3108-3114.

Ward SP, Leyser O (2004) Shoot branching. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 73-78.

Warzecha H, Obitz P, Stöckigt J (1999) Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O- β -D-glucosidase from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry* 50: 1099-1109.

Washida D, Shimomura K, Nakajima Y, Takido M, Kitanaka S (1998) Ginsenosides in hairy roots of a panax hybrid1. *Phytochemistry* 49: 2331-2335.

Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U (2006) Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *The Plant Cell*, 18: 1617-1629.

Webster CA, OP Jones (1991) Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 66: 1-6.

Wescott SWIII, Beer SV, Israel HW (1987) Interactions between actinomycete-like organisms and young apple roots grown in soil conducive to apple replant disease. *Phytopathology* 77: 1071-1077.

White FF, Garfinkel DJ, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1983) Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of infected plants. *Nature* 301: 348-350.

White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 164: 33-44.

Wightman F, Lighty DL (1982) Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiologia Plantarum* 55: 17-24.

Wilhelmová N, Kutík J (1995) Influence of exogenously applied 6-benzylaminopurine on the structure of chloroplasts and arrangement of their membranes. *Photosynthetica* 31: 559-570.

Williams CA, Grayer RJ (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports* 21: 539-573.

Willis RJ (2000) *Juglans* spp., juglone and allelopathy. *Allelopathy Journal* 7: 1-55.

Wittenmayer L, Szabó K (2000) The role of root exudates in specific apple (*Malus x domestica* Borkh.) replant disease (SARD). *Journal Plant Nutrition Soil Science* 163: 399-404.

Wu H, Haig T, Pratley J, Lemerle D, An M (2000) Allelochemical in wheat (*Triticum aestivum* L.): variation of phenolic acid in root tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5321-5325.

Wu H, Haig T, Pratley J, Lemerle D, An M (2001) Allelochemical in wheat (*Triticum aestivum* L.): variation of phenolic acids I shoot tissues. *Journal of Chemical Ecology* 27: 125-135.

Wu J, Wang Y, Zhang LX, Zhang XZ, Kong J, Lu J, Han ZH (2012) High-efficiency regeneration of *Agrobacterium rhizogenes* – induced hairy root in apple rootstock *Malus baccata* (L.) Borkh. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 183-189.

Yamashita H, Daimon H, Akkasaka-Kennedy N, Masuda T (2004) Plant regeneration from hairy roots of apple rootstock *Malus prunifolia* Borkh. Var. ringo Asami, Strain Nugano No.1, transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of the Japanese Society of the Horticultural Science* 73: 505-510.

Yancheva SD, Golubowicz S, Fisher E, Lev-Yadun S, Flaishman MA (2003) Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Science* 165: 299-309.

Yang ZB, Geng X, He C, Zhang F, Wang R, Horst WJ, Ding Z (2014) TAA1-regulated local auxin biosynthesis in the root-apex transition zone mediates the aluminum-induced inhibition of root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26: 2889-2904.

Yao S, Merwin IA, Abawi GS, Thies JE (2006) Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 587-599.

Yepes LM, Aldwinckle HS (1994) Factors that affect leaf regeneration in apple and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37: 257-69.

Yin C, Duan YN, Xiang L, Wang G, Zhang X, Shen X, Zhang M, Mao Z (2018) Effects of phloridzin, phloretin and benzoic acid at the concentrations measured in soil on the root proteome of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Scientia Horticulturae* 228: 10-17.

Yin C, Xiang L, Wang G, Wang Y, Shen X, Chen X, Mao Z (2016) How to plant apple trees to reduce replant disease in apple orchard: a study on the phenolic acid of the replanted apple orchard. *PloS one*, 11 e0167347.

Yu JQ, Matsui Y (1997) Effect of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on up take by cucumber seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 23: 817-827.

Yu JQ, Ye SF, Zhang MF, Hu WH (2003) Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:129-139.

Zeng RS, Luo SM, Shi YH (2001) Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid on higher plants. *Agronomy Journal* 93: 72-79.

Zeng RS, Mallik AU, Luo SM (2008) *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Science, New York, USA.

Zhang JH, Mao ZQ, Wang LQ, Shu HR (2007b) Bioassay and identification of root exudates of three fruit tree species. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 257-261.

Zhang XZ, Zhao YB, Li CM, Chen DM, Wang GP, Chang RF, Shu HR (2007a) Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). *Journal of Plant Physiology* 64: 574-580.

Zhang Y, Gu M, Shi K, Zhou YH, Yu JQ (2010) Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle-related genes in cucumber radicles. *Plant Soil* 327: 455-463.

Zhang Z, Jing S, Wang G, Fang H, Wu L (1997) Genetic transformation of the commercial apple cultivars New Jonagold and regeneration of its transgenic plants. *Acta Horticulturae Sinica*. 24: 378-80.

Zhao Y (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants, *Molecular Plant* 5: 334-338.

Zheng W, Wang SY (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 49: 5165-5170.

Zhou YH, Yu JQ (2006) Allelochemicals and photosynthesis. In: *Allelopathy* Springer, Dordrecht pp. 127-139.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mariana J. Stanišić je rođena 29. avgusta 1978. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 1997/1998. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Redovne studije je završila 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,74. U toku studija dobitnik je jednokratne stipendije vlade Kraljevine Norveške za najbolje studente Republike Srbije pod nazivom "Za generaciju koja obećava". Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2011/2012. godine na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Od novembra 2012. godine Mariana Stanišić je zaposlena kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik je izabrana u aprilu 2013. godine.

U toku svog naučno-istraživačkog rada Mariana J. Stanišić je učestvovala u realizaciji nacionalnog projekta "Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste" Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 173015, pod rukovodstvom dr Branke Vinterhalter, kao i međunarodnog SCOPES projekta "*Circadian regulation of phototropism in Arabidopsis and potato*" NO 152221, pod rukovodstvom dr Dragana Vinterhaltera koji je realizovan u saradnji sa Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Switzerland.

Mariana J. Stanišić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Federacije evropskih udruženja za biologiju biljaka (The Federation of European Societies of Plant Biology – FESPB). Dobitnik je nagrade za najbolju poster prezentaciju na simpozijumu međunarodnog značaja "3rd International Conference on Plant Biology, 22nd SPPS Meeting" u junu 2018. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Мариана Станишић

Број индекса Б3018, 2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Алелопатски потенцијал секундарних метаболита трансформисаних коренова
јабуче – ефекат флоретина и флоризина у култури *in vitro*

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

Потпис аутора

У Београду, 13.11.2018.

Мариана Станишић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мариана Станишић

Број индекса Б3018, 2011

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада Алелопатски потенцијал секундарних метаболита
трансформисаних коренова јабуке – ефекат флоретина и
флоризина у култури *in vitro*

Ментор др Невена Бањац

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 13.11.2018.

Мариана Станишић

Изјава о коришћењу

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

Алелопатски потенцијал секундарних метаболита трансформисаних коренова јабуке – ефекат флоретина и флоризина у култури *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 13.11.2018.

Мариана Аврамовић

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 прерада.** 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 прерада.** 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.