

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Martin Z. Raspor

**FIZIOLOŠKI I MORFOLOŠKI EFEKTI
EKSPRESIJE *AtCKX* GENA U
TRANSFORMISANIM BILJKAMA
KROMPIRA (*Solanum tuberosum* L.)
GAJENIM *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Martin Z. Raspor

**PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL
EFFECTS OF EXPRESSION OF *AtCKX*
GENES IN TRANSFORMED POTATO
(*Solanum tuberosum* L.) PLANTS GROWN
*in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentori:

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

Docent dr Ivana Dragičević
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Član komisije:

Naučni savetnik dr Branka Vinterhalter
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Datum odbrane: _____

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

Svom mentoru **dr Slavici Ninković** zahvalan sam što me je uvela u oblast genetičkog inženjerstva biljaka, u kojoj su mi njena stručna pomoć i saveti bili veoma dragoceni u svim fazama izrade ove disertacije. Njena smirenost i pozitivan stav u svim prilikama i situacijama stvarali su prijatnu i pozitivnu atmosferu za rad, kakva nije suđena mnogim drugim doktorantima.

Veliko hvala **dr Ivani Dragičević** na svemu što me je naučila o radu u kulturi biljaka, kao i o hormonalnoj regulaciji rasteanja i razvića biljaka. Izuzetno sam joj zahvalan na neprocenjivoj stručnoj pomoći i savetima tokom svih faza izrade ove disertacije.

Dr Branki Vinterhalter veliko hvala na korisnim sugestijama i pomoći prilikom pisanja ove disertacije. Kao šefu, zahvalan sam joj što mi je pružila priliku da učestvujem u istraživanjima u okviru projekta čiji je rukovodilac i što mi je pružala podršku i razumevanje u situacijama kada mi je to bilo potrebno. Njoj sam, kao i **dr Draganu Vinterhalteru**, zahvalan i što su me na vreme uključili u istraživanja čije mi je brzo i pravovremeno publikovanje omogućilo da budem izabran u zvanje istraživač saradnik, kao i da zadržim radno mesto u kritičnom trenutku kada su sva moja ostala istraživanja ostala nepublikovana.

Deo istraživanja ove disertacije koji se tiče analize endogenih biljnih hormona urađen je u Laboratoriji za hormonalnu regulaciju kod biljaka Instituta za eksperimentalnu botaniku Češke akademije nauka u Pragu. Ovu saradnju je omogućio **dr Václav Motyka** i na tome sam mu izuzetno zahvalan, kao i na dragocenoj pomoći prilikom analize i publikovanja dobijenih rezultata.

Bakterije *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-AtCKX1 i -AtCKX2 za potrebe ovog rada ustupili su **dr Thomas Schmülling** i **dr Tomáš Werner** sa Slobodnog univerziteta u Berlinu (Freie Universität Berlin), Nemačka i na tome im najlepše zahvaljujem.

Veliko hvala **dr Snežani Zdravković-Korać**, koja me je naučila metodologiji Southern analize i pružila mi dragocenu pomoć u ovoj analizi, kao i tumačenju i publikovanju rezultata iz ovog dela mog rada.

Hvala i **Tatjani Ćosić**, mojoj najbližoj (i najdražoj) saradnici koja mi je pomogla oko izolacije DNK za PCR i Southern analize.

Veliko hvala **dr Ani Simonović**, koja me je naučila tehnikama izolacije RNK i qPCR analize, i pružila mi dragocenu pomoć u analizi ekspresije transgena i tumačenju i publikovanju rezultata iz ovog dela mog rada.

Hvala i **dr Milani Trifunović** koja mi je pomogla oko izolacije RNK i qPCR analize. Zajednički rad sa njom je bio izuzetno zadovoljstvo i pamtiću ga kao najprijatniji period izrade ove disertacije!

Hvala **dr Jeleni Nestorov** sa Odeljenja za biohemiju IBISS, koja mi je pružila potrebna uputstva i pomogla mi oko prečišćavanja izolata RNK DNKazom.

Veliko hvala **dr Jeleni Savić, Jeleni Milojević i Milici Bogdanović** na pomoći oko statističke analize dobijenih rezultata.

Veliko hvala **dr Aleksandru Cingelu** na pomoći oko grafičke obrade slika u ovoj disertaciji, kao i u pomoći u rešavanju brojnih praktičnih problema u svakodnevnom radu u laboratoriji.

Hvala **Jevremu Živanoviću**, profesoru srpskog jezika i književnosti, na lekturi ove disertacije.

Nadi Ćosić, Nabilu Ghalawenji, dr Danijeli Mišić, dr Snežani Milošević, dr Branki Uzelac i Tijani Banjanac, zatim **dr Jeleni Bogdanović-Pristov i dr Aleksandri Mitrović** sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja, **Miloradu Vujičiću** sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i svim već pomenutim kolegamicama i kolegama, od srca hvala na kolegijalnoj i drugarskoj pomoći kad god mi je bila potrebna.

Dr Radomirki Nikolić, dr Mariji Petrić, Vojinu Tadiću, dr Angelini Subotić, Dragani Antoniće, Aleksandru Alempijeviću i Milošu Stajiću, kao i mnogim već pomenutim kolegamicama i kolegama, hvala na podršci, druženju i vedrini kojom su obojili period izrade moje doktorske disertacije.

Na kraju, želim da se zahvalim i svima onima koji ni na koji način nisu učestvovali u izradi mog doktorata. Odsustvo odmaganja je najdragocenija pomoć koju sam od mnogih mogao očekivati.

**Fiziološki i morfološki efekti ekspresije *AtCKX* gena u transformisanim
biljkama krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenim *in vitro***

REZIME

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je po značaju četvrta poljoprivredna kultura na svetu gajena za potrebe ljudske ishrane. Ekonomski značaj krompira potiče od krtola, jestivih podzemnih modifikacija bočnih izdanaka koji omogućavaju nakupljanje rezervi skroba. Brojna istraživanja potvrdila su da biljni hormoni citokinini igraju značajnu ulogu u kontroli tuberizacije. Citokinin oksidaza/dehidrogenaza (CKX) je ključni enzim katabolizma citokinina kod biljaka, a transgene biljke koje eksprimiraju gene za ovaj enzim predstavljaju dragocen model sistem za izučavanje citokininske homeostaze. Krompir (sorta "Désirée") transformisan je genima *AtCKX1* i *AtCKX2* poreklom iz *Arabidopsis thaliana* u cilju utvrđivanja efekata promenjene citokininske homeostaze na morfološke i fiziološke parametre transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*, a naročito na proces tuberizacije. Dobijene su dve *AtCKX1* i tri *AtCKX2* linije sa visokim nivoom ekspresije transgena, odnosno aktivosti CKX u proteinskim ekstraktima izdanaka i korenova. Ekspresija gena *AtCKX1* i *AtCKX2* dovela je do značajnih promena u hormonskoj homeostazi transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*, ali ne i do snižavanja nivoa ukupnih endogenih citokinina. Umesto toga, kod većine transformisanih linija dolazi do značajnog sniženja nivoa bioaktivnih citokinina – slobodnih baza i ribozida, kao i citokininskih nukleotida. Pored toga, značajno je promenjen i nivo endogene indol-sirćetne kiseline (IAA). Izmenjena hormonska homeostaza odražava se na morfologiju biljaka, kao i na procese vezane za tuberizaciju, pa kod pojedinih transformisanih linija dolazi do izmena u regulaciji tuberizacije *in vitro*, kako u uslovima dugog dana, tako i u

kontinuiranom mraku. Kod tri od pet transformisanih linija došlo je do prevazilaženja inhibitornog uticaja svetlosti na indukciju krtola, pa su se krtole pojavile već u toku prvih 30 dana pri uslovima dugog dana, što se nikada ne događa kod kontrolnih biljaka ove sorte krompira. Transformisane *AtCKX* biljke formirale su u proseku manji broj krtola po izdanku nego kontrolne biljke, što ukazuje na smanjenu inicijaciju krtola kod biljaka sa sniženim nivoima bioaktivnih citokinina, a može biti posledica povećanog odnosa između endogene IAA i bioaktivnih citokinina. Efekat na inicijaciju krtola je mnogo izraženiji u uslovima kontinuiranog mraka, nego dugog dana. Prečnik i masa krtola kod većine transformisanih linija se nisu značajno razlikovali od vrednosti kod kontrolnih biljaka. Samo jedna od pet transformisanih linija, *AtCKX1-36a* imala je u uslovima dugog dana krtole manjeg prečnika i mase. Citokinini različito utiču na pojedine faze u procesu tuberizacije kod krompira. Sniženje nivoa bioaktivnih citokinina dovodi do ranije indukcije krtola kod *AtCKX* biljaka, ali ovaj efekat nije ujedno praćen stimulatornim efektima na inicijaciju i uvećavanje krtola. Potrebna su dalja istraživanja transgenih biljaka koje bi ekspimirale kako kataboličke (*AtCKX*) tako i gene biosinteze citokinina (*ipt*), kako bismo identifikovali regulatorne mehanizme pomoću kojih citokinini utiču na različite faze procesa tuberizacije kako u indukujućim, tako i u neindukujućim uslovima.

Ključne reči: bioaktivni citokinini, citokinin oksidaza/dehidrogenaza (CKX), genetička transformacija, genetičko inženjerstvo, *in vitro*, krompir (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée), transgen, tuberizacija.

Naučna oblast: Biologija.

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka.

UDK broj: 577.21:581.1(043.3)

Physiological and morphological effects of expression of *AtCKX* genes in transformed potato (*Solanum tuberosum* L.) plants grown *in vitro*

ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the world's fourth most important food crop. Its economical importance arises from its potential to develop tubers, edible storage organs derived from modified underground lateral shoots, which accumulate starch. Extensive research has provided evidence that plant hormones cytokinins have an important role in control of tuberization. Cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) is the key enzyme of cytokinin catabolism in plants, thus transgenic plants expressing CKX genes have provided a valuable model system for the research of cytokinin homeostasis. Potato (cv. "Désirée") plants have been transformed with *AtCKX1* and *AtCKX2* genes from *Arabidopsis thaliana*, in order to determine the effects of altered cytokinin homeostasis on the morphological and physiological features of the transformed potato plants grown *in vitro*, with particular emphasis on the tuberization process. A high level of transgene expression and/or CKX activity in shoots and roots have been confirmed in two *AtCKX1* and three *AtCKX2* lines. The expression of *AtCKX* genes has reflected on significant changes in the hormonal homeostasis of the transformed potato plants grown *in vitro*, but did not lead to the decrease of total endogenous cytokinin levels. However in the majority of the *AtCKX* lines, the levels of bioactive cytokinins (nucleobases and ribosides), as well as cytokinin nucleotides, were significantly decreased. In addition, the level of endogenous indole-3-acetic acid (IAA) was also significantly changed. The altered hormonal homeostasis reflected on the morphological level, including the tuberization process. Tuberization was altered in *AtCKX* potato lines both in long-day

conditions, and in continuous darkness. In three of the five *AtCKX* lines, the overcoming of the inhibitory effect of light on tuber induction has been observed. In these lines, tubers appeared already during the first 30 days in long-day conditions, which has never been observed in control plants of this potato cultivar. The *AtCKX* plants developed less tubers per shoot in comparison to control plants, indicating decreased tuber initiation in plants with lower endogenous levels of bioactive cytokinins. It is possible that this was a consequence of the increased ratio of IAA vs. bioactive cytokinins. The effect on tuber initiation was more pronounced in continuous darkness, than in long-day conditions. Tuber diameter and mass did not significantly differ from control values in the majority of transformed *AtCKX* lines. Only one of the five transformed lines, *AtCKX1-36a* developed tubers of smaller diameter and mass. Cytokinins have different effects on particular steps in the tuberization process in potato. Lower bioactive cytokinin levels lead to early tuber induction in *AtCKX* plants, but this effect is not followed by enhanced tuber initiation and growth. Further research on potato plants that would express either cytokinin catabolism (*AtCKX*) or biosynthesis (*ipt*) transgenes, is required to identify the regulation mechanisms by which cytokinins affect particular steps of the tuberization process in both tuber-inducing and non-inducing conditions.

Keywords: bioactive cytokinins, cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX), genetic transformation, genetic engineering, *in vitro*, potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée), transgene, tuberization.

Scientific field: Biology.

Specific scientific field: Plant physiology.

UDC number: 577.21:581.1(043.3)

SKRAĆENICE

ADP	adenozin difosfat
AMP	adenozin monofosfat
ANOVA	analiza varijanse
AtCKX	citokinin oksidaza/ dehidrogenaza biljke <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenozin trifosfat
BA	<i>N</i> ⁶ -benzil-adenin
BM	osnovna hranljiva podloga za kulturu biljaka <i>in vitro</i>
BSA	eng. " <i>Bovine Serum Albumin</i> " - goveđi serum albumin
cDNK	komplementarni lanac DNK
CIM	hranljiva podloga za indukciju kalusa
CKX	enzim citokinin oksidaza/ dehidrogenaza
CTAB	heksadecil-3-metil-amonijum-bromid
CYP735A	enzimi membranske monooksigenaze
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin 7-glukozid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-glukozid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukozid
<i>cZ9R</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-ribozid
<i>cZ(9)RMP</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
<i>cZ9ROG</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-ribozid <i>O</i> -glukozid
DD	dugi dan (fotoperiod od 16 sati svetlosti i 8 sati mraka)
DHZ	dihidrozeatin
DHZ7G	dihidrozeatin 7-glukozid
DHZ9G	dihidrozeatin 9-glukozid
DHZOG	dihidrozeatin <i>O</i> -glukozid

DHZ9R	dihidrozeatin 9-ribozid
DHZ(9)RMP	dihidrozeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
DHZ9ROG	dihidrozeatin 9-ribozid O-glukozid
DMAPP	dimetilalil difosfat
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamin-tetrasirćetna kiselina
FAD	kofaktor flavin adenin dinukleotid
GA ₃	giberelna kiselina
HMBDP	hidroksimetilbutenil difosfat
(2D)-HPLC	(dvodimenzionalna) tečna hromatografija pod visokim pritiskom
Hyg	antibiotik higromicin B
Hyg+ CIM	podloga za indukciju kalusa koja sadrži higromicin B (50 mg L ⁻¹)
Hyg- CIM	podloga za indukciju kalusa koja ne sadrži higromicin B
Hyg+ SIM	podloga za regeneraciju izdanaka koja sadrži hiromicin B (50 mg L ⁻¹)
Hyg- SIM	podloga za regeneraciju izdanaka koja ne sadrži higromicin B
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
iP	N ⁶ -(Δ ² -izopentenil) adenin
iP7G	N ⁶ -(Δ ² -izopentenil) adenin 7-glukozid
iP9G	N ⁶ -(Δ ² -izopentenil) adenin 9-glukozid
iP9R	N ⁶ -(Δ ² -izopentenil) adenin 9-ribozid
iPRDP	N ⁶ -2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-difosfat
iP(9)RMP	N ⁶ -2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-monofosfat
iPRTP	N ⁶ -2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-trifosfat
IPT	enzim izopentenil transferaza
iRNK	informaciona RNK
KM	kontinuirani mrak
LB	"Luria Bertani Broth" hranljiva podloga za bakterije
LSD	eng. "least significant difference" – najmanja statistički značajna razlika

MAPK	mitogen-aktivirane protein kinaze
MEP	metileritritol fosfat
MS	masena spektrometrija; Murashige & Skoog hranljiva podloga
MVA	mevalonska kiselina
NAA	α -naftalen-sirćetna kiselina
PAMP	molekularni obrasci povezani sa patogenima
PCR eng.	" <i>Polymeraze Chain Reaction</i> " - lančana reakcija polimeraze
PVP	polivinil-pirolidon
q(RT-)PCR	kvantitativni (RT-)PCR
RNK	ribonukleinska kiselina
RT	reverzna transkripcija
SD	standardna devijacija
SG	standardna greška
SIM	hranljiva podloga za regeneraciju izdanaka
TAPS	<i>N</i> -tris(hidroksimetil)metil-3-amino-propan-sulfonat
TBE	tris-boratni-EDTA pufer
T-DNK	deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom
TRIS	tris-hidroksimetil aminometan
tRNK	transportna RNK
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin 7-glukozid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-glukozid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukozid
<i>tZ9R</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-ribozid
<i>tZ(9)RMP</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
<i>tZ9ROG</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-ribozid <i>O</i> -glukozid
<i>tZRDP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribonukleotid difosfat
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribonukleotid monofosfat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	1
1.1.1. Poreklo i taksonomija	4
1.1.2. Genetička i reproduktivna svojstva krompira	6
1.1.3. Kultura izdanaka krompira kao eksperimentalni model sistem u fiziološkim istraživanjima	9
1.2. Proces tuberizacije kod krompira	11
1.2.1. Indukcija krtola	13
1.2.2. Inicijacija krtola	17
1.2.3. Uvećavanje krtola	18
1.3. Genetičko inženjerstvo biljaka	20
1.3.1. Horizontalni transfer gena bakterija roda <i>Agrobacterium</i> u genom biljaka	21
1.3.2. Ekspresioni vektori u genetičkom inženjerstvu	26
1.3.3. Faktori koji mogu ugroziti ekspresiju transgena: pozicioni efekat i utišavanje gena	27
1.4. Citokinini	31
1.4.1. Struktura citokinina	31
1.4.2. Konjugati citokinina	34
1.4.3. Zastupljenost i značaj citokinina	35
1.4.4. Biosinteza citokinina	37
1.4.5. Katabolizam citokinina	39
1.4.6. Regulacija metabolizma citokinina	40
1.4.7. Transport citokinina	41
1.4.8. Recepcija i transdukcija citokininskog signala	42
1.4.9. Interakcija citokininske signalizacije sa signalnim putevima svetlosti	45

1.5. Citokinin oksidaza/dehidrogenaza (CKX)	48
1.5.1. Istraživanja efekata ekspresije transgena CKX na citokininsku homeostazu	49
1.5.2. Regulacija ekspresije gena i enzimske aktivnosti citokinin oksidaze/dehidrogenaze	51
2. CILJ RADA	53
3. MATERIJAL I METODE	54
3.1. Biljni materijal	54
3.1.1. Održavanje kultura izdanaka krompira <i>in vitro</i>	56
3.2. Genetička transformacija krompira	57
3.2.1. Konstrukti korišćeni za genetičku transformaciju	57
3.2.2. Hranljive podloge za rast bakterija	59
3.2.3. Transformacija i regeneracija biljnog materijala	60
3.3. Molekularno biološke metode	63
3.3.1. Izolacija genomske DNK za PCR analizu	63
3.3.2. PCR analiza	64
3.3.3. Elektroforeza i vizuelizacija DNK	66
3.3.4. Analiza po Southern-u	67
3.3.5. Izolacija ukupne RNK	68
3.3.6. Prečišćavanje uzoraka RNK od kontaminacije sa DNK	70
3.3.7. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)	70
3.4. Određivanje enzimske aktivnosti citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX)	74
3.5. Analiza endogenih biljnih hormona	75
3.6. Određivanje morfoloških osobina biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	76

3.7. Statistička obrada podataka i grafičko predstavljanje rezultata	76
4. REZULTATI	78
4.1. Genetička transformacija krompira genima <i>AtCKX1</i> i <i>AtCKX2</i>	78
4.1.1. Indukcija kalusa na isečcima listova inokulisanim bakterijama <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	78
4.1.2. Regeneracija izdanaka iz inokulisanih eksplantata	80
4.1.3. Ožiljavanje regenerisanih izdanaka	81
4.1.4. Provera transformacije PCR analizom	83
4.1.5. Potvrda integracije transgena u genomsku DNK krompira hibridizacijom po Southern-u	84
4.2. Ekspresija transgena u izdancima i korenovima transformisanih biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	87
4.2.1. qRT-PCR analiza	87
4.3. Aktivnost citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX) u izdancima i korenovima <i>AtCKX1</i> i <i>AtCKX2</i> biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	91
4.4. Analiza endogenih biljnih hormona	93
4.4.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	94
4.4.2. Nivoi endogenih citokinina kod <i>AtCKX</i> linija krompira	102
4.4.3. Nivo endogene IAA kod transformisanih linija krompira	106
4.5. Morfološke osobine <i>AtCKX</i> linija krompira gajenih <i>in vitro</i>	109
4.6. Tuberizacija kod <i>AtCKX</i> linija krompira gajenih <i>in vitro</i>	114
4.6.1. Procenat izdanaka sa krtolama	114
4.6.2. Broj krtola po izdanku	118
4.6.3. Prečnik krtola	121
4.6.4. Masa krtola	123

5. DISKUSIJA	125
5.1. Transformacija krompira genima <i>AtCKX1</i> i <i>AtCKX2</i>	126
5.2. Potvrda transformacije i ekspresije transgena	129
5.3. Aktivnost CKX kod <i>AtCKX</i> linija krompira gajenih <i>in vitro</i>	130
5.4. Sadržaj citokinina i IAA kod kontrolnih i transformisanih <i>AtCKX</i> biljaka krompira	132
5.4.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	132
5.4.2. Promene u citokininskoj homeostazi kod <i>AtCKX</i> linija krompira	133
5.4.3. Promena nivoa IAA kod transformisanih <i>AtCKX</i> biljaka krompira	136
5.5. Morfološke osobine <i>AtCKX</i> biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	138
5.6. Tuberizacija kod <i>AtCKX</i> biljaka krompira gajenih <i>in vitro</i>	141
5.6.1. Indukcija krtola <i>in vitro</i> kod <i>AtCKX</i> biljaka krompira	143
5.6.2. Inicijacija krtola kod <i>AtCKX</i> biljaka krompira <i>in vitro</i>	149
5.6.3. Uvećavanje krtola kod <i>AtCKX</i> biljaka krompira <i>in vitro</i>	151
6. ZAKLJUČCI	156
7. LITERATURA	159
BIOGRAFIJA AUTORA	206
Prilog 1 - Izjava o autorstvu	
Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	
Prilog 3 - Izjava o korišćenju	

1. UVOD

1.1. Krompir (*Solanum tuberosum* L.)

"Krompir je u prvim redovima borbe protiv svetske gladi i siromaštva."

Jacques Diouf, generalni direktor FAO 1994-2011

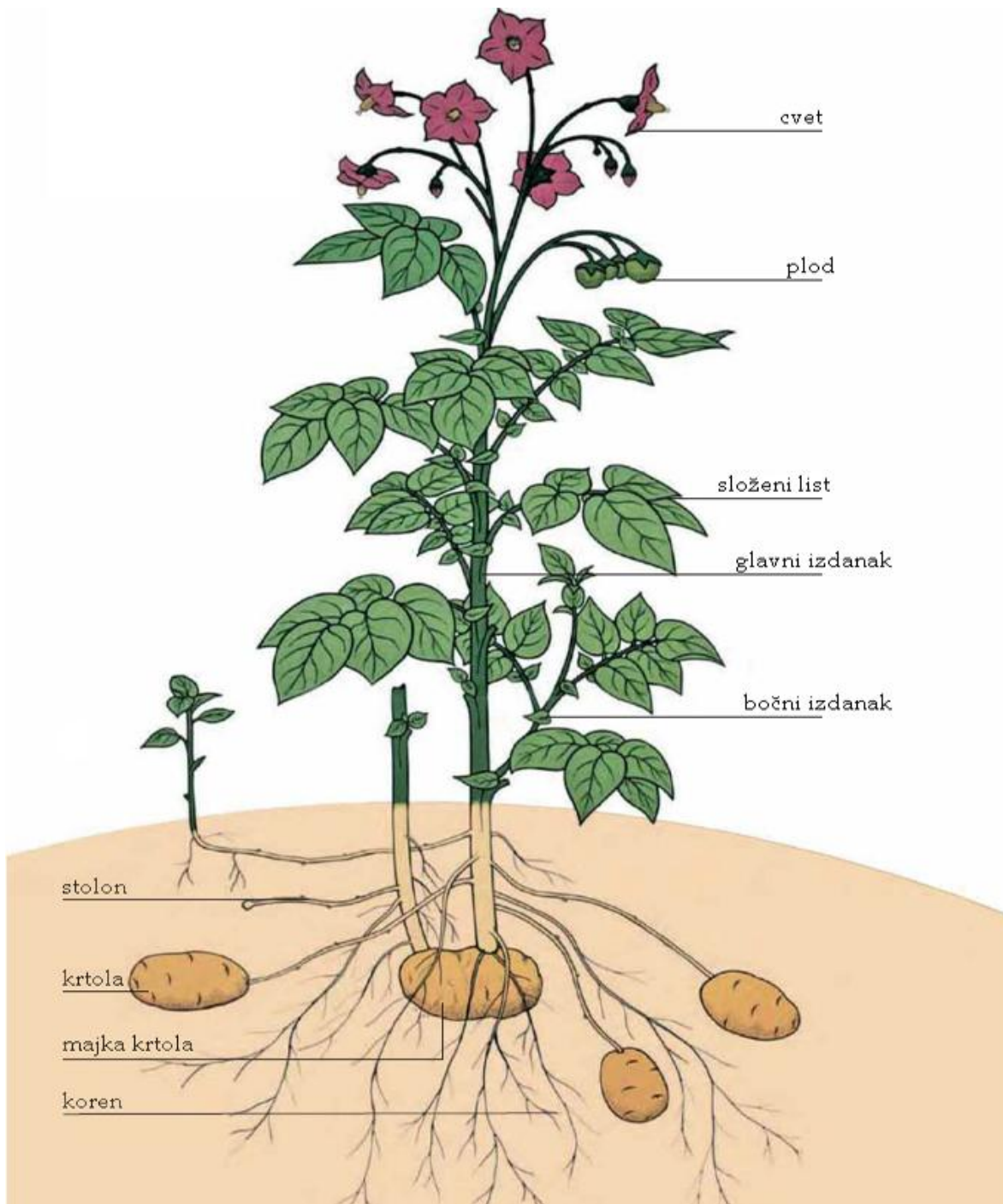
Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je četvrta najznačajnija poljoprivredna kultura na svetu gajena za ljudsku ishranu, posle kukuruza, pirinča i pšenice. U 2011. godini, krompir je gajen na površini od 192500 km² (što je više od 0,1% ukupnog svetskog kopna), dajući prinos od 374 miliona tona. Evropa nosi više od trećine svetske proizvodnje krompira (130 miliona tona prinosa na 61400 km² zasejane površine), koji je njena treća najznačajnija poljoprivredna kultura, posle pšenice i šećerne repe (FAO, 2012). Evropljani su takođe i najveći potrošači krompira – godišnja potrošnja iznosi 88 kg po glavi stanovnika, što je gotovo trostruko više od svetskog proseka (FAO, 2009). U Srbiji, krompir je četvrta ekonomski najznačajnija poljoprivredna kultura, posle kukuruza, šećerne repe i pšenice, a gaji se na površini od 784 km² sa prinosom od oko 890 hiljada tona u 2011. godini (FAO, 2012).

Zahvaljujući brzom rastanju i visokoj nutritivnoj vrednosti, krompir predstavlja značajan izvor hrane, zaposlenosti i prihoda u zemljama u razvoju, gde je proizvodnja krompira više nego udvostručena u poslednjih 25 godina. U Aziji, Africi i Latinskoj Americi povećana je sa manje od 80 miliona tona u 1990. godini, na rekordnih 161,5 miliona tona u 2005. godini, kada je prevazišla obim proizvodnje u razvijenim zemljama (FAO, 2009). Upravo je iz tih razloga razvijanje

strategija za povećanje prinosa krompira od izuzetnog ekonomskog značaja, ali i od strateške važnosti u svetskoj borbi protiv siromaštva i gladi.

Jestivi deo krompira je krtola (lat. *tuber*), koja se u prirodnim uslovima razvija kao zadebljanje podzemnih modifikacija izdanka – stolona (Vreugdenhil i Struik, 1989; Fernie i Willmitzer, 2001; slika 1). Biološka funkcija krtola je vegetativna reprodukcija, odnosno "prezimljavanje" nepovoljnih vremenskih uslova. Kod većine sorti krompira, krtole se razvijaju u odgovor na skraćivanje dana, signal iz spoljašnje sredine koji prethodi dolasku zime i hladnog vremena (Jackson, 2009). U krtoli se nakuplja velika količina skroba, koji služi kao energetska rezerva za mladu biljčicu koja će se razviti klijanjem krtole, po završetku perioda "prezimljavanja", odnosno mirovanja (Rodríguez-Falcón i sar. 2006).

Upravo zahvaljujući visokom sadržaju skroba, krtole krompira imaju izuzetno visoku hranljivu vrednost. Krtola krompira sadrži u proseku 78,5% vode, 16,1% skroba, 2,1% proteina (pre svega patatina) i 2,0% vlakana. Oko 2% od ukupne energije koju prosečan čovek unosi ishranom u svoj organizam potiče iz krompira, a ovaj udeo je u ekonomski razvijenim zemljama čak trostruko viši (Burlingame i sar. 2009). Krompir je značajan u ljudskoj ishrani kao izvor ugljenih hidrata, vlakana, vitamina (B1, B2, B3, B6, C, E i folne kiseline), minerala (kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i fosfora) i antioksidanata kao što su karotenoidi i antioksidativne fenolne kiseline (Brown, 2005; Burlingame i sar. 2009). U krtolama krompira nalaze se i male količine (5-10 mg na 100 g) α -solanina i α -hakonina, toksičnih glukoalkaloida koji imaju antimikrobnu aktivnost (Burlingame i sar. 2009).



Slika 1. Izgled biljke krompira (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). Crtež preuzet iz: FAO (2009).

1.1.1. Poreklo i taksonomija

Krompir je višegodišnja, zeljasta dikotiledona biljka iz porodice Solanaceae u koju se ubrajaju mnoge gajene vrste kao što su duvan (*Nicotiana tabacum*), paprike (*Capsicum spp.*) i petunije (*Petunia spp.*), ali i pojedine otrovne biljke, poput velebilja (*Atropa belladonna*) ili mandragore (*Mandragora officinarum*). Rod *Solanum* osim krompira obuhvata i paradajz (*Solanum lycopersicon*) i patlidžan (*Solanum melongena*), kao i još najmanje 1500 vrsta (Knapp i sar. 2004). Sekciju *Petota* (krompiri) čini 206 vrsta kod kojih postoji sposobnost razvijanja krtola. Svega sedam vrsta se gaji radi ljudske ishrane, dok je divljih vrsta 199. Najveći deo divljih vrsta ima usko rasprostranjenje, ali sve zajedno se prostiru u širokom pojasu od jugozapada Sjedinjenih Američkih Država na jug, preko Centralne Amerike sve do Čilea i severa Argentine. Od sedam gajenih vrsta, *Solanum tuberosum* je rasprostranjena širom sveta, dok se *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja* i *S. stenotomum* uzgajaju na ograničenom području Anda, u Peruu i Boliviji (Spooner i Hijmans, 2001).

Upravo se andska oblast Perua i Bolivije smatra centrom genetičkog diverziteta i prapostojbinom krompira, gde je uzgajanje započelo verovatno još pre 7000 godina (Bradshaw i sar. 2006). Spooner i saradnici (2005) su filogenetskom analizom pokazali jedinstveno poreklo gajenog krompira, a prema tom otkriću sve gajene vrste potiču od diploidne *S. bukasovii*. Domestikacijom *S. bukasovii* nastala je vrsta *S. stenotomum*, a iz nje *S. phureja*, koja se odlikovala bržim klijanjem i većim prinom, te je njen uzgoj proširen na niže nadmorske visine (Bradshaw i sar. 2006). Do danas ne postoji saglasnost oko identiteta diploidnih roditeljskih vrsta koje su dale današnju tetraploidnu *S. tuberosum*; po nekim autorima *S. tuberosum* je nastala ukrštanjem *S. stenotomum* i *S. sparsipilum*, dok drugi pretpostavljaju ukrštanje *S. stenotomum* i *S. phureja* (Carputo i sar. 2003). U svakom slučaju, prvi

gajeni tetraploidni krompir nastao je u Andima na jugu Perua i bio je srodan današnjem andskom krompiru, *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Spooner i Hijmans, 2001; Carputo i sar. 2003; Bradshaw i sar. 2006; Rodríguez i sar. 2010). Ova tetraploidna vrsta ubrzo je potisnula iz uzgoja svoje diploidne prethodnike, zahvaljujući većim prinosima i drugim superiornim genetičkim osobinama, i proširila se po Južnoj Americi. Podalje od ekvatora, na pacifičkoj obali južnog Čilea gde je sezonsko variranje dužine dana izraženije, uzgajivači su ukrštanjem dobili sortu koja je mogla da razvija krtole i pri umereno dužim danima. Tako je nastao čileanski krompir, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, koji se danas gaji širom sveta (Bradshaw i sar. 2006).

U Evropu je krompir donet 1567. godine, a iz Evrope je počev od 17. veka prenošen, uz kolonizaciju, u druge delove sveta. Iako isprva dočekan sa sujeverjem i podozrenjem (smatralo se da je proklet i da donosi nesreću), krompir je počev od 18. veka u Evropi sve šire prihvaćen, zahvaljujući isplativosti gajenja u odnosu na druge useve i visokoj hranljivoj vrednosti (Hawkes i Francisco-Ortega, 1993). Danas se pretpostavlja da je Evropu isprva "osvojio" andski krompir, ali da je u toku 18. i 19. veka postepeno istisnut (ili ukršten sa) čileanskom podvrstom, koja je postala omiljenija kod proizvođača u umerenim podnebljima zbog sposobnosti tuberizacije pri dužim danima (Bradshaw i sar. 2006).

Danas je čileanski krompir (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) važna poljoprivredna kultura gajena širom sveta. Zbog dugog puta koji je prešla iz svoje postojbine, kao i razmnožavanja pretežno vegetativnim putem, ova podvrsta se danas nažalost ne odlikuje visokom genetičkom raznovrsnošću (Spooner i Hijmans, 2001; Bradshaw i sar. 2006). Smatra se da veliki genetički potencijal za osobine kao što je otpornost na bolesti, štetočine i sušu, leži u drugim, kako gajenim tako i divljim vrstama krompira, poput *S. phureja* (Fock i sar. 2000), *S.*

stenotomum (Fock i sar. 2001), *S. demissum* (Carputo i sar. 2003), pa čak i u zapostavljenoj andskoj podvrsti *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Huamán i sar. 2000). U budućnosti će se osobine gajenog krompira, kao što su otpornost na sušu ili štetočine, poboljšavati ukrštanjem sa divljim, ili slabije rasprostranjenim gajenim vrstama krompira, a možda i korišćenjem njihovih gena za stvaranje novih, transgenih sorti krompira (Bradshaw i sar. 2006; Muthoni i sar. 2012).

1.1.2. Genetička i reproduktivna svojstva krompira

Vrste roda *Solanum* izuzetno su varijabilne po pitanju ploidnosti. Osnovni broj hromozoma je 12. Većina divljih vrsta, kao i gajene vrste *S. ajanhuiri*, *S. phureja* i *S. stenotomum* su diploidne ($2n = 2x = 24$), a među divljim vrstama ima i tetraploidnih i heksaploidnih. Dve gajene vrste su triploidne ($2n = 3x = 36$ - *S. chaucha* i *S. juzepczukii*), a jedna, *S. curtilobum*, je pentaploidna ($2n = 5x = 60$) (Muthoni i sar. 2012). Za razliku od divljih alotetraploidnih vrsta krompira, koje se odlikuju dizomičnim nasleđivanjem ($2n = 2x = 48$), *S. tuberosum* je autotetraploid sa tetrazomičnim nasleđivanjem ($2n = 4x = 48$) i može imati četiri različita alela po lokusu, što doprinosi visokom stepenu heterozigotnosti i heterozisa kod ove vrste (Struik i sar. 1997; Bradshaw i sar. 2006; Sleper i Poehlman, 2006; Muthoni i sar. 2012). Tetraploidne vrste krompira, uključujući *S. tuberosum*, kao i heksaploidne, mahom su samooplodne, dok diploidne vrste to nisu. Triploidne i pentaploidne vrste su sterilne (Hawkes, 1990).

Genom krompira je nedavno u većoj meri sekvenciran. Veličine je 844 Mbp, sadrži 39031 kodirajuću sekvencu, i po svemu sudeći je pretrpeo dva duplikaciona događaja, od kojih je noviji doveo do sadašnje tetraploidije (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011).

Za razliku od većine drugih komercijalno gajenih biljnih vrsta, a zahvaljujući mogućnosti tuberizacije, krompir se veoma efikasno razmnožava vegetativnim putem. Osim toga, seksualna reprodukcija je kod krompira izuzetno neefikasna. Kod polena mnogih sorti *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* zabeležen je snižen fertilitet ili čak potpuni sterilitet. Svaka treća sorta krompira uopšte ne razvija plodove, a većina sorti *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* proizvodi značajno manji broj semena u plodu u odnosu na podvrstu *S. tuberosum* subsp. *andigena*, ili druge vrste roda *Solanum*. Zbog toga se gajeni krompir razmnožava gotovo isključivo vegetativnim putem (Muthoni i sar. 2012).

Potreba za dobijanjem biljaka krompira sa komercijalno poželjnim osobinama usmerila je savremenu proizvodnju ka hibridnim sortama, nastalim međusobnim ukrštanjem roditeljskih F_0 linija sa različitim, ali komplementarnim setovima poželjnih osobina. Sorte krompira koje se danas u značajnoj meri uzgajaju predstavljaju takve hibride i odlikuju se visokim stepenom heterozigotnosti (Muthoni i sar. 2012). Primera radi, holandska sorta "Désirée" nastala je ukrštanjem roditeljskih sorti "Urgenta" iz Holandije i "Depesche" iz Nemačke (http://www.europotato.org/display_description.php?variety_name=Desiree) i takođe je visoko heterozigotna (Sharma i sar. 2007).

Uzgajanje hibridnih sorti biljnih vrsta povlači za sobom poteškoću očuvanja poželjnih osobina kroz generacije, ako je prisutna seksualna reprodukcija. Ovakve osobine uglavnom su kodirane multialelnim genskim lokusima koji su kod hibridnih sorti (F_1 generacija) prisutni u heterozigotnom stanju (Grüneberg i sar. 2009). Seksualna reprodukcija unutar hibridne sorte, makar i putem samooplodnje, vodi u F_2 generaciji segregaciji alela prema Mendelovim pravilima, te povećanju varijabilnosti usled kojeg je smanjen procenat jedinki sa poželjnim kombinacijama

osobina. Kod tetraploidnih vrsta kakav je krompir, kod kojeg se neretko javljaju tetraalelni lokusi (lokusi sa sva četiri različita alela), varijabilnost svih lokusa u F₂ generaciji je izuzetno visoka, a segregacija alela u potomstvu praktično nepredvidiva, što izuzetno otežava selekciju genotipova sa poželjnim osobinama (Grüneberg i sar. 2009).

Izuzetna varijabilnost potomstva u F₂ generaciji za osobine kao što su visina izdanka, broj i veličina krtola, potvrđena je nedavno kod biljaka krompira sorte "Désirée" (Sharma i sar. 2007). Istovremeno, daleko manja varijabilnost je pokazana između biljaka dobijenih iz F₁ generacije klonalnom propagacijom (iz krtola), mikropropagacijom ili somatskom embriogenezom *in vitro*.

Kod krompira, klonalno razmnožavanje pomoću krtola omogućilo je efikasno i široko umnožavanje jedinstvenih, visoko heterozigotnih genotipova sa poželjnim osobinama bez potrebe za seksualnom reprodukcijom, čime su poželjne osobine fiksirane u F₁ generaciji (Sleper i Poehlman, 2006; Muthoni i sar. 2012). Rizik od pojave biljaka F₂ generacije izuzetno je nizak, zahvaljujući neefikasnoj seksualnoj reprodukciji krompira (Muthoni i sar. 2012).

Iz identičnih razloga - zahvaljujući mogućnosti efikasnog klonalnog razmnožavanja, a usled prevelike i nepredvidive varijabilnosti u F₂ generaciji, savremena praksa genetičkog inženjerstva krompira podrazumeva istraživanja na transformisanim biljkama u F₁ generaciji, odnosno bez dalje seksualne reprodukcije nakon transformacionog događaja (otuda se ova generacija označava i kao T₀). Tako nastale transgene linije održavaju se klonalno, preko krtola, a transgen se održava u hemizigotnom stanju (Conner, 2007). Kod tetraploidnih sorti, samo jedan od četiri alela je transgen (Aaaa). To je slučaj, između ostalih, sa pojedinim transgenim sortama krompira koje su uspešno plasirane na američko

tržište, kao što su "Russet Burbank NewLeaf™" (Perlak i sar. 1993) i "Russet Burbank NewLeaf™ Plus" (Lawson i sar. 2001).

1.1.3. Kultura izdanaka krompira kao eksperimentalni model sistem u fiziološkim istraživanjima

Ogroman značaj koji krompir ima u svetskoj ekonomiji daje snažan podsticaj za biološka istraživanja kod ove biljne vrste. Prvi uspešan pokušaj uspostavljanja kulture izdanaka krompira opisali su Steward i Caplin (1951). Od tada su, sve do danas, kulture meristema i kulture nodalnih odsečaka krompira *in vitro* opsežno korišćene za brzo i efikasno umnožavanje krompira (Struik i sar. 1997; Donnelly i sar. 2003), uspostavljanje banke gena (Lizarraga i sar. 1989; Fletcher i sar. 1998; Donnelly i sar. 2003) ili eliminaciju virusa (Lozoya-Saldaña i Merlin-Lara, 1984; Lozoya-Saldaña i Madrigal-Vargas, 1985; Lozoya-Saldaña i sar. 1996; Brown i sar. 1988; Fletcher i sar. 1998), ali i kao model sistem u brojnim naučnim istraživanjima širom sveta.

Prednosti kulture biljnih tkiva i organa kao eksperimentalnog model sistema u odnosu na gajenje biljaka *ex vitro*, obuhvataju mogućnost gajenja biljaka u kontrolisanim uslovima, zaštićenost od infekcija i parazita, morfološku, fiziološku i genetičku uniformnost biljnog materijala, kao i njegovu brzu i efikasnu propagaciju. Kultura izdanaka krompira nažalost podrazumeva i suočavanje sa razlikama u odnosu na tradicionalno gajenje krompira u zemljištu, a to su pre svega razlike u uslovima sredine *in vitro* u odnosu na uslove *ex vitro*, kao i odstupanja u svojstvima samih biljaka gajenih *in vitro*, u odnosu na biljke *ex vitro*. Biljke gajene *in vitro* izložene su nižoj osvetljenosti i drugačijem sastavu svetlosnog spektra (Seabrook, 2005), zatim većoj relativnoj vlažnosti vazduha (Tanaka i sar. 1992), kao i slabijoj razmeni gasova usled čega dolazi do nakupljanja etilena u

neposrednoj blizini biljaka (Buddendorf-Joosten i Woltering, 1996). Zbog slabije osvetljenosti, kod biljaka gajenih *in vitro* favorizovan je heterotrofni metabolizam, a odnos između intenziteta heterotrofnog i autotrofnog metabolizma zavisi od tipa šećera prisutnog u hranljivoj podlozi (saharoza ili glukoza) i njegove koncentracije (Wolf i sar. 1998). Razlike u mehaničkim svojstvima hranljive podloge u odnosu na zemljište u kojem biljke rastu *ex vitro*, doprinose promenama u usvajanju vode i minerala iz podloge, što vodi dodatnim promenama u metabolizmu čitave biljke (Gopal i sar. 2008).

U kulturi izdanaka krompira, kao eksplantati se koriste odsecci izdanaka sa jednim nodusom i listom. Izdanak se u novoj supkulturi razvija iz bočnog pupoljka koji se nalazi u pazuhu lista na izolovanom nodusu. Na ovaj način bočni pupoljak iz kojeg će se razviti izdanak, oslobođen je apikalne dominacije i ostalih korelativnih uticaja izdanaka sa kojeg je izolovan nodus. Međutim, izdanak koji se na ovaj način razvija iz bočnog pupoljka ne predstavlja intaktnu biljku zato što se korenov sistem ne razvija na njegovoj bazi, već na roditeljskom nodusu (Pruski, 2007). Osim toga, roditeljski nodus može nastaviti da utiče na fiziologiju izdanaka koji se iz njega razvija. Kada je reč o tuberizaciji, utvrđeno je da dimenzije i sveža masa krtola koje se formiraju na izdanku u kulturi *in vitro*, značajno zavise od prisustva nodalnog lista na roditeljskom nodusu iz kojeg je formiran izdanak krompira (Seabrook i sar. 2004).

Na kraju, fiziološka starost tkiva može značajno uticati na metabolizam izdanaka u kulturi, uključujući i procese kao što su inicijacija i rastenje krtola (Visser i sar. 1994). Pored toga je poznato da je kod biljaka *in vitro* povećana učestalost somaklonalnih varijacija, prouzrokovanih metilacijom DNK i spontanym mutacijama u genomu (Smulders i de Klerk, 2011; Miguel i Marum, 2011; Neelakandan i Wang, 2012). Metilacija DNK nedvosmisleno je dovedena u vezu sa

pojavom somaklonalnih varijacija kod izdanaka krompira gajenih *in vitro* (Joyce i Cassells, 2002). Somaklonalne varijacije naročito su uobičajene kada biljka prolazi kroz faze dediferencijacije i rediferencijacije, koje prate regeneraciju transformanata u većini protokola sa *Agrobacterium tumefaciens* (Potter i Jones, 1991; Smulders i de Klerk, 2011). Sva ova svojstva kulture *in vitro*, pogotovo u svjetlu razlika u odnosu na biljke gajene *ex vitro*, moraju biti uzeta u obzir prilikom bilo kakvog vrednovanja rezultata dobijenih *in vitro*.

1.2. Proces tuberizacije kod krompira

Od svih fizioloških procesa kod krompira, tuberizacija zaokuplja najveću pažnju istraživača, kako zbog komercijalnog značaja, tako i zbog toga što krompir predstavlja jedinstven model sistem za proučavanje ovog procesa koji nije univerzalan u biljnom svetu (Ferne i Willmitzer, 2001). Tuberizacija je složen morfološki i fiziološki proces, i među autorima čija su istraživanja vezana za ovu oblast ne postoji konsenzus po pitanju samog značenja pojma "tuberizacije", pod kojim se uobičajeno intuitivno podrazumeva proces formiranja krtola u užem smislu. Uloga stolona, kao organa čija je fiziološka i morfološka transformacija najčešće neophodna da bi došlo do formiranja krtole, često je zanemarena u ovakvim razmatranjima (Vreugdenhil i Struik, 1989).

Stoloni se, kao i bočni izdanci, razvijaju iz pazušnih pupoljaka u nodusima krompira, a od bočnih izdanaka se razlikuju dijagravitropskim rastenjem, rudimentarnim listovima i smanjenom količinom hlorofila (Kumar i Wareing, 1972). U prirodnim uslovima, odnosno kod krompira gajenog u zemljištu, stoloni se razvijaju na bazalnim nodusima krompira, odnosno pod zemljom, a pravi bočni izdanci iznad zemlje. Međutim, u specijalnim okolnostima (na primer, u kulturi

izdanaka krompira) stoloni se mogu razvijati i iz mlađih, nadzemnih nodusa biljke, pa se smatra da sudbina pazušnog pupoljka (u smislu razvijanja u stolon ili pravi bočni izdanak) nije predeterminisana njegovom pozicijom, već egzogenim ili endogenim sredinskim faktorima (kakvi mogu biti osvetljenost, vlažnost ili apikalna dominacija; Kumar i Wareing, 1972). Pored toga, razlike između stolona i pravih lisnatih bočnih izdanaka nisu uvek oštre, pa je ponekad (naročito kada se biljke gaje *in vitro*) potrebno strogo definisati kriterijume za distinkciju između jednih i drugih. Jedan od pouzdanijih kriterijuma za ovu distinkciju je obrazac rasteња aksilarnog organa, odnosno ugao između pravca rasteња osnovnog izdanka i pravca rasteња aksilarnog organa (Dragičević i sar. 2008).

Prema modelu koji su predložili Vreugdenhil i Struik (1989), proces tuberizacije sastoji se od sledećih faza: (a) indukcija i inicijacija stolona; (b) longitudinalno rasteње stolona - uz mogućnost grananja; (c) prestanak longitudinalnog rasteња i grananja stolona; i (d) indukcija i inicijacija krtola. Ove faze nisu nužno sekvencijalno raspoređene, neke od njih mogu izostati ili se međusobno vremenski preklapati (Vreugdenhil i Struik, 1989). Na primer, moguće je izazvati prestanak longitudinalnog rasteња stolona bez indukcije krtola (Struik i sar. 1989). U prisustvu jakog induktivnog stimulusa, krtola se može formirati na bilo kojem delu izdanka bez prethodnog formiranja stolona, a ako je stimulus izuzetno jak, može se formirati i umesto izdanka, kao sesilna krtola (McGrady i sar. 1986).

U poslednjih dvadeset godina u istraživanjima vezanim za tuberizaciju krompira sve manje pažnje se posvećuje indukciji, inicijaciji i rasteњу stolona, pa su literaturni podaci koji se odnose na ove procese ostali prilično oskudni. Komercijalni značaj krtola diktirao je fokusiranje ogromne većine istraživanja novijeg datuma na kasnije faze tuberizacije, počev od indukcije krtola. Pod

dejstvom specifične kombinacije faktora spoljašnje sredine (uobičajeno označenih kao "indukujući uslovi"), stoloni menjaju obrazac rastenja iz longitudinalnog u radijalni i počinju da nakupljaju velike količine skroba (Vreugdenhil i Struik, 1989; Xu i sar. 1998a; 1998b).

1.2.1. Indukcija krtola

Pod uticajem indukujućih uslova spoljašnje sredine dolazi do geneze sistemskog induktivnog signala koji deluje na nivou cele biljke krompira i čije je prisustvo nužan preduslov za inicijaciju krtola (Sarkar, 2008; Jackson, 2009; Abelenda i sar. 2011). Danas znamo da se u indukujuće uslove ubrajaju niže temperature, kratki dani (ili tačnije, duge noći), viši intenzitet osvetljenja, a ukoliko je reč o kulturi izdanaka krompira, i veći odnos šećera prema azotu u hranljivoj podlozi (Jackson, 1999; Abelenda i sar. 2011). Od dostupnosti saharoze, naravno, zavisi proces nakupljanja skroba u krtolama, ali značaj saharoze u procesu tuberizacije je širi od toga, s obzirom da ona može biti i deo signala za indukciju krtola (Šimko, 1994).

Geneza induktivnog signala pod uticajem indukujućih uslova regulisana je fotoperiodski i hormonalno (Jackson i Prat, 1996; Martínez-García i sar. 2001). Centralnu ulogu u fotoperiodskoj regulaciji igra fitohrom B (PHYB), a u hormonalnoj giberelini (Jackson i Prat, 1996). Većina autora smatra da su fotoperiodska i hormonalna regulacija tuberizacije u većoj ili manjoj meri integrisane (Jackson, 1999; 2009; Fernie i Willmitzer, 2001; Prat, 2010; Abelenda i sar. 2011), ali je u literaturi moguće naići i na pretpostavku o dva nezavisna regulatorna mehanizma, od kojih je jedan zavisan od PHYB, a drugi od giberelina (Martínez-García i sar. 2001). Osim toga, u fotoperiodskoj regulaciji indukcije krtola mogu učestvovati i fitohrom A i/ili kriptohrom (Yanovsky i sar. 2000), dok

u hormonalnoj regulaciji mogu učestvovati i druge grupe hormona osim gibberelina, pre svega citokinini (Hussey i Stacey, 1984; Gális i sar. 1995; Malkawi i sar. 2007) i jasmonska kiselina (Koda i sar. 1991; Pelacho i Mingo-Castel, 1991; Koda, 1997; Sarkar i sar. 2006; Malkawi i sar. 2007; Sohn i sar. 2011).

Kod andske podvrste krompira (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) indukcija krtola je kvalitativno uslovljena fotoperiodom, odnosno formiranje krtola u potpunosti je inhibirano u uslovima dugog dana. Čileanski krompir (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) samo je delimično (odnosno kvantitativno) zavisano od fotoperioda, u smislu da do indukcije krtola dolazi i na dugom danu, ali je ona manje efikasna tako da se krtole formiraju kasnije nego prilikom gajenja na kratkom danu ili u mraku (Bradshaw i sar. 2006). Iz tog razloga, pojam "inhibitornog uticaja svetlosti na tuberizaciju" kod čileanskog krompira, uključujući i sortu "Désirée", treba shvatiti uslovno, u smislu nepotpune inhibicije, odnosno odlaganja formiranja krtola.

Indukcija krtola detaljno je proučena na andskom krompiru, a uprkos tome što između dve podvrste krompira postoji razlika u stepenu u kojem je tuberizacija fotoperiodski uslovljena, smatra se da je mehanizam indukcije zajednički za obe podvrste i da su zaključci dobijeni na andskom krompiru primenljivi i na čileansku podvrstu (Jackson, 1999).

Kod andskog krompira, signal za indukciju krtola generiše se u listovima kao odgovor na fotoperiod, i kreće se kroz floem kako bazipetalno, tako i akropetalno. Istovremeno, pokazano je da se signal za inhibiciju tuberizacije takođe kreće kroz floem. Eksperimenti kalemljenja pokazali su da, u odsustvu neindukovanih listova, signal iz indukovanih listova ima dominantan efekat na neindukovane stolone i izaziva tuberizaciju. Međutim, u prisustvu neindukovanih

listova tuberizacija je izostajala, što ukazuje na prisustvo inhibitornog signala u neindukovanim listovima, koji je dominantan u odnosu na induktivni signal (Jackson i sar. 1998). Po svemu sudeći, opisani signalni sistem sastoji se iz većeg broja pozitivnih i negativnih regulatora tuberizacije (Jackson, 1999). Zahvaljujući istraživanjima na molekularnom nivou do sada je identifikovano nekoliko potencijalnih komponenti ovog signalnog sistema.

Pre svega, funkcija samog PHYB kao signala za inhibiciju tuberizacije potvrđena je eksperimentima kalemljenja, u kojima je kalem transgene *antisense-PHYB* biljke omogućavao tuberizaciju kontrolne biljke u neindukujućim uslovima (Jackson i sar. 1998). Pored toga, transgeni krompir koji eksprimira gen *phyB* iz *Arabidopsis thaliana*, pokazivao je pojačanu fotoperiodsku osetljivost i karakterisao se zakasnelim početkom tuberizacije u odnosu na kontrolne biljke (Thiele i sar. 1999).

Giberelini predstavljaju najznačajniji hormonski signal za inhibiciju tuberizacije (Martínez-García i sar. 2001). Prekomerna ekspresija gena za enzime biosinteze giberelina, GA20 oksidazu (Carrera i sar. 2000) i GA3 oksidazu (Bou-Torrent i sar. 2011) odlagala je tuberizaciju transgenih biljaka krompira u indukujućim uslovima. Pored toga, aplikacija retardanta rastenja (ancimidola) omogućavala je biljkama *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* da formiraju krtole u neindukujućim uslovima (Jackson i Prat, 1996).

Transkripcioni faktori StBEL5, čija je ekspresija povišena u listovima i stolonima biljaka krompira prilikom izlaganja indukujućim uslovima (Chen i sar. 2003) interaguje sa transkripcionim faktorom POTH1, stvarajući heterodimer koji se vezuje za promotor gena za GA20 oksidazu i tako inhibira transkripciju gena koji kodira ključni enzim u biosintezi giberelina (Chen i sar. 2004). Pošto giberelini

igraju ključnu ulogu u inhibiciji tuberizacije, StBEL5 i POTH1 na ovaj način deluju kao pozitivni regulatori tuberizacije. Pored toga, pokazano je da iRNK *StBEL5* migrira kroz floem i tako prenosi induktivni signal kroz biljku (Banerjee i sar. 2006). Nedavno je pokazano da se isto događa i sa iRNK *POTH1* (Mahajan i sar. 2012).

Procesi tuberizacije i cvetanja kod krompira kontrolisani su zajedničkim stimulusima iz spoljašnje sredine, među kojima su fotoperiod i temperatura najznačajniji (Almekinders i Struik, 1996; Rodríguez-Falcón i sar. 2006). U skladu sa tim, nekoliko novootkrivenih transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji tuberizacije kod krompira, pokazuju strukturnu homologiju sa transkripcionim faktorima uključenim u regulaciju cvetanja kod *Arabidopsis thaliana* (Martínez-García i sar. 2002; Guo i sar. 2010; Navarro i sar. 2011). Transkripcioni faktor iz krompira StTFL1 pokazuje homologiju sa TERMINAL FLOWER 1 (AtTFL1) iz *A. thaliana*, a transformisane biljke krompira sa prekomernom ekspresijom *StTFL1* razvijale su krtole u neindukujućim uslovima (Guo i sar. 2010). Jedan drugi transkripcioni faktor krompira, StSP6A, pokazuje homologiju sa FLOWERING LOCUS T (FT) iz *A. thaliana*, za koji se smatra da je komponenta florigena. Međutim, StSP6A kod krompira učestvuje u regulaciji tuberizacije, a ne cvetanja (Navarro i sar. 2011). Transkripcioni faktor CONSTANS (StCO) inhibira indukciju krtola kod krompira, a homolog je sa AtCO koji kod *A. thaliana* igra centralnu ulogu u fotoperiodskoj regulaciji cvetanja (Martínez-García i sar. 2002). Nedavno je pokazano da StCO negativno reguliše transkripciju StBEL5 i StSP6A, i da se može transportovati kroz floem krompira, uz dominantno inhibitoran uticaj na tuberizaciju u indukujućim uslovima (González-Schain i sar. 2012). Očigledno je da signalni putevi indukcije krtola dele mnoge komponente sa putevima indukcije cvetanja, počev od PHYB i giberelina, preko transkripcionih faktora. Stoga se može govoriti o bliskoj povezanosti regulatornih puteva ovih dveju reproduktivnih

strategija u odgovoru na fotoperiodski stimulus (Rodríguez-Falcón i sar. 2006; Sarkar, 2010).

Kao pozitivni regulatori tuberizacije identifikovani su i jedna kalcijum-zavisna protein kinaza – StCDPK1 (Raíces i sar. 2001), kao i jedna mikro-RNK, *miR172*, za koju je potvrđeno da se transportuje kroz floem (Martin i sar. 2009).

Svi ovi faktori, kao i mnogi drugi koji će tek biti otkriveni, predstavljaju pojedinačne elemente kompleksnog signalnog sistema indukcije/inhibicije tuberizacije, koji u zavisnosti od faktora spoljašnje sredine čitavu biljku krompira čini kompetentnom za formiranje krtola u indukujućim, odnosno nekompetentnom u neindukujućim uslovima (Abelenda i sar. 2011).

1.2.2. Inicijacija krtola

Xu i saradnici (1998b) identifikovali su trenutak inicijacije krtole krompira na morfološkom i histološkom nivou. Prema njihovom modelu, ovaj trenutak karakteriše se promenom obrasca ćelijskih deoba u subapikalnom regionu stolona, usled čega stolon prestaje da raste longitudinalno i počinje da raste radijalno, odnosno da deblja. Debljanjem su u najvećoj meri zahvaćene prve tri internodije na bazi stolona, usled čega se distalne internodije pomeraju prema apikalnom delu krtole.

Anatomija krtole značajno je pojednostavljena u odnosu na anatomiju stolona, odnosno izdanka. Kora (lat. *cortex*) i srž krtole diferenciraju se iz apikalnog meristema stolona, dok se između njih diferencira perimedularna zona, koja se sastoji od spoljašnjeg floema, primarnog ksilema, unutrašnjeg floema i interfascikularnog (radijalnog) parenhima (Reeve i sar. 1969).

Debljanje krtole uzrokovano je kako ćelijskim deobama, tako i rastenjem ćelija. Ćelijske deobe su najintenzivnije u perimedularnoj zoni krtole, dok je rastenje ćelija najznačajnije u srži krtole. Kod biljaka gajenih *in vitro*, debljanje krtole se zaustavlja kada dostigne prečnik od 8 mm. Pretpostavljeno je da do toga dolazi usled nemogućnosti biljaka gajenih *in vitro* da intenziviraju rastenje u perimedularnoj zoni krtole, što može biti posledica neintaktnosti biljke i/ili nedostupnosti određenih značajnih nutrijenata u hranljivoj podlozi *in vitro*. Kod biljaka gajenih *ex vitro* u ovom stadijumu raste krtola (kada dostignu prečnik od 8 mm) dolazi do naglog ubrzavanja raste krtola u perimedularnoj zoni, gde se intenziviraju kako ćelijske deobe, tako i rastenje ćelija. U ovom stadijumu ravni ćelijskih deoba postaju nasumične i krtola raste u svim pravcima, a broj parenhimskih ćelija u perimedularnoj zoni koje talože skrob, kao i sadržaj skrobnih zrna u njima, beleže vrtoglav porast (Xu i sar. 1998b).

1.2.3. Uvećavanje krtola

Biološki smisao uvećavanja krtole je akumulacija skroba, koji treba da posluži kao izvor energije mladoj biljčici koja će se razviti po završetku perioda mirovanja (Rodríguez-Falcón i sar. 2006). Akumulacija skroba je biohemijski proces koji počiva na dopremanju saharoze kroz floem u tkivo rastuće krtole, razlaganju saharoze na heksozo-fosfate (fosforilisanu glukozu i fruktozu), i zatim ugrađivanju glukozo-6-fosfata u skrobni polimer. Ovaj proces vođen je aktivnošću određenog broja enzima ugljenohidratnog metabolizma i s obzirom na to da njihova aktivnost određuje brzinu uvećavanja polimera, ovi enzimi podležu metaboličkoj regulaciji (Ferne i sar. 2002).

Pokazano je da je akumulacija skroba u krtoli vođena prvenstveno aktivnošću tri citosolna enzima u ćelijama skrobnog parenhima: sintaze saharoze,

heksokinaze i fruktokinaze (Appeldoorn i sar. 1997; 2002). Sintaza saharoze katalizuje reverzibilnu reakciju hidrolize saharoze na monosaharide glukoze i fruktoze, bez prenosa fosfatne grupe, dok su heksokinaza i fruktokinaza odgovorne za fosforilaciju glukoze, odnosno fruktoze na C⁶-atomu. Glukoze- i fruktozo-6-fosfat su međusobno interkonvertibilni zahvaljujući dejstvu citosolne fosfoglucoizomeraze, a glukoze-6-fosfat se transportuje u amiloplast, gde predstavlja supstrat za sintazu skroba (Ferne i sar. 2002).

Prilikom tranzicije stolona u krtolu, enzimska aktivnost sintaze saharoze, heksokinaze i fruktokinaze raste 4 do 12 puta (Appeldoorn i sar. 1997; 2002). Za sada nije poznato koji su regulatorni mehanizmi u procesu tuberizacije odgovorni za pojačanje aktivnosti ovih enzima ili eventualno transkripcije gena koji ih kodiraju. Poznato je, međutim, da je transkripcija gena za sintazu saharoze u listovima krompira pozitivno regulisana samom saharozom kao signalnim molekulom (Salanoubat i Belliard, 1989).

Povećanje aktivnosti sintaze saharoze, do kojeg dolazi prilikom inicijacije krtole, praćeno je istovremenim višestrukim smanjenjem aktivnosti invertaze ćelijskog zida, enzima koji ireverzibilno razlaže saharozu u apoplastu (Appeldoorn i sar. 1997). Invertaza ćelijskog zida je, kao i sintaza saharoze, katabolički enzim čija aktivnost određuje snagu organa uvira, održavajući gradijent saharoze kroz floem, u smeru prema organu uvira. Dok sintaza saharoze stvara ovakav gradijent saharoze u simplastu, invertaza ćelijskog zida deluje u apoplastu (Appeldoorn i sar. 1997). Prelazak sa apoplastnog na simplastni istovar saharoze prilikom tranzicije stolona u krtolu potvrđen je i praćenjem kretanja karboksifluoresceina, kao i radioaktivno (¹⁴C) obeleženih asimilata kroz floem stolona i krtola, a fluorescentni i radioaktivni signal kretali su se kroz apoplast u floemu stolona, ali kroz simplast u krtoli (Viola i sar. 2001). Smatra se da je biološki smisao prelaska sa

apoplastnog na simplastni istovar saharoze prilikom formiranja krtole, u tome da se degradacija saharoze preusmeri sa invertaze ćelijskog zida (koja katalizuje ireverzibilnu hidrolizu saharoze u apoplastu) na sintazu saharoze, koja deluje u simplastu i katalizuje reverzibilnu enzimsku reakciju. Reverzibilna degradacija saharoze pogodnija je za metaboličku regulaciju i omogućava usaglašavanje dinamike potrošnje saharoze u krtoli sa metaboličkim potrebama cele biljke (Appeldoorn i sar. 2002; Geigenberger i sar. 2004).

1.3. Genetičko inženjerstvo biljaka

Poslednje tri decenije u biljnoj biologiji obeležio je potpuno nov pristup dobijanju genetičkih linija biljaka sa željenim osobinama. Za razliku od tradicionalnih metoda selekcije, koje omogućavaju da odabirom roditeljskih linija postizemo kod potomstva postepen napredak kroz generacije u osobinama kao što su prinos, otpornost na sušu, patogene ili štetočine, genetičko inženjerstvo omogućava kvalitativni iskorak – odabirom gena od interesa i njegovom integracijom u genom biljke možemo dobiti genetičku liniju sa osobinama koje su potpuno nove za datu biljnu vrstu. Od kada su, pre 30 godina, tri grupe istraživača nezavisno jedni od drugih dobili uspešno eksprimiranje transgena u biljnim ćelijama (Bevan i sar. 1983; Fraley i sar. 1983; Herrera-Estrella i sar. 1983), ova moćna tehnologija je značajno napredovala i danas je u širokoj upotrebi radi dobijanja transgenih biljaka sa komercijalno poželjnim osobinama. Ukupna površina zasađena transgenim usevima ustostručila se od 1996. do 2012. i danas iznosi oko 1,7 miliona km², odnosno 12% ukupne površine pod gajenim kulturama na svetu (James, 2012). Period ekspanzije genetičkog inženjerstva biljaka praćen je, međutim, i porastom javne zabrinutosti oko eventualnih štetnih posledica gajenja i korišćenja transgenih biljaka po zdravlje ljudi i zaštitu životne sredine (Taylor i

Hefle, 2001; Hollingworth i sar. 2003; Miki i McHugh, 2004; Goldstein i sar. 2005; Verma i sar. 2011; Ahmad i sar. 2012).

Genetičko inženjerstvo nije našlo primenu isključivo u poljoprivredi i industriji. Mogućnost dobijanja biljaka koje prekomerno eksprimiraju određeni gen ili je ekspresija gena utišana pomoću komplementarnog lanca iRNK, pružila je uvid u molekularno-biološke osnove rastenja i razvića biljaka, pre svega na model biljkama kao što je *Arabidopsis thaliana*. Široke mogućnosti koje pruža genetičko inženjerstvo omogućavaju disekciju mehanizama ekspresije gena, signalne transdukcije i hormonalne regulacije rastenja i razvića biljaka, sa značajnom primenom u fundamentalnim istraživanjima (Gepstein i Horwitz, 1995).

1.3.1. Horizontalni transfer gena bakterija roda *Agrobacterium* u genom biljaka

Tehnologija genetičkog inženjerstva pomoću bakterija roda *Agrobacterium* zasniva se na fenomenu koji je jedinstven za odnose između biljaka i bakterija – horizontalnom transferu gena putem prirodnog mehanizma infekcije biljaka. Bakterije ovog roda – *A. rhizogenes* i *A. tumefaciens*, jedini su poznati organizmi koji mogu svoj genetički materijal prenositi na pripadnike drugog carstva (Lacroix i sar. 2006). Ove dve vrste Gram-negativnih bakterija koje žive u zemljištu, napadaju širok spektar biljnih vrsta, izazivajući bolest "dlakavih korenova" (eng. "hairy roots") u slučaju *A. rhizogenes*, odnosno "tumore" izdanka – "gale" (eng. "crown gall disease") u slučaju *A. tumefaciens* (Gelvin, 1990). Bakterije prodiru kroz minijaturne povrede na korenu, odnosno izdanku biljke, i u kontaktu sa biljnim ćelijama započinju koordinisanu ekspresiju gena, što rezultira transferom dela genetičkog materijala bakterija u biljne ćelije (Gelvin, 2003).

Iako se fiziološka osnova bolesti "dlakavih korenova" i biljnih "tumora" – "gala" međusobno razlikuju, mehanizam transfera T-DNK (što je skraćenica od "transfer" DNK) u biljnu ćeliju, u slučaju obe bakterijske vrste suštinski je zajednički (Gelvin, 1990). Sekvenca T-DNK se nalazi na Ri-plazmidu ("root inducing") kod *A. rhizogenes*, odnosno na Ti-plazmidu ("tumour inducing") kod *A. tumefaciens*. Ona kodira gene čija je ekspresija u biljnoj ćeliji odgovorna za patogenezu. To su, u slučaju Ri-plazmida, geni za biosintezu indol-sirćetne kiseline (IAA), koja predstavlja biljni hormon iz grupe auksina, kao i geni za biosintezu opina, ugljenohidratno-aminokiselinskih konjugata koje *Agrobacterium* efikasno koristi kao izvor ugljenika i azota za razliku od drugih mikroorganizama, kao i same biljne ćelije, što mu pruža selektivnu prednost (Pitzschke i Hirt, 2010; Chandra, 2012). Osim gena za biosintezu auksina i opina, u okviru T-DNK kod *A. tumefaciens* nalazi se i gen za izopentenil-transferazu (*ipt*), ključni enzim u biosintezi citokinina. Biosinteza velikih količina citokinina i auksina omogućava dediferencijaciju i proliferaciju biljnih ćelija zaraženih bakterijama *A. tumefaciens*. Budući da je biosinteza auksina i citokinina kodirana genima koji se nalaze na molekulu T-DNK integrisanom u genom inficiranih ćelija, prisustvo bakterija nije neophodno za dalje širenje tumora (Gelvin, 1990).

Izvan sekvence T-DNK, Ri-plazmid *A. rhizogenes*, odnosno Ti-plazmid *A. tumefaciens*, sadrži i lokus za početak replikacije (eng. "origin"), gene za katabolizam opina, kao i gene virulentnosti koji se nalaze na lokusu *vir*, i označeni su slovima, od *virA* do *virG* (Gelvin, 2003). Upravo su proteinski produkti ovih gena odgovorni za kompletan mehanizam infekcije biljnih ćelija, kao i za sve korake transfera T-DNK, počev od njenog isecanja iz Ri-, odnosno Ti-plazmida, preko transporta kroz ćelijski zid i membranu biljne ćelije, sve do nukleusa i ugradnje T-DNK u genom biljke (Pitzschke i Hirt, 2010).

Povređene biljne ćelije luče određena fenolna jedinjenja, kao što je acetosiringon (Jacyn Baker i sar. 2005), čije prisustvo aktivira signalnu kaskadu u kojoj su centralni akteri proteini VirA i VirG, produkti istoimenih gena koji se kod *Agrobacterium tumefaciens* konstitutivno eksprimiraju (Stachel i Nester, 1986). Ova činjenica je našla značajnu primenu u laboratorijskoj praksi, gde je dodavanjem acetosiringona u hranljivu podlogu moguće povećati efikasnost transformacije biljnih tkiva bakterijama iz roda *Agrobacterium* (Kuta i Tripathi, 2005; Pitzschke i Hirt, 2010). Aktivacija signalnog sistema VirA/VirG vodi amplifikaciji signala mehanizmom pozitivne povratne sprege. Protein VirA histidin-kinaznom aktivnošću fosforiluje VirG i prevodi ga u aktivno stanje u kojem on postaje transkripcioni faktor i inicira transkripciju gena *virA* i *virG* (otuda pokretanje mehanizma pozitivne povratne sprege), ali i ostalih gena koji se nalaze na lokusu *vir* (Brencic i Winans, 2005).

Za uspostavljanje kontakta između *Agrobacterium tumefaciens* i biljnih ćelija odgovorna su tri proteina koja su kodirana genima na hromozomskoj DNK bakterije (McCullen i Binns, 2006). Prilikom uspostavljanja kontakta, na membrani bakterijske ćelije se formira kompleks koji čini 11 proteina familije VirB zajedno sa proteinom VirD4 (Christie i sar. 2005). S druge strane, kompleks VirD1/VirD2 svojom endonukleaznom aktivnošću iseca polinukleotid T-DNK iz Ri-, odnosno Ti-plazmida. Protein VirD2 ostaje kovalentno vezan za 5'-kraj jednolančane T-DNK i učestvuje u njenom prenosu kroz transporter VirB1-11/VirD4 u biljnu ćeliju i nukleus, a u ovom procesu učestvuje i VirE2 (Gelvin, 2003; Pitzschke i Hirt, 2010). Za razliku od VirD2, čiji se monomer vezuje za 5'-kraj T-DNK, VirE2 je homopolimer čije se subjedinice (njih oko 600) vezuju za jednolančanu T-DNK "umotavajući" je, i na taj način je štite od interakcija sa drugim molekulima u biljnoj ćeliji. Kompleks VirD2-T-DNK/VirE2 se zatim transportuje u nukleus biljne ćelije (Zupan i sar. 1996). U biljnu ćeliju se, kroz transporter VirB1-11/VirD4, prenose i

proteini VirD5, VirE3 i VirF (Vergunst i sar. 2005). Smatra se da je VirE3 neophodan za upućivanje polimera VirE2 vezanog za T-DNK, u nukleus biljke (Lacroix i sar. 2005), dok VirD5 igra ulogu transkripcionog faktora u nukleusu biljke (Schrammeijer i sar. 2000). Izgleda da se VirF u nukleusu biljne ćelije udružuje sa biljnim proteolitičkim aparatom, aktivirajući proteolizu kompleksa VirD2-T-DNK/VirE2, što vodi oslobađanju polinukleotida T-DNK i njegovoj ugradnji u genom biljke (Schrammeijer i sar. 2001).

O samoj ugradnji T-DNK u genom biljke zna se vrlo malo. Smatra se da do integracije dolazi putem ilegitimne rekombinacije (Mayerhofer i sar. 1991). Još uvek nije jasno ni da li T-DNK "napada" genomsku DNK kao jednolančani molekul, pa do replikacije komplementarnog lanca dolazi tek naknadno, ili se replikacija događa pre ugradnje u genomsku DNK (Pitzschke i Hirt, 2010). Izvesno je samo da ligaciju T-DNK u genomsku DNK biljke vrše biljne ligaze a ne VirD2 (Ziemienowicz i sar. 1999), ali je prisustvo VirD2 na 5'-kraju T-DNK neophodno za integraciju T-DNK u biljni genom u celosti, pošto mutacija u genu *virD2* vodi deleciji 5'-kraja transgene sekvence ugrađene u biljni genom (Tinland i sar. 1995).

Međutim, biljke su razvile mehanizme odbrane od patogena koji se označavaju kao "urođeni odbrambeni odgovor biljaka" (Pitzschke i sar. 2009). Procesom prirodne selekcije biljke su "naučile" da prepoznaju tzv. molekularne obrasce povezane sa patogenima (eng. PAMP - "*Pathogen-Associated Molecular Patterns*"). Kao okidači "urođenog imunog odgovora biljaka" mogu delovati brojni mali molekuli karakteristični za bakterijske ili gljivične patogene, kao što su flagelin (Gomez-Gomez i sar. 1999), hitin (Kaku i sar. 2006) ili bakterijski elongacioni faktor translacije - EF-Tu (Zipfel i sar. 2006). Vezivanje ovih malih molekula za odgovarajuće receptore na biljnim ćelijama aktivira signalne puteve mitogen-aktiviranih protein-kinaza (MAPK), što pokreće raznovrsne odbrambene

mehanizme biljke, među kojima su produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta i pokretanje hipersenzitivne nekrotičke reakcije (Pitzschke i sar. 2009). Hipersenzitivna nekrotička reakcija, pokrenuta odbrambenim mehanizmima biljaka prilikom inokulacije sa *Agrobacterium tumefaciens*, jedan je od osnovnih uzroka nekroze transformisanih tkiva i niske stope preživljavanja transformisanih eksplantata u laboratorijskoj praksi genetičkog inženjerstva biljaka (Kuta i Tripathi, 2005; Dan, 2008). Reaktivne kiseonične vrste, do čije intenzivne produkcije dolazi prilikom hipersenzitivne nekrotičke reakcije, deluju i baktericidno, osim što dovode do nekroze transformisanog tkiva (Wojtaszek, 1997). Osim toga, umiruća tkiva produkuju i antimikrobne supstance, koje sprečavaju dalje širenje infekcije bakterijama iz roda *Agrobacterium* (Dan, 2008).

Najnovija otkrića govore u prilog tezi da je prirodna selekcija dovela do koevolucije između mehanizama virulentnosti *A. tumefaciens* i elemenata "urođenog odbrambenog odgovora" biljaka (Pitzschke i sar. 2009). Vezivanje bakterijskog flagelina za receptor Flg22 (Gomez-Gomez i sar. 1999) pokreće biljnu mitogen-aktiviranu protein kinazu 3 (MPK3), koja fosforiluje biljni protein VIP1, čime izaziva njegov transport u nukleus. Protein VIP1 je transkripcioni faktor čiji transport u nukleus ima smisao da pokrene transkripciju gena rezistencije na patogene. Međutim, VIP1 interaguje sa bakterijskim proteinom VirE2, čime olakšava transport kompleksa VirD2-T-DNK/VirE2 u nukleus (Djamei i sar. 2007). Prilikom ulaska u nukleus, VirE2 interaguje sa proteinom VirF koji pokreće proteolizu kompleksa VirE2/VIP1, tako da se transkripcioni faktor VIP1 razgrađuje pre nego što pokrene transkripciju gena rezistencije na patogene. Na taj način bakterijska molekularna mašinerija je "zloupotrebila" protein VIP1 koji učestvuje u odbrambenom mehanizmu biljke i preokrenula njegovu funkciju u svoju adaptivnu korist (Pitzschke i sar. 2009).

1.3.2. Ekspresioni vektori u genetičkom inženjerstvu

Uprkos rastućem broju razvijenih metodologija transformacije biljnih ćelija, protokoli koji se oslanjaju na transformaciju *in vitro* pomoću *Agrobacterium tumefaciens* ostali su do danas dominantni u praksi genetičkog inženjerstva (Rao i sar. 2009). Ovi protokoli podrazumevaju modifikaciju Ti-plazmida *A. tumefaciens* uklanjanjem T-DNK, na čije mesto se ugrađuje rekombinantna sekvenca koja sadrži željene ekspresione kasete (Rao i sar. 2009; Pitzschke i Hirt, 2010). Uklanjanjem gena za biosintezu citokinina, auksina i opina iz T-DNK dobija se "razoružani" (eng. "disarmed") Ti-plazmid, a na mesto T-DNK se putem rekombinacije ugrađuje željena polinukleotidna sekvenca koja će biti integrisana u genom biljke. Zahvaljujući prisustvu *vir* lokusa izvan T-DNK, bakterije su sposobne da inficiraju biljne ćelije i ugrade u biljni genom izmenjenu T-DNK, ali inficirane ćelije nemaju sposobnost autonomne proliferacije, već se njihova deoba može indukovati dodavanjem regulatora rasteanja u hranljivu podlogu. Na ovaj način transformisanim ćelijama je omogućeno da regenerišu zdrave, fertile biljke koje će u svom genomu nositi transgen i biti sposobne da ga prenesu svom potomstvu (Newell, 2000).

Jedan od prvih sintetičkih vektora za transformaciju biljaka pomoću *A. tumefaciens* bio je plazmid pBin19 (Bevan, 1984). Ovaj vektor je u okviru T-DNK sadržao dve važne sekvence. Jedna je ekspresiona kasete sa genom *nptII* koji kodira neomicin-fosfotransferazu II, enzim koji omogućava rezistenciju transformisanih biljaka na selektivni antibiotik kanamicin. Ekspresija ovog gena u okviru plazmida pBin19 bila je pod kontrolom genetičkih regulatornih elemenata iz *A. tumefaciens*, promotora i terminatora gena za nopalinsintazu (*nos*). Druga značajna sekvenca u okviru T-DNK je polilinker, region bogat oligonukleotidima koje prepoznaju najčešće korišćene restriktione endonukleaze, što omogućava

kloniranje željene polinukleotidne sekvence u okvire T-DNK. Željena sekvenca mora sadržati, osim kodirajućeg regiona, i odgovarajuće regulatorne sekvence (konstitutivni ili inducibilni promotor, a po potrebi i pojačivače – eng. "enhancers") koji omogućavaju njenu uspešnu ekspresiju u biljnoj ćeliji. Ovako dizajniran plazmid omogućavao je transfer gena od interesa u genomsku DNK biljke zajedno sa selektivnim markerom, što je olakšavalo proceduru skrininga transformanata upotrebom selektivnih hranljivih podloga (Bevan, 1984).

Iako su od prve upotrebe plazmida pBin19 metode transformacije biljaka znatno napredovale, protokoli za transformaciju biljaka pomoću *A. tumefaciens* još uvek počivaju na upotrebi transformacionih vektora koji su suštinski uporedivi sa pBin19, iako su neki među njima znatno kompleksniji (Rao i sar. 2009). Zabrinutost javnosti za interspecijsko širenje gena rezistencije na antibiotike horizontalnim transferom usled njihove prekomerne upotrebe u genetičkom inženjerstvu biljaka, dovela je poslednjih godina do razvijanja protokola za transformaciju koji ne uključuju selektivne markere ili omogućavaju njihovu jednostavnu eliminaciju iz transgenih biljaka naknadnom intervencijom (Miki i McHugh, 2004; Goldstein i sar. 2005; Kopertekh i sar. 2012).

1.3.3. Faktori koji mogu ugroziti ekspresiju transgena: pozicioni efekat i utišavanje gena

Ekspresija transgena u tkivima transformisanih biljaka zavisi od nekoliko faktora. Prvenstveno, transkripciona aktivnost transgena zavisi od pozicije u genomu u koju je transgen insertovan – ovaj fenomen je poznat kao "pozicioni efekat" (Dean i sar. 1988; Mlynárová i sar. 1994; Matzke i Matzke, 1998; van Leeuwen i sar. 2001). Integracija u transkripciono aktivni, euhromatinski deo genoma, obično visokog AT-sadržaja i lociran bliže krajevima hromozoma –

najčešće je povezana sa visokim stepenom ekspresije transgena, dok ugradnja u heterohromatinske regione sa visokim sadržajem GC parova, bliže centromeri, rezultira slabijom ekspresijom ili odsustvom ekspresije (Iglesias i sar. 1997). Pored toga, transgen se može ugraditi na poziciju koja je pod lokalnim dejstvom *cis*-regulatornih elemenata, odnosno pojačivača (eng. "*enhancers*") ili utišivača (eng. "*silencers*"), što može dovesti do neželjenog pojačavanja ili utišavanja njegove ekspresije (Francis i Spiker, 2005). Poznato je da su insercije T-DNK u genom krompira praktično nasumične, te je očekivano da se više od polovine svih transgena insertuje u transkripciono neaktivne regione (Jacobs i sar. 1995).

Osim toga, mehanizmima utišavanja (eng. "*silencing*") mogu naknadno podleći čak i transgeni koji su ugrađeni u transkripciono aktivne delove genoma (Finnegan i McElroy, 1994; Neuhuber i sar. 1994; Matzke i Matzke, 1995; 1998; Stam i sar. 1997; Plasterk i Ketting, 2000; Singer i sar. 2012). Utišavanje gena predstavlja odbrambeni mehanizam pomoću kojeg biljke štite svoj genetički integritet od upada "stranih" genetičkih elemenata, kao što su virusi i transpozoni (Matzke i Matzke, 1998; Plasterk i Ketting, 2000).

Utišavanje se odvija na dva nivoa. Transkripciono utišavanje podrazumeva hipermetilaciju DNK sekvence, što može značajno smanjiti efikasnost transkripcije ili je potpuno ukinuti (Stam i sar. 1998; Mette i sar. 1999). Posttranskripciono utišavanje nastupa u slučaju akumulacije velikog broja međusobno homologih molekula RNK u citosolu, usled čega dolazi do stvaranja dvolančanih RNK hibrida, koji zatim podležu razgradnji specifičnim RNKazama (Lindbo i sar. 1993). Oba fenomena karakterišu se dominantnim uticajem. Hipermetilacija se proširuje sa jedne homologe sekvence u genomu na drugu, susednu (*cis*-inaktivacija) ili udaljenu (*trans*-inaktivacija); ili se pak dve homologe sekvence koordinisano hipermetiluju, što je poznato kao kosupresija (Matzke i Matzke, 1995). Signal

posttranskripcionog utišavanja takođe se proširuje kroz biljku i to akropetalno, migracijom "antisense" molekula RNK pri čemu utišana tkiva imaju dominantan efekat na neutišana (Palauqui i sar. 1997; Voinnet i sar. 1998). Postoje indicije da mehanizmi posttranskripcionog utišavanja putem RNK-DNK interakcija mogu delovati na genom i pokrenuti mehanizme metilacije DNK koji dalje vode transkripcionom utišavanju (Jones i sar. 1999).

Mehanizmi koji su odgovorni za utišavanje gena imaju sposobnost prepoznavanja "stranih" gena, bilo kao strukturno različitih od genetičkog materijala domaćina (Matzke i Matzke, 1995), ili kao repetitivnih sekvenci (alelskih - prisutnih u homozigotnom stanju na homologim hromozomima; ili ektopičnih - prisutnih na nasumičnim mestima u genomu; Assaad i sar. 1993). Neki izuzetno transkripciono aktivni virusni promotori, kao što je CaMV 35S, takođe mogu podleći utišavanju (Elmayan i Vaucheret, 1996). Promotor CaMV 35S izolovan je iz genoma mozaičnog virusa karfiola (eng. "Cauliflower Mosaic Virus"), gde daje transkript sedimentacione konstante 35 Svedbergovih jedinica. Ovaj promotor omogućava visoku stopu transkripcije i konstitutivno je aktivan, zbog čega je u širokoj upotrebi u genetičkom inženjerstvu biljaka (Benfey i sar. 1989). Prilikom transformacije biljaka, pogotovo kada se koristi promotor 35S i ako se transgen ugradi na veći broj mesta u genomu, može doći do potpunog utišavanja ekspresije transgena i zato ovakve genetičke linije treba ukloniti iz eksperimenta (Birch, 1997). Utišavanje se ne mora dogoditi odmah nakon transkripcionog događaja, već može i prilično kasniti - upravo je to razlog iz kojeg savremeni protokoli za regeneraciju transformanata preporučuju upotrebu selektivnog antibiotika i do šest meseci nakon transformacije, što omogućava eliminaciju transformisanih linija kod kojih je mehanizam utišavanja uključen naknadno (Birch, 1997).

Transformisane linije kod kojih ekspresija transgena nije utišana, uobičajeno se međusobno razlikuju po pitanju nivoa ekspresije, što se objašnjava pozicionim efektom. Moguće je da, u zavisnosti od lokacije na kojoj se insertovao transgen kod različitih transgenih linija, promotor koji vodi njegovu ekspresiju radi različitom jačinom ili pokazuje različit vremenski i tkivno-specifični obrazac transkripcione aktivnosti. Pokazano je da ekspresija transgena pod dejstvom promotora 35S varira od tkiva do tkiva i u vremenu, najverovatnije zbog pozicionog efekta (van Leeuwen i sar. 2001).

Pozicioni efekat može na još jedan značajan način uticati na genetičke karakteristike transformisanih linija. Insercija transgena u određeni lokus na hromozomu narušava strukturu tog lokusa, između ostalog dovodeći potentni promotor 35S u neposrednu blizinu gena koji se tu nalaze, što menja obrazac njihove ekspresije (Zheng i sar. 2007). Insercija transgena može imati za posledicu i aktivaciju transpozonskih elemenata, koji dalje mogu dovesti do genetičkih rearanžmana i izazvati pojavu novih mutacija. Ovaj fenomen poznat je kao *inserciona mutageneza* i smatra se uzrokom učestalih somaklonalnih varijacija koje se javljaju kod transformanata tokom izvesnog vremenskog perioda neposredno nakon transformacije (Matzke i Matzke, 1998). Kod poliploidnih biljaka kao što je krompir, ovakvi događaji retko rezultiraju vidljivim posledicama jer se njihovi efekti kompenzuju delovanjem preostalih alela (Conner i sar. 1994).

1.4. Citokinini

Citokinini su klasa biljnih hormona sa širokim spektrom bioloških efekata, kao što su stimulacija umnožavanja ćelija (*citokineza* - otuda njihovo ime), regulacija meristemske aktivnosti, regulacija razvića izdanka i korena, apikalna dominacija, metabolizam i particija hranljivih materija, klijanje semena, diferencijacija hloroplasta, regulacija senescencije listova, odgovor na stres i mnogi drugi (Mok i Mok, 2001). Iako su citokinini otkriveni pre više od pola stoleća, molekularni mehanizmi metabolizma i signalnog delovanja ove grupe biljnih hormona tek su nedavno počeli da se rasvetljavaju.

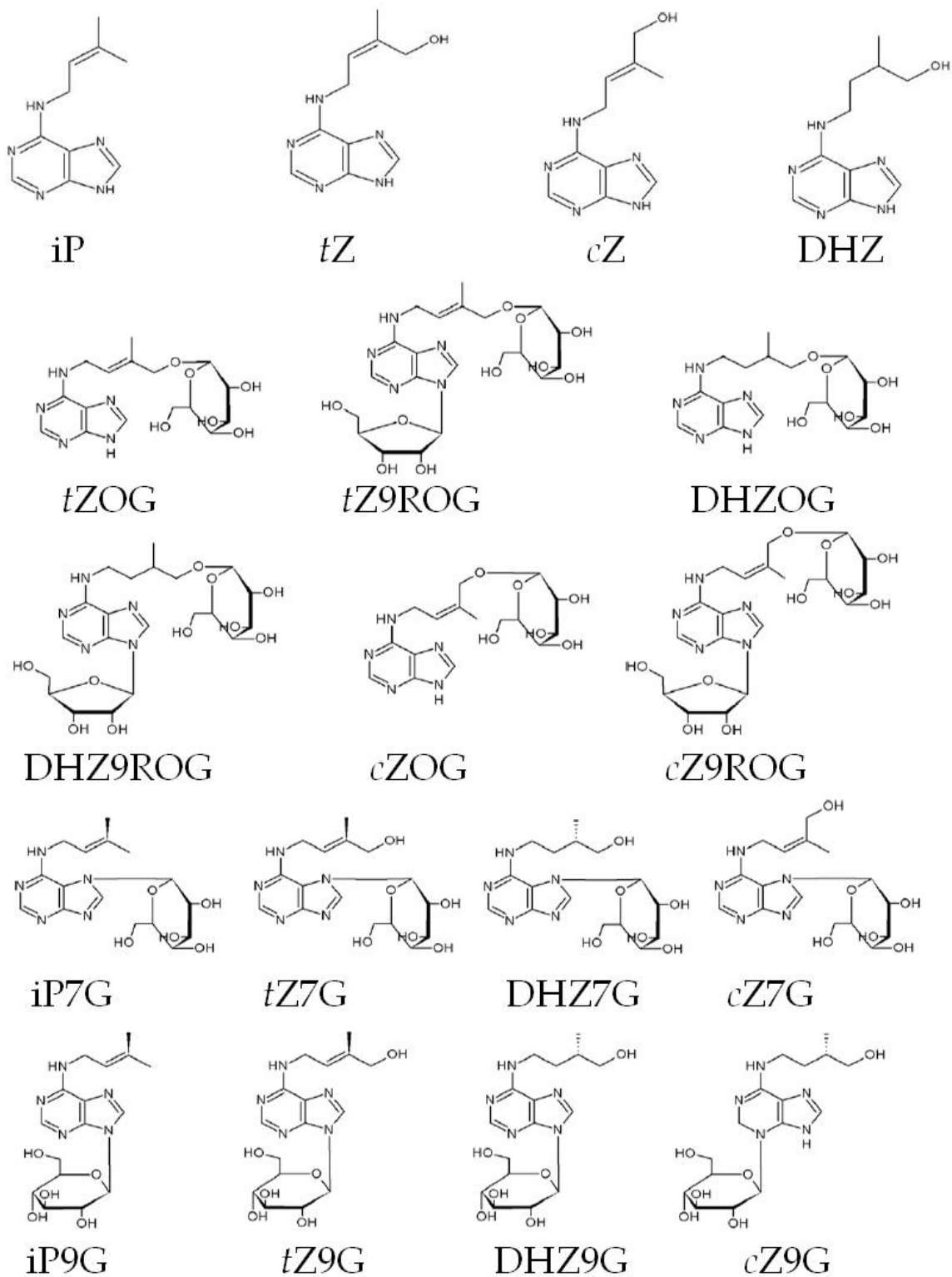
Citokinini su otkriveni 50-tih godina prošlog veka kao supstance koje u biljnim ćelijama pobuđuju mitotički potencijal. Prve supstance koje su u kulturi biljnih tkiva korišćene da bi se postigao efekat citokinina bili su sok od paradajza, sok od pomorandže, ekstrakt kvasca, kokosovo mleko i autoklavirana sperma haringe, iz koje je 1955. godine izolovan produkt oksidativne degradacije DNK - *kinetin* i identifikovan kao prvi citokinin (Miller i sar. 1956). Letham i saradnici su 1963. godine izolovali *trans*-zeatin iz nezrelog endosperma kukuruza i okarakterisali ga kao prvi prirodni citokinin.

1.4.1. Struktura citokinina

Prirodni citokinini imaju strukturu N^6 -supstituisanog adenina, a prema hemijskoj prirodi supstituenta mogu se podeliti na *izoprenoidne* i *aromatične* citokinine. Neke sintetičke supstance sa citokininskim efektom, kao što su *tidiazuron* (TDZ) i *N*-fenil-*N'*-(2-hloro-4-piridil)urea (CPPU), nemaju adeninsku strukturu (Mok i Mok, 2001).

Izoprenoidni citokinini (slika 2) sadrže jednu izoprenoidnu (C₅) jedinicu nastalu od dimetil-alil-difosfata (DMAPP), vezanu za N⁶ atom adenina. Ova klasa citokinina je široko rasprostranjena, a obuhvata N⁶-(Δ^2 -izopentenil) adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihidrozeatin (DHZ) i njihove derivate. *Trans*- i *cis*-izomeri zeatina nastaju hidrosilacijom bočnog lanca iP u *trans*-, odnosno *cis*-položaju, dok DHZ nastaje zasićivanjem dvogube veze u zeatinu. Razlike u strukturi bočnih lanaca citokinina značajne su jer određuju razlike u afinitetu vezivanja za receptore, što određuje njihovu funkciju – ali i razlike u afinitetu vezivanja za enzime koji učestvuju u njihovom metabolizmu, što određuje različit stepen njihove metaboličke regulacije (Mok i Mok, 2001; Sakakibara, 2006; Bajguz i Piotrowska, 2009).

Za razliku od izoprenoidnih, aromatični citokinini imaju za N⁶ atom adenina vezano aromatično jezgro, koje može biti supstituisano hidroksi- ili metoksi-grupom. Ova grupa citokinina otkrivena je do danas u tkivima velikog broja biljnih vrsta (Stirk i sar. 2012). U aromatične citokinine svrstavaju se benzil-adenin (BA), kao i njegovi hidroksil-derivati, *orto*-topolin (oT) i *meta*-topolin (mT), i metoksi-derivati, *orto*-metoksitopolin (meoT) i *meta*-metoksitopolin (memT) (Tarkowská i sar. 2003). Neki autori u aromatične citokinine svrstavaju i *kinetin* (6-furfuril-aminopurin), produkt oksidativne degradacije DNK koji se ne može smatrati prirodnim citokininom, jer nije potvrđeno da se javlja kod biljaka *in vivo* (Mok i Mok, 2001). Kod kinetina na N⁶ atomu adenina javlja se umesto benzil-grupe petočlani aromatični prsten sa kiseonikom - furanski prsten.



Slika 2. Struktura izoprenoidnih citokinina - slobodnih baza i *O*- i *N*-glukozida. Prema: Bajguz i Piotrowska (2009).

Imajući u vidu da se osnovnom biološkom funkcijom citokinina smatra njihov stimulatívni efekat na citokinezu, njihova adeninska struktura ne treba da čudi - naime, ćelija koja je spremna na mitotičku deobu mora raspolagati velikom količinom azotnih baza i nukleotida za *de novo* sintezu DNK, a adeninski nukleotidi dele svoje metaboličke puteve sa citokininima (Hirose i sar. 2008).

1.4.2. Konjugati citokinina

Prirodni citokinini mogu biti prevedeni i u biološki slabije aktivne ili neaktivne konjugate i to u formi:

- ribozida (ribonukleozida) - ribozilacijom N^9 atoma purinskog prstena od iP, tZ, cZ i DHZ nastaju iPR, tZR, cZR, odnosno DHZR;
- ribotida (ribonukleotida) - vezivanjem ribozida preko C^5' atoma riboze za jedan, dva ili tri fosfatna ostatka, dajući ribozid-5'-monofosfate (RMP), ribozid-5'-difosfate (RDP) ili ribozid-5'-trifosfate (RTP);
- O-glukozida ili O-ksilozida - glukozilacijom ili ksilozilacijom atoma kiseonika bočnog lanca slobodnog tZ, cZ, DHZ, njihovih ribozida (ali ne i ribotida), ili aromatičnih citokinina (Bajguz i Piotrowska, 2009; Stirk i sar. 2012). O-acetilacija je takođe konstatovana u pojedinim vrstama biljaka (Letham i Zhang, 1989);
- N-glukozida - glukozilacijom atoma azota purinskog prstena (N^3 , N^7 ili N^9) citokininskih slobodnih baza, njihovih ribozida i ribotida (Bajguz i Piotrowska, 2009);
- lupinske kiseline - konjugacijom alanina za N^9 atom purinskog prstena (Duke i sar. 1978).

Prevođenje biološki aktivnih citokinina u ribozide, ribotide, O-glukozide i O-ksilozide su reverzibilni procesi, dok je N-glukozilacija ireverzibilna, kao i

konjugacija sa alaninom (Bajguz i Piotrowska, 2009). Izuzetak je N^3 -glukozilacija koja je reverzibilna (Kamínek i sar. 1997). Smatra se da je smisao ribozilacije i *O*-glukozilacije u privremenoj inaktivaciji, transportu i skladištenju citokinina. Ribozilacija ima ključnu ulogu u transportu citokinina (smatra se da se citokinini većinski transportuju kroz ksilem biljaka u formi *tZR*, koji se zatim u nadzemnim delovima biljke, pre svega listovima, aktivira ili inaktivira prevođenjem u slobodnu formu ili u glukozide; *iPR* se transportuje u suprotnom smeru, kroz floem), dok *O*-glukozidi predstavljaju osnovnu formu skladištenja citokinina (Sakakibara, 2006; Bajguz i Piotrowska, 2009). Prednost *O*-glukozida kao osnovne forme citokinina za skladištenje je što je ova modifikacija reverzibilna a ipak prilično stabilna, i otporna na degradaciju citokinin-oksidazom/dehidrogenazom (Veach i sar. 2003). *N*-glukozidi i konjugati sa alaninom takođe su veoma stabilni molekuli, ali ove modifikacije su uglavnom ireverzibilne i slobodni citokinini se iz njih više ne mogu regenerisati.

1.4.3. Zastupljenost i značaj citokinina

Danas se smatra da se citokinini javljaju kod svih biljaka. *Izoprenoidni citokinini* su pronađeni kod svih vrsta biljaka ispitivanih do danas (Sakakibara, 2006). Najrasprostranjeniji citokinin viših biljaka je *tZ*; njemu se ujedno pripisuje najznačajnija biološka uloga. Široko je rasprostranjen i *iP*, i to pre svega u formi ribozida. U poslednje vreme se sve veća važnost pridaje i *cis*-zeatinu. U brojnim vrstama kako dikotila tako i monokotila otkriveno je da su citokinini *cis*-zeatinskog tipa zastupljeni sa više od 50% ukupnog nivoa citokinina, pri čemu su *cZOG* i *cZROG* najzastupljeniji (Gajdošová i sar. 2011; Stirk i sar. 2012). Značaj *cis*-zeatina, kao i aromatičnih citokinina u razviću biljaka bio je dugo opovrgavan, ali u poslednje vreme pokazana je njihova umešanost u mnoge procese, između ostalog u sazrevanju i klijanju semena (Stirk i sar. 2012).

Sa napretkom osetljivih instrumentalnih metoda, *aromatični* citokinini pronalaze se kod rastućeg broja vrsta vaskularnih biljaka (Stirk i sar. 2012) kao i kod briofite *Physcomitrella patens* (von Schwartzenberg i sar. 2007) tako da je i njihova opšta rasprostranjenost u biljnom svetu vrlo verovatna. Danas se smatra da aromatični citokinini imaju značajniju ulogu u zrelim, diferenciranim tkivima nego u mladim tkivima sa intenzivnom ćelijskom deobom (Stirk i sar. 2012).

Funkcija citokinina kao regulatora rasteња je potvrđena samo kod skrivenosemenica, četinara i mahovina, ali ipak se smatra da oni regulišu rasteње, razviće i metabolizam kod svih biljaka. Citokinini su otkriveni kod algi i paprati, ali njihova regulatorna funkcija kod ovih grupa biljaka još uvek nije nedvosmisleno potvrđena (Sakakibara, 2006). Sadržaj citokinina kod vaskularnih biljaka je visok, 1-100 µg/g sveže mase, a najviši je u semenima i tkivima za skladištenje (Sakakibara, 2006). Do sada u literaturi nema podataka o sadržaju ukupnih citokinina kod krompira. Nivo pojedinih molekularnih vrsta citokinina određen je kod biljaka krompira sorti "Sante" (Dermastia i sar. 1996) i "Kamyk" (Yakovleva i sar. 1997), gajenih *in vitro*.

Citokininski molekuli javljaju se i kao modifikovane adeninske baze u molekulima tRNK i to ne samo kod biljaka, već i kod životinja (Sakakibara, 2006). Najčešći oblik u kojem se citokinini javljaju kao modifikovani adenin u molekulima tRNK je cZ (Stirk i sar. 2012). Iako je pokazano da kod mahovina, kao što je *Physcomitrella patens*, *cis*-zeatinski citokinini vode većinsko poreklo iz molekula tRNK (von Schwartzenberg i sar. 2007), kod vaskularnih biljaka to verovatno nije slučaj (Stirk i sar. 2012).

1.4.4. Biosinteza citokinina

Citokinini se sintetisu u meristemskim tkivima biljaka, uključujući vršni meristem izdanka, mlade listove, kambijalni region, ali u najznačajnijoj meri sintetisu se u vršnom meristemu korena (Nooden i Letham, 1993). Ključni enzim u sintezi izoprenoidnih citokinina je *izopentenil-transferaza* (IPT), čiji je supstrat *dimetil-alil-difosfat* (DMAPP) (Kakimoto, 2001). Izopentenil-transferaza vrši transfer izopentenil-grupe sa DMAPP na AMP, ADP ili ATP, čime se dobija izopentenil-adenin-ribonukleotid-monofosfat, -difosfat ili -trifosfat (iPRMP, iPRDP odnosno iPRTP), čijom defosforilacijom nastaju biološki aktivni iPR i iP (Sakakibara, 2006).

DMAPP je izoprenska jedinica koja je prekursor za biosintezu terpenoidnih jedinjenja i nastaje kao produkt u dva biosintetička puta: metil-eritritolfosfatnom (MEP) i mevalonatnom (MVA) putu. U citosolu se biosinteza terpenoidnih jedinjenja odvija MVA putem, a u plastidima MEP putem (Yu i Utsumi, 2009). Iako je pokazano da je kod *Arabidopsis thaliana* DMAPP ugrađen u iP prevashodno poreklom iz MEP puta, nije isključeno da bi pod drugačijim sredinskim uticajima MVA put mogao imati značajniju ulogu u biosintezi citokinina, pogotovo cZ (Ástot i sar. 2000). Prema različitim modelima, u ovakvom nastanku molekula *cis*-zeatinskog tipa DMAPP poreklom iz MVA puta može biti prenet na adeninski nukleotid ugrađen u molekul tRNK (Kasahara i sar. 2004) ili na slobodni ADP ili ATP (Ástot i sar. 2000) u procesu koji ne uključuje sintezu iPRDP ili iPRTP kao intermedijera ("iP-nezavisni biosintetski put"), već se cZRDP, odnosno cZRTP sintetise direktno. Ovi modeli biosinteze *cis*-zeatinskih citokinina ipak još uvek nisu široko prihvaćeni i sinteza *cis*-zeatina zahteva dodatno rasvetljavanje (Stirk i sar. 2012).

Izvesno je da se u osnovnom putu sinteze *trans*-zeatina kod viših biljaka iP-monofosfat i -difosfat (iPRMP i iPRDP; ali ne i trifosfat iPRTP) hidroksiluju pomoću membranskih monooksigenaza (CYP735A1 i CYP735A2) kuplovanih sa citohromom P₄₅₀, te nastaje *tZRMP*, odnosno *tZRDP* (Takei i sar. 2004b). Dugo je važno verovanje da interkonverziju između *cZ* i *tZ*, odnosno *cZR* i *tZR* vrši enzim zeatin-*cis-trans* izomeraza, ali nedavno je pokazano da je malo verovatno da se ovakav proces odvija u biljkama *in vivo* (Gajdošová i sar. 2011). Monooksigenaze verovatno deluju i na aromatične citokinine prevodeći BA u *orto*- ili *meta*-topolin hidroksilacijom bočne benzil-grupe u *orto*- ili *meta*-položaju (Takei i sar. 2004b).

U genomu *Arabidopsis thaliana* otkriveno je 9 različitih gena koji kodiraju izopentenil-transferazu (*AtIPT1-9*). *AtIPT2* predstavlja *tRNA-IPT*, a *AtIPT9* kodira protein sličan *tRNA-ipt* pronađenom kod cijanobakterija. Preostalih sedam *AtIPT* gena imaju biološku funkciju sinteze citokinina, sa različitom tkivnom specifičnošću (Miyawaki i sar. 2004). Podaci o tkivno-specifičnoj ekspresiji gena koji učestvuju u biosintezi, ali i katabolizmu citokinina ukazuju sve više na lokalno – parakrino, ili čak autokrino delovanje citokinina (Miyawaki i sar. 2004), koje pruža alternativu klasičnom endokrinom modelu prema kojem se citokinini sintetišu isključivo u korenu (Nooden i Letham, 1993). Na subćelijskom nivou, različite izoforme IPT su detektovane u različitim subćelijskim odeljcima, ali je ukupna količina ovih enzima najznačajnija u plastidima, što znači da plastidi predstavljaju najznačajnije organele za biosintezu citokinina (Kakimoto, 2001). Još uvek nisu poznati mehanizmi translokacije citokinina kroz membrane plastida u citosol.

Gen za izopentenil-transferazu se, osim kod biljaka, nalazi i na Ti-plazmidu kod *Agrobacterium tumefaciens*. Specifičnost bakterijske izopentenil-transferaze ogleda se u tome što kao supstrat za transfer izopentenil-grupe ne koristi ADP i

ATP, već AMP. Slična specifičnost konstatovana je i kod gena *tRNA-ipt* prisutnog kod cijanobakterija. Bakterijska izopentenil-transferaza takođe je sposobna da umesto DMAPP koristi HMBDP (hidroksimetil-butenil-difosfat), čijim transferom na molekul AMP se dobija direktno *tZRMP* (Sakakibara i sar. 2005). Na ovaj način bakterija izbegava regulatorne mehanizme domaćina, koji bi mogli inhibirati konverziju *iPRMP* i *iPRDP* u *tZRMP*, odnosno *tZRDP*.

Do danas nisu poznati putevi biosinteze aromatičnih citokinina, ali se smatra da su oni nezavisni od biosintetskih puteva izoprenoidnih citokinina (Strnad, 1997).

1.4.5. Katabolizam citokinina

Ireverzibilnu degradaciju citokinina uklaňanjem bočne izoprenske grupe vrše enzimi iz klase citokinin-oksidaža/dehidrogenaza (CKX). Na dejstvo CKX osetljivi su *tZ*, *iP* i njihovi nukleozidi, ali ne i nukleotidi, *O*-glukozidi, *N*⁷-glukozidi kao ni DHZ i njegovi konjugati. *Cis*-zeatin je manje osetljiv na citokinin-oksidažnu aktivnost nego *tZ* i *iP* (Bilyeu i sar. 2001; Galuszka i sar. 2007; Stirk i sar. 2012). Nasuprot uvreženim verovanjima, nedavno je otkriveno (Galuszka i sar. 2007) da aromatični citokinini, kao i *N*⁹-glukozidi, *O*-acetil-citokinini, kao i citokininski fosfati (*iPRMP*) mogu biti supstrati za CKX.

Po strukturi, enzim CKX iz kukuruza je flavoprotein kod kojeg je kofaktor flavinadenin dinukleotid (FAD) kovalentno vezan za ZmCKX apoprotein (Popelková i sar. 2004). Aktivnost CKX indukovana je povišenom količinom supstrata-citokinina, i makar delimično povišenom količinom iRNK određenih gena koji učestvuju u njihovoj sintezi (Brugière i sar. 2003). Kod *A. thaliana* otkriveno je sedam gena za citokinin oksidažu/dehidrogenazu, označenih sa

AtCKX1-7, koji pokazuju različite obrasce ekspresije i lokalizacije, kako na tkivnom, tako i na subćelijskom nivou (Werner i sar. 2003). Pojedini *AtCKX* geni se eksprimiraju u istom tkivu ili u neposrednoj blizini tkiva koje sintetiziraju citokinine, kao što su aksilarni pupoljci, trihomi i vaskularna tkiva, što ukazuje na veoma lokalizovano (autokrino ili parakrino) dejstvo citokinina.

1.4.6. Regulacija metabolizma citokinina

Citokininska homeostaza određena je ravnotežom između njihove biosinteze, katabolizma i modifikacija bočnih lanaca koje menjaju njihovu fiziološku aktivnost.

Citokinini mogu regulisati sopstveni nivo na različite načine. Najpre, prisustvo citokinina može mehanizmom negativne povratne sprege snižavati ekspresiju gena *AtIPT1*, 3, 5 i 7 (Miyawaki i sar. 2004). Pored toga, prisustvo citokinina vodi povećanju aktivnosti citokinin oksidaze/dehidrogenaze (Motyka i sar. 2003; Brugière i sar. 2003). Najzad, prilikom uspostavljanja apikalnih meristema izdanka biosinteza citokinina se može permanentno uključiti mehanizmom pozitivne povratne sprege između biosinteze citokinina i ekspresije transkripcionog faktora STM koji igra važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa (Rupp i sar. 1999; Jasinski i sar. 2005; Yanai i sar. 2005).

U regulaciji aktivnosti enzima citokininskog metabolizma pored citokinina učestvuju i auksini, abscisinska kiselina (ABA) i brasinosteroidi. Geni *AtIPT5* i *AtIPT7* su pozitivno regulisani auksinima (Miyawaki i sar. 2004). Auksini međutim mogu i negativno regulisati biosintezu citokinina (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004; Shimizu-Sato i sar. 2009; Jones i sar. 2010; Liu i sar. 2010). Ekspresija gena *CYP735A1* i *CYP735A2* u korenu stimulirana je prisustvom citokinina, a inhibirana

prisustvom auksina ili ABA (Takei i sar. 2004b). Podaci o auksinskoj regulaciji aktivnosti CKX međusobno su kontradiktorni i najverovatnije je da je smer delovanja auksina na CKX tkivno i razvojno specifičan (Rashotte i sar. 2005). Kod kukuruza, ekspresija gena *ZmCKX* stimulisana je prisustvom citokinina ili ABA (Brugière i sar. 2003). Brasinosteroidi negativno regulišu ekspresiju i aktivnost CKX kod pšenice (Yuldashev i sar. 2012).

U poslednje vreme sve je više podataka i o pozitivnoj regulaciji nivoa slobodnih citokinina od strane azota u formi nitrata, ali i amonijuma (Miyawaki i sar. 2004; Takei i sar. 2004a). Sulfati i fosfati takođe pozitivno utiču na ekspresiju *AtIPT3* (Takei i sar. 2004a).

1.4.7. Transport citokinina

Transport citokinina sintetisanih u vršnom meristemu korena vrši se kroz ksilem u nadzemne delove biljke (Nooden i Letham, 1993). Pošto je njihova biosinteza pozitivno regulisana nitratima (Miyawaki i sar. 2004; Takei i sar. 2004a), transport citokinina kroz ksilem obezbeđuje prenošenje informacije o dostupnosti azota u obliku nitrata u nadzemne delove biljke. Kako od dostupnosti nitrata zavisi biosinteza proteina, ova informacija je od izuzetnog značaja za celokupni metabolički i signalni status biljke. Otuda ne treba da čudi što citokinini dele biosintetske i transportne puteve u biljnom organizmu sa adeninskim bazama i nukleozidima, gradivnim blokovima čije se prisustvo vezuje za rastenje (Hirose i sar. 2008).

Najznačajniji putevi transporta citokinina kod biljaka su ksilemski transport *tZR* i floemski transport *iPR* (Nooden i Letham, 1993). Transport citokinina kroz membrane vrše membranski transporteri iz familije purinskih permeaza (PUP) i

uravnoteženih nukleozidnih transportera ("*equilibrated nucleoside transporters*" – ENT). Ovi membranski transporteri omogućavaju utovar citokininskih molekula u vaskularna tkiva i istovar iz vaskularnih u ciljna tkiva. Purinske permeaze vrše transport slobodnih citokininskih baza, ali i adenina i njegovih derivata, kao što je kofein. Kod *A. thaliana* postoje dve purinske permeaze sa različitim afinitetima za *tZ* i *iP*, od kojih jedna učestvuje u ksilemskom a druga u floemskom transportu citokinina (Bürkle i sar. 2003). Međutim, najveći deo transporta citokinina na velike razdaljine vrši se pomoću transportera iz familije ENT, koji vrše transport ribozida, ali i adenzina (Li i sar. 2003, Hirose i sar. 2005).

Kada je u pitanju intracelularni transport citokinina, još uvek nije poznato na koji način i u kojoj formi se citokinini transportuju iz plastida gde je njihovo najvažnije mesto sinteze, u citosol (Kakimoto, 2001). Nepoznati su i mehanizmi koji učestvuju u translokaciji citokinina u centralnu vakuolu koja nakuplja citokininske glukozide. Pretpostavlja se da i u ovom slučaju citokinini koriste transportne mehanizme namenjene derivatima adenina (Sakakibara, 2006).

1.4.8. Recepcija i transdukcija citokininskog signala

Vezivanje citokinina za citokininske receptore na membrani biljne ćelije pokreće signalnu kaskadu tipa fosforeleja (Hwang i Sheen, 2001); ovakve signalne kaskade, u nešto jednostavnijem obliku, prethodno su opisane kod bakterija kao *dvokomponentni signalni sistem* (Parkinson, 1993).

Sistem recepcije i transdukcije citokininskog signala kod biljaka sastoji se od sledećih elemenata:

- citokininskih transmembranskih receptora;
- histidin-fosfotransferaza (Hpt, odnosno AHP proteini);

- regulatora citokininskog odgovora (ARR proteini tipa A i tipa B);
- faktora citokininskog odgovora (CRF proteini) i
- drugih efektorskih komponenti.

Svi ovi elementi i njihove interakcije detaljno su opisani na primeru *Arabidopsis thaliana* kao model sistemu (Hwang i Sheen, 2001). Prenos signala sa receptora na "nizvodne" regulatorne elemente počiva na fosforilacijskoj kaskadi u kojoj se fosfatni ostatak naizmenično prenosi između histidinskih (His) i aspartatnih (Asp) ostataka regulatornih proteina koji učestvuju u signalnoj kaskadi.

Do sada su opisana tri citokininska transmembranska receptora: AHK2, AHK3 i AHK4/CRE1/WOL1. Identifikaciji prvog od njih, AHK4/CRE1, prethodilo je otkriće mutantne linije *A. thaliana* za ovaj gen (*WOL1* = "*WOODEN LEG1*"), kod koje se ne razvija floem u korenu (Mähönen i sar. 2000). Citokininski receptori se javljaju u membrani kao homodimeri. Prema modelu koji su predložili Hwang i Sheen (2001), citokinin se vezuje za njihov ekstracelularni CHASE ("Cyclase/His-kinase-Associated Sensing Extracellular") domen. Vezivanje citokinina za ekstracelularni CHASE domen aktivira His-kinaznu aktivnost intracelularnog domena koji se autofosforiliše, a zatim svoj fosfat prenosi na Asp ostatak prijemnog ("receiver") domena koji se takođe nalazi na intracelularnom segmentu receptora.

Prenos fosfatnog ostatka se dalje vrši na His ostatak histidin-fosfotransferaze (Hpt, odnosno AHP protein), koja predstavlja sledeći signalni molekul u kaskadi. Kod *Arabidopsis thaliana* je identifikovano pet pravih AHP proteina (AtAHP1-5), kao i jedan pseudo-AHP (AtAHP6) koji sadrži aminokiselinsku supstituciju u konzerviranom His domenu (Mähönen i sar. 2006).

Fosforilacija aktivira migraciju AHP u nukleus, gde AHP dalje fosforilišu Asp ostatke "nizvodnih" efektoru – regulatora citokininskog odgovora (ARR proteina).

U citokininskoj signalnoj kaskadi, "nizvodno" od AHP proteina nalaze se ARR proteini. Za sve ARR proteine zajedničko je da sadrže tzv. "molekulski prijemnik", odnosno Asp ostatak koji može biti fosforilovan od strane AHP proteina. Međutim, ARR proteini se među sobom razlikuju po strukturi, te razlikujemo ARR proteine tipa A, B i C, kao i pseudo-ARR proteine (APRR) koji su slični ARR proteinima ali ne mogu biti fosforilovani i nisu regulisani citokininima već učestvuju u regulaciji cirkadijalnog ritma (McClung, 2006). Kod *A. thaliana* otkriveno je 10 ARR proteina tipa A (ARR3-9 i ARR15-17), 11 ARR proteina tipa B (ARR1-2, ARR10-14 i ARR18-21), 2 ARR proteina tipa C (ARR22 i ARR24) kao i 9 APRR proteina (To i Kieber, 2008).

ARR proteini tipa A i B razlikuju se kako po strukturi, tako i po funkciji (Hirose i sar. 2008; To i Kieber, 2008). Dok ARR proteini tipa A imaju jednostavnu građu i sadrže samo domen sa molekulskim prijemnikom – Asp ostatkom koji prima fosfat sa AHP proteina, ARR proteini tipa B pored "molekulskog prijemnika" na N-terminusu, imaju i C-terminalni DNK-vezujući domen koji je regulisan N-terminalnim domenom. U nefosforilovanom stanju, N-terminalni domen funkcioniše kao represor i ne dozvoljava vezivanje ARR proteina tipa B za DNK. Kada dođe do fosforilacije regulatornog domena primanjem fosfata sa His ostatka AHP-proteina, C-terminalni domen može da veže DNK, delujući kao transkripcioni faktor. Njegova aktivacija dovodi do pojačane transkripcije gena za ARR proteine tipa A, kao i gena za faktore citokininskog odgovora ("Cytokinin Response Factors – CRF"; Rashotte i sar. 2003).

ARR proteini tipa A su negativni regulatori citokininskog odgovora. Fosforilacija Asp ostatka je neophodna ne samo za aktivnost već i za stabilnost ovih proteina (To i sar. 2007). Do danas je poznato da oni mehanizmom negativne povratne sprege deluju na različite elemente citokininske signalne kaskade. Ova negativna povratna sprega verovatno deluje na više nivoa, a za sada postoje dokazi da ona uključuje represiju transkripcije gena za citokininske receptore i transkripcione faktore regulisane citokininima (Lee DJ i sar. 2007). ARR proteini tipa A takođe deluju inhibitorno na meristemsku aktivnost (Buechel i sar. 2010) i regulišu percepciju svetla i cirkadijalni ritam biljaka (Sweere i sar. 2001).

"Nizvodno" od ARR proteina tipa B u citokininskoj signalnoj kaskadi nalaze se geni za faktore citokininskog odgovora ("Cytokinin Response Factors - CRF"), koji su upravo i otkriveni kao geni čiju transkripciju indukuju ARR proteini tipa B. Kod *A. thaliana* je otkriveno šest ovih gena, *CRF1-CRF6* (Rashotte i sar. 2003). Aktivacija citokininske signalne kaskade stimuliše migraciju proteinskih produkata CRF u nukleus, gde deluju kao transkripcioni faktori. Oni zajedno sa ARR proteinima tipa B stimulišu transkripciju niza gena odgovornih za efektorske funkcije citokininskog odgovora, kao što su razviće izdanka i korena, deetiolacija etioliranih izdanaka, ekspanzija listova, diferencijacija vaskularnih tkiva u korenu, regulacija senescencije i citokininska homeostaza (Rashotte i sar. 2006).

1.4.9. Interakcija citokininske signalizacije sa signalnim putevima svetlosti

Poznato je da citokinini deluju kao modulatori nekih fotomorfogenetskih procesa kod *Arabidopsis thaliana* (Lau i Deng, 2010). Oni izazivaju deetiolaciju kontrolnih klijanaca *A. thaliana* gajenih u mraku, dajući efekat sličan onom koji se spontano javlja kod *det* mutanta za signalnu transdukciju svetlosti (Chory i sar. 1994). Pored toga, mutantna linija *A. thaliana* za sintezu fitohroma B, *phyB-1*,

neosetljiva je na citokinine u testu izduživanja hipokotila, što znači da je PHYB neophodan da bi citokinini ostvarili inhibitorno dejstvo na izduživanje hipokotila (Su i Howell, 1995).

Kod spanaća (*Spinacia oleracea*) gen za značajan fotosintetički enzim, ATP-sintazu podleže i citokininskoj transkripcionoj regulaciji, osim što je regulisan svetlošću. Na taj način citokinini učestvuju u regulaciji fotosinteze kod ove biljne vrste (Kusnetsov i sar. 1999).

Istraživanja na molekularnom nivou pokazala su da citokinini povećavaju osetljivost biljaka na svetlosni stimulus. Pre svega, jedan od regulatora citokininskog odgovora *A. thaliana*, ARR4, sposoban je da interaguje sa fitohromom B, stabilizujući ga u njegovoj aktivnoj formi, Pfr (Sweere i sar. 2001). Pokazano je da je preduslov za ovu interakciju citokinin-zavisna fosforilacija aminokiselinskog ostatka Asp95 na molekulu ARR4 (Mira-Rodado i sar. 2007). Transgene biljke *A. thaliana* koje prekomerno eksprimiraju gen *ARR4*, pokazuju pojačanu osetljivost na crvenu svetlost (Sweere i sar. 2001). Interakcija između ARR4 i PHYB može biti od značaja, između ostalog, u regulaciji dnevno-noćnog ritma kod *A. thaliana* (Hanano i sar. 2006; Salomé i sar. 2006; Zheng i sar. 2006).

Citokinini deluju na svetlosnu signalnu kaskadu i stabilizacijom proteina HY5, koji predstavlja pozitivni regulator gena indukovanih svetlošću i učestvuje u transdukciji signala nizvodno od fitohroma i kriptohroma (Vandenbussche i sar. 2007). Mutantna linija *A. thaliana hy5*, koja ne eksprimira gen za ovaj protein, neosetljiva je na citokinine (Cluis i sar. 2004). Protein HY5 vrši finu regulaciju fotomorfogenetskih procesa posredovanih auksinima, giberelinima, apscisinskom i jasmonsom kiselinom i etilenom, što ga čini izuzetno značajnim integritom

svetlosnih i hormonskih signalnih puteva (Lee J i sar. 2007; Lau i Deng, 2010; Argueso i sar. 2010).

Osim što citokinini učestvuju u modulaciji signalne kaskade zavisne od svetlosti – delovanjem na PHYB i HY5, postoji i dejstvo obrnutog smera. Jedan od transkripcionih faktora iz svetlosne signalne kaskade, PIL5, interferira sa citokininskom signalnom kaskadom, inhibirajući ekspresiju tri gena za faktore citokininskog odgovora (*CRF1*, *CRF2* i *CRF3*), ali i stimulišući ekspresiju gena za jednu histidin-fosfotransferazu, *AHP5* (Oh i sar. 2009). Na ovaj način svetlost, kao jedan od osnovnih regulatornih faktora rastenja i razvića biljaka, ostvaruje modulaciju citokinin-zavisnih regulatornih puteva (Argueso i sar. 2010).

Regulatorni elementi koji učestvuju u citokininskoj signalizaciji povezani su i sa drugim signalnim putevima biljaka. Na primer, pokazano je da dominantno aktivne mutacije pojedinih ARR proteina tipa B imaju dramatične i plejotropne efekte na signalnu transdukciju auksina i etilena, percepciju biotičkog i abiotičkog stresa, fotomorfogenezu, metabolizam proteina i drugo (Tajima i sar. 2004; Hass i sar. 2004). Izgleda da su elementi citokininske signalne transdukcije zajednički i za brojne druge signalne puteve i da učestvuju u kompleksnoj integraciji raznorodnih signala koje biljka prima iz spoljašnje i unutrašnje sredine. Tkivna i razvojna specifičnost ekspresije pojedinih elemenata ovih signalnih puteva neophodne su za specifičnost odgovora biljke na stimulse koji pristižu različitim signalnim putevima, ali interferencija između signalnih puteva omogućava biljci da proširi moguć opseg odgovora na određeni stimulus iz spoljašnje ili unutrašnje sredine, što je čini adaptabilnijom (Grefen i Harter, 2004). Naučnici su počeli da sagledavaju značaj unakrsne komunikacije između različitih signalnih puteva kod biljaka; detalji međusobne povezanosti signalnih puteva tek su počeli da se ocrtavaju.

1.5. Citokinin oksidaza/dehidrogenaza (CKX)

Citokininska homeostaza je prvenstveno određena ravnotežom između biosinteze i katabolizma citokinina, odnosno između aktivnosti izopentenil-transferaze (IPT, EC 2.5.1.27), koja je najvažniji enzim u biosintetičkom putu citokinina, i citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX, EC 1.4.3.18/1.5.99.12), koja je noseći enzim citokininskog katabolizma. Ovaj enzim vrši ireverzibilnu degradaciju citokinina specifičnim isecanjem nezasićenih bočnih lanaca izoprenoidnih citokinina.

Po strukturi, CKX je flavoprotein koji kao kofaktor sadrži flavin adenin dinukleotid (FAD) kovalentno vezan za jedan histidinski ostatak (Frébortová i sar. 2004; Popelková i sar. 2006). Isprva je CKX klasifikovan kao oksidaza, jer se verovalo da ulogu akceptora elektrona prilikom regeneracije oksidovanog FAD-a igra molekularni kiseonik. Kasnija kinetička istraživanja pokazala su da kiseonik nije efikasan akceptor elektrona u ovoj reakciji (Galuszka i sar. 2001) i da do transfera elektrona u fiziološkim uslovima dolazi najverovatnije redukcijom pojedinih hinona – otuda je CKX reklasifikovan kao "oksidaza/dehidrogenaza" (Frébortová i sar. 2004).

Kod različitih vrsta viših biljaka, proteini CKX su kodirani promenljivim brojem gena koji čine male genske familije (Schmülling i sar. 2003; Werner i sar. 2006). Tako je u genomu *Arabidopsis thaliana* identifikovano i klonirano sedam gena za CKX, označenih kao *AtCKX1* do *AtCKX7* (Bilyeu i sar. 2001; Werner i sar. 2001). Ovi geni kodiraju izoforme enzima *AtCKX* koje se međusobno razlikuju po lokalizaciji. Proteini *AtCKX1* i *AtCKX3* raspoređuju se u vakuolu, dok *AtCKX2*, *AtCKX4*, *AtCKX5* i *AtCKX6* podležu sekreciji i svoju funkciju vrše u apoplastu

(Werner i sar. 2003). Zbog nepostojanja N-terminalnog signalnog peptida (Bae i sar. 2008), smatra se da je AtCKX7 citosolni protein (Kowalska i sar. 2010).

Do sada, geni za CKX su izolovani i klonirani i iz genoma kukuruza (Houba-Hérin i sar. 1999; Morris i sar. 1999; Bilyeu i sar. 2001; Šmehilová i sar. 2009), pšenice (Galuszka i sar. 2001; Feng i sar. 2008; Zhang i sar. 2012), orhideja roda *Dendrobium* (Yang i sar. 2002; 2003; Wang i sar. 2009) i ječma (Galuszka i sar. 2004). U poslednje vreme identifikovan je veliki broj kodirajućih sekvenci kod različitih biljnih vrsta, čiji su proteinski produkti putativni CKX proteini (Gu i sar. 2010). Mehanizam i kinetika citokinin oksidazne/dehidrogenazne aktivnosti određeni su u potpunosti za enzim ZmCKX1 izolovan iz kukuruza, kao i njegova kristalna struktura (Frébortová i sar. 2004; Malito i sar. 2004; Popelková i sar. 2006). Pored toga, mehanizam i kinetika aktivnosti CKX određeni su i kod enzima iz *Arabidopsis thaliana*, i to AtCKX1, AtCKX3, AtCKX7 (Kowalska i sar. 2010) i AtCKX2 (Frébortová i sar. 2007). Objavljena je i kristalna struktura proteina AtCKX7 (Bae i sar. 2008).

1.5.1. Istraživanja efekata ekspresije transgena CKX na citokininsku homeostazu

Geni koji kodiraju CKX u poslednje vreme se koriste u istraživanjima citokininske homeostaze, za transformaciju homologih ili heterologih biljnih vrsta "sense" ili "antisense" konstruktima. Tako je efekat transgene ekspresije gena *AtCKX* na citokininski metabolizam, profil endogenih citokina, kao i procese rastezanja i razvića biljaka do sada proučavan na duvanu (Werner i sar. 2001), *Arabidopsis thaliana* (Werner i sar. 2003), mahovini *Physcomitrella patens* (von Schwartzberg i sar. 2007) i kičici (Milana Trifunović i saradnici, neobjavljeni rezultati). Nedavno su objavljeni i rezultati transformacije krompira (sorta "Solara") genom *AtCKX1*, u

istraživanju interakcija citokinina i giberelina u procesu klijanja krtola (Hartmann i sar. 2011).

Ekspresija transgena *AtCKX* u biljkama duvana i *A. thaliana* sistematski je uzrokovala niz efekata na morfologiju transgenih biljaka, što je u literaturi označeno kao "sindrom citokininske deficijencije" (Werner i sar. 2001; 2003). Ove biljke su se odlikovale smanjenom dužinom izdanka, smanjenom površinom lista, odloženom senescencijom listova, zakasnelim cvetanjem i/ili smanjenim brojem cvetova, smanjenjem vršnog meristema izdanka i njegove aktivnosti, povećanjem vršnog meristema korena i njegove aktivnosti i pojačanim rastenjem primarnih korenova. Ovi simptomi su bili izraženiji kod biljaka duvana i *A. thaliana* koje su eksprimirale transgen *AtCKX1* nego kod onih koje su eksprimirale *AtCKX2*, iako je ekspresija *AtCKX2* imala veći efekat na pojačanje aktivnosti CKX i sniženje endogenog nivoa bioaktivnih citokinina u tkivima transformisanih biljaka, u odnosu na ekspresiju *AtCKX1* (Werner i sar. 2001; 2003). Smanjena dužina izdanka, izmenjena morfologija listova i zakašnjenje u klijanju krtola zabeleženi su kod biljaka krompira transformisanih genom *AtCKX1* i gajenih u zemljištu (Hartmann i sar. 2011).

Radi poređenja funkcije citokinin oksidaze/dehidrogenaze iz *Arabidopsis thaliana* i odgovarajućih enzima drugih biljnih vrsta, biljke *A. thaliana* su transformisane genima *HvCKX2* i *HvCKX3* iz ječma (Galuszka i sar, 2004), odnosno genom *ZmCKX1* iz kukuruza (Kopečný i sar, 2006).

Istraživanja funkcije citokinin oksidaze/dehidrogenaze našla su svoju primenu i u biotehnologiji. Tokom protekle decenije razvijen je model povećanja prinosa kod komercijalno značajnih vrsta žitarica, konstrukcijom transgenih biljaka koje eksprimiraju "antisense" iRNK homologih gena za citokinin

oksidazu/dehidrogenazu. Prve transgene žitarice kod kojih je na ovaj način uspešno ostvareno povećanje prinosa bili su pirinač (Ashikari i sar. 2005) i ječam (Zalewski i sar. 2010), a sličan pristup može uskoro biti primenjen i na pšenicu (Zhang i sar. 2012).

1.5.2. Regulacija ekspresije gena i enzimske aktivnosti citokinin oksidaze/dehidrogenaze

Aktivnost citokinin oksidaze/dehidrogenaze pozitivno je regulisana dostupnošću citokinina kao enzimskog supstrata (Motyka i sar. 2003). Pored toga, pokazano je da citokinini pozitivno regulišu transkripciju gena *ZmCKX1* kod kukuruza (Brugière i sar. 2003). Pretpostavlja se da mehanizam negativne povratne sprege predstavlja univerzalan princip kada je u pitanju regulacija endogenog nivoa citokinina kod biljaka (Werner i sar. 2006).

Kada su u pitanju auksini, postoje podaci kako o pozitivnoj, tako i o negativnoj regulaciji aktivnosti CKX ovim fitohormonima, pa je verovatno da su regulatorni mehanizmi kompleksni i da, barem u slučaju auksina, smer regulacije može biti tkivno i/ili razvojno specifičan (Rashotte i sar. 2005). Egzogeno primena auksina uzrokovala je smanjenje aktivnosti CKX u klijancima rotkvice (Blagoeva i sar. 2004). Međutim, pokazano je da auksini utiču na uspostavljanje apikalne dominacije kod graška, između ostalog i stimulacijom ekspresije gena *PsCKX2* (Shimizu-Sato i sar. 2009). Kod *Arabidopsis thaliana*, transkripcija gena *AtCKX* je pozitivno (Redman i sar. 2004; Carabelli i sar. 2007) ili negativno (Rashotte i sar. 2005) regulisana auksinima.

Osim citokinina i auksina, ekspresija i aktivnost enzima CKX mogu biti regulisani i abscisinskom kiselinom i brasinosteroidima. Kod kukuruza,

transkripcija gena *ZmCKX1* stimulirana je prisustvom ABA (Brugière et al., 2003). Stimulativno dejstvo ABA na CKX pokazano je i kod klijanaca pšenice (Vysotskaya i sar. 2010). Kod *A. thaliana*, ABA selektivno stimuliše ili inhibira ekspresiju različitih gena familije *AtCKX* (Nishiyama i sar. 2011). Brasinosteroid 24-epibrasinolid negativno reguliše aktivnost CKX, kao i transkripciju gena za CKX u klijancima pšenice (Yuldashev i sar. 2012).

2. CILJ RADA

Osnovni cilj ovog rada bio je utvrđivanje efekata promjenjene citokininske homeostaze, kao posledice povećane aktivnosti enzima citokinin oksidaze/dehidrogenaze koji katalizuje ireverzibilnu degradaciju citokinina, na morfološke i fiziološke parametre transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Od posebnog značaja je bilo utvrditi kako izmenjena citokininska homeostaza utiče na proces tuberizacije *in vitro*. Realizacija ovog cilja izvršena je kroz nekoliko zadataka:

1. Genetička transformacija krompira pomoću dva soja *A. tumefaciens* (GV3101) koji nose gen *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2* u cilju dobijanja transgenih biljaka sa sniženim nivoom endogenih citokinina kao i dokazivanje uspešnosti transformacije.
2. Ispitivanje ekspresije *AtCKX1* i *AtCKX2* gena kao i aktivnosti enzima citokinin oksidaze/dehidrogenaze u izdancima i korenovima transformisanih i kontrolnih netransformisanih biljaka krompira *in vitro*.
3. Hemijska identifikacija i kvantifikacija različitih grupa citokinina i indol-sirćetne kiseline (IAA) u izdancima i korenovima transformisanih i kontrolnih netransformisanih biljaka krompira *in vitro*.
4. Analiza uticaja promena u citokininskoj homeostazi na odabrane morfološke parametre, sa posebnim osvrtom na parametre tuberizacije kod biljaka krompira transformisanih genima *AtCKX1* i *AtCKX2* gajenih *in vitro*, u uslovima dugog dana ili kontinuiranog mraka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Kao eksperimentalni materijal u ovom radu korišćeni su izdanci krompira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) gajeni u kulturi *in vitro*. Kultura izdanaka je uspostavljena iz izbojaka krtola čuvanih u mraku, poreklom od bezvirusne linije (Institut "PKB Agroekonomik", Beograd). Kao početni materijal za uspostavljanje kulture izdanaka krompira *in vitro* upotrebljeni su vrhovi izbojaka dužine ~ 5 mm.

Površinska sterilizacija polaznog materijala izvršena je na sledeći način:

- ispiranje pod mlazom česmene vode, tokom 30 minuta
- snažno mućkanje sa 70% rastvorom etanola, uz dodatak nekoliko kapi deterdženta, tokom 1 minuta
- ispiranje pod mlazom česmene vode, tokom 5 minuta
- sterilizacija 20% rastvorom komercijalnog preparata natrijum hipohlorita, sa 4% aktivnog hlora, tokom 10 minuta
- ispiranje sterilnom dejonizovanom vodom, 5 puta

Nakon sterilizacije vrhovi izbojaka (dužine oko 5 mm) su izolovani i u sterilnim uslovima preneti na čvrstu osnovnu hranljivu podlogu (BM, tabela 1) kojoj je dodato $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,89 \text{ }\mu\text{M}$) benzil-aminopurina (BA, Sigma, St. Louis, MO, SAD). Osnovna hranljiva podloga označena kao bazalni medijum (BM) pored agara, saharoze i mio-inozitola (tabela 1) sadržala je makro i mikro soli kao i kompleks gvožđa (Murashige i Skoog, 1962; MS, tabela 2) i vitamine (Linsmaier i Skoog, 1965; tabela 3).

Tabela 1. Sastav čvrste osnovne hranljive podloge (BM) za gajenje izdanaka krompira *in vitro*.

Sastojak	koncentracija (g L ⁻¹ podloge)
agar (Institut "Torlak", Beograd)	7,0
saharoza	30,0
mio-inozitol (Sigma)	0,1
mineralne soli MS (Murashige i Skoog, 1962)	tabela 2
vitamini (Linsmaier i Skoog, 1965)	tabela 3

Tabela 2. Sastav mineralnih soli MS (Murashige i Skoog, 1962).

MS Makro soli	koncentracija (mg L ⁻¹ podloge)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
MS Mikro soli	koncentracija (mg L ⁻¹ podloge)
MnSO ₄ x H ₂ O	16,90
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
KJ	0,83
NaMoO 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	27,85
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,20

Tabela 3. Sastav rastvora vitamina (Linsmaier i Skoog, 1965).

Vitamini	koncentracija (mg L ⁻¹ podloge)
vitamin B ₁	0,4
vitamin B ₆	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	2,0

Izdanci koji su se potom formirali gajeni su i multiplikovani na istoj podlozi jednom mesečno tokom tri meseca, a zatim su preneti na čvrstu BM podlogu bez regulatora rastenja. Za multiplikaciju su korišćeni odsecci izdanka sa po jednim nodusom i listom.

3.1.1. Održavanje kultura izdanaka krompira *in vitro*

Kulture izdanaka su obnavljane na svakih 30 dana prenošenjem eksplantata (odsečaka izdanka sa po jednim nodusom i listom) na podlogu BM, u akseničnim uslovima. Podloge, instrumenti za rad i laboratorijsko posuđe sterilisani su prema standardnim procedurama kulture biljaka *in vitro*, a rad sa biljnim materijalom obavljan je u akseničnim uslovima u laminarnoj komori (Termovent, Užice). Prilikom supkultivacije, u svaku Erlenmeyer-bočicu sa po 50 mL podloge postavljano je po pet eksplantata poreklom od iste kontrolne ili transformisane linije. Za zatvaranje sudova sa kulturama korišćeni su zapašaci od vate i gaze. Kulture izdanaka su gajene u komori sa kontrolisanim uslovima: temperatura 25 ± 2°C; fotoperiod od 16 sati svetlosti i 8 sati mraka – dugi dan (DD); bela svetlost fluorescentnih lampi ("Tesla", Pančevo, 65W, 4500 K); gustina svetlosnog fluksa 47 ± 2 μmol m⁻² s⁻¹. U svim eksperimentima kulture izdanaka krompira su gajene u

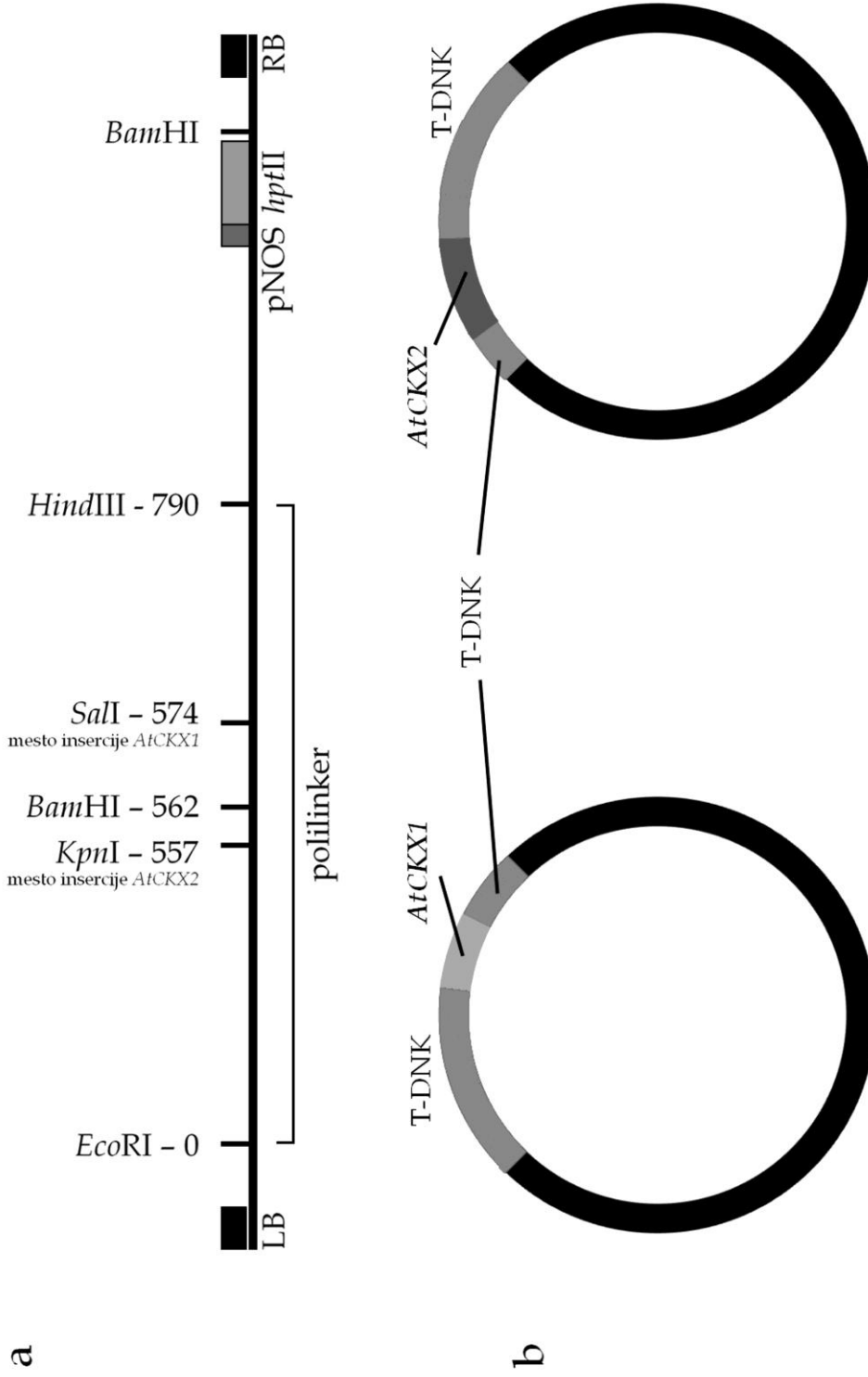
istim standardnim uslovima (temperatura i svetlosni fluks), osim kultura koje su gajene u kontinuiranom mraku. Za eksperimente u kulturi *in vitro* korišćeni su odsecci izdanaka sa jednim nodusom i listom iz ovako dobijenih kultura.

3.2. Genetička transformacija krompira

3.2.1. Konstrukti korišćeni za genetičku transformaciju

Za transformaciju biljnog tkiva korišćene su bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (soj GV3101) koje nose plazmid pBinHTX sa genomskom sekvencom gena *AtCKX1* (GenBank™, pristupni broj AC002510), odnosno *AtCKX2* (GenBank™, pristupni broj AC005917) izolovanih iz *Arabidopsis thaliana* (Werner i sar. 2001). Bakterijski sojevi korišćeni za genetičku transformaciju krompira u ovom radu dobijeni su ljubaznošću dr T. Schmölling-a i dr T. Werner-a (Freie Universität Berlin, Nemačka).

Binarni plazmidi pBinHTX-*AtCKX1* i pBinHTX-*AtCKX2* (slika 3) predstavljaju derivate plazmida pBin19 sa po dve ekspresione kasete u okviru T-DNK. Jedna sadrži gen *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2* pod kontrolom promotora CaMV 35S, a druga gen za higromicin fosfotransferazu II (*hptII*) pod kontrolom promotora nopalina sintaze (*nos*). Gen za higromicin fosfotransferazu služi kao biljni selektivni marker, odnosno omogućava rezistenciju transformisanih ćelija na letalne doze selektivnog antibiotika, higromicina B. Na plazmidu pBinHTX izvan T-DNK nalazi se gen za neomicin-fosfotransferazu (*nptII*), bakterijski selektivni marker koji omogućava preživljavanje bakterija soja GV3101 na podlozi sa kanamicinom. Osim toga, bakterije soja GV3101 nose gen za rezistenciju na rifampicin na hromozomskoj DNK, kao i gen za rezistenciju na gentamicin na Ti-plazmidu pMP90 (Weigel i Glazebrook, 2002; Fang i Spector, 2010).



Slika 3. Shematski prikaz T-DNK konstrukta ugrađenog u plazmide pBinHTX-AtCKX1 i pBinHTX-AtCKX2 (a), odnosno položaja konstrukta sa genom *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2* u tim plazmidima (b). Konstrukt sadrži granične sekvence LB (eng. "left border") i RB (eng. "right border") između kojih se nalaze polilinker sa restrikcionim mestima i selektivni marker *hptII* pod kontrolom promotora pNOS. Shema je nacrtana prema uputstvima dr T. Schmülling-a i dr T. Werner-a (Freie Universität Berlin, Nemačka).

3.2.2. Hranljive podloge za rast bakterija

Sojevi *A. tumefaciens* koji su korišćeni u eksperimentima transformacije, gajeni su na standardnoj hranljivoj podlozi za gajenje bakterija LB (*Luria Bertani Broth*; Bertani, 1951) u čiji sastav ulaze komponente prikazane u tabeli 4.

Tabela 4. Sastav hranljive podloge LB (Bertani, 1951).

Komponenta	Količina (g L ⁻¹ podloge)
Ekstrakt kvasca (Bacto-yeast extract, Duchefa, Haarlem, Holandija)	5
Trypton (Institut "Torlak", Beograd)	10
NaCl ("Lach-Ner", Neratovice, Češka Republika)	10
Agar (Institut "Torlak", Beograd)	15
pH 7.0	

Rastvori antibiotika (tabela 5) dodavani su u prethodno sterilisane i prohladene hranljive podloge (~40 °C), pre razlivanja u sterilne sudove. Dodavanje antibiotika u podlogu je vršeno filter-sterilizacijom. Korišćeni su celulozno-nitratni membranski filteri sa porama veličine 0,45 µm i 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, SAD).

Tabela 5. Antibiotici koji su dodavani u hranljivu podlogu LB.

Antibiotik	Količina (mgL ⁻¹ podloge)
Kanamycin (<i>Kanamycin sulfate</i> , Sigma)	50
Rifampicin (<i>Rifampicin</i> , Sigma)	50
Gentamicin (<i>Gentamicin sulfate</i> , Sigma)	25

Bakterijske kulture gajene su na 25 mL podloge LB u Petri kutijama u termostatu na temperaturi od 28 °C do pojave kolonija (48-72 h), a potom su do trenutka korišćenja gajene na +4 °C i na svakih 30 dana prenošene na svežu podlogu. Bakterije su čuvane i u trajnoj kulturi u glicerolu na -70 °C. Glicerolska kultura bakterija je pravljena mešanjem 0,4 mL sterilnog glicerola i 0,6 mL sveže prekonoćne bakterijske suspenzije.

Za inokulaciju biljnog materijala bakterijama *A. tumefaciens* korišćene su bakterijske suspenzije koje su dobijene zasejavanjem jedne bakterijske kolonije sa čvrste hranljive podloge u 5 mL tečne podloge LB (podloga LB istog sastava kao što je prikazano u tabeli 4, ali bez agara). Posle inkubacije na 28 °C u termostatu u trajanju od 24h dobija se bakterijska suspenzija standardne gustine 5×10^8 bakterija/mL. Za uklanjanje bakterija *A. tumefaciens* iz kulture biljnog tkiva nakon inokulacije korišćen je antibiotik cefotaksim (Tolycar®, Jugoremedija, Zrenjanin) u koncentraciji od 500 mg L⁻¹.

3.2.3. Transformacija i regeneracija biljnog materijala

Za inokulaciju su korišćeni iseći listova sa 30 dana starih izdanaka krompira gajenih *in vitro* po metodi koju su opisali Cingel i saradnici (2010). Iseći listova (površine ~10 mm²) inkubirani su 5-10 minuta u prekonoćnoj bakterijskoj suspenziji (gustine ~ 10^8 bakterija/mL), prosušeni na sterilnom filter papiru i preneti na Petri kutije sa hranljivom podlogom za indukciju kalusa - CIM bez antibiotika (eng. Callus Induction Medium, tabela 6). Neinokulisani iseći listova korišćeni su kao kontrolni eksplantati. U svaku Petri kutiju sa po 25 mL hranljive podloge CIM bez antibiotika postavljano je po 20 eksplantata. Ukupno je postavljeno hiljadu neinokulisanih, kao i po hiljadu eksplantata inokulisanih

bakterijama *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-AtCKX1, odnosno pBinHTX-AtCKX2.

Nakon 72 sata eksplantati su isprani sterilnim rastvorom cefotaksima koncentracije 1 g L⁻¹, prosušeni na sterilnom filter papiru i preneti u Petri kutije sa podlogom CIM kojoj su dodati cefotaksim (500 mg L⁻¹) i higromicin B (50 mg L⁻¹). Ova podloga označena je kao Hyg⁺ CIM. Polovina kontrolnih eksplantata je preneti na identičnu hranljivu podlogu, a ostatak na podlogu bez higromicina B (Hyg⁻ CIM, tabela 6).

Tabela 6. Sastav hranljivih podloga za indukciju kalusa (CIM). Prilagođeno prema: Webb i sar. (1983)

Komponenta hranjive podloge	mg L ⁻¹	CIM bez antibiotika	Hyg ⁺ CIM	Hyg ⁻ CIM
agar (Torlak)	7000	+	+	+
saharoza	30000	+	+	+
mio-inozitol (Sigma)	100	+	+	+
rastvor mineralnih soli MS (Murashige i Skoog, 1962)	tabela 2	+	+	+
rastvor vitamina (Linsmaier i Skoog, 1965)	tabela 3	+	+	+
benzil-adenin (BA, Sigma)	2	+	+	+
naftil-sirćetna kiselina (NAA, Sigma)	0,2	+	+	+
cefotaksim (Tolycar®, Jugoremedija)	500	-	+	+
higromicin B (Sigma)	50	-	+	-

Posle 30 dana gajenja na podlogama za indukciju kalusa, eksplantati su preneti u Petri kutije sa hranljivom podlogom za indukciju izdanaka - SIM (eng. *Shoot Induction Medium*), kojoj su dodati cefotaksim (500 mg L⁻¹) i higromicin B (50 mg L⁻¹). Ova podloga označena je kao Hyg⁺ SIM (tabela 7). Kontrolni eksplantati su preneti na identičnu hranljivu podlogu, ali i na podlogu bez higromicina B (Hyg⁻ SIM). Svi eksplantati su gajeni na podlogama SIM do regeneracije izdanaka, uz prenošenje na svežu podlogu Hyg⁺ SIM ili Hyg⁻ SIM na svakih 14 dana.

Tabela 7. Sastav hranljivih podloga za indukciju izdanaka (SIM). Prilagođeno prema: Visser i sar. (1989)

Komponenta hranjive podloge	mg L ⁻¹	Hyg ⁺ SIM	Hyg ⁻ SIM
agar (Torlak) (0.7%)	7000	+	+
saharoza (1,5%)	15000	+	+
mio-inozitol (Sigma) (0.1%)	100	+	+
rastvor mineralnih soli MS (Murashige i Skoog, 1962)	tabela 2	+	+
rastvor vitamina (Linsmaier i Skoog, 1965)	tabela 3	+	+
benzil-adenin (BA, Sigma)	2	+	+
giberelna kiselina (GA ₃ , Sigma)	5	+	+
cefotaksim (Tolycar®, Jugoremedija)	500	+	+
higromicin B (Sigma)	50	+	-

Kada su regenerisani izdanci dostigli dužinu od 10-20 mm, po jedan izdanak je izolovan sa svakog eksplantata i prenet, radi ožiljavanja, u epruvete sa podlogom bez regulatora rastjenja (BM) uz dodatak cefotaksima (500 mg L⁻¹) i higromicina B (50 mg L⁻¹). Ožiljeni izdanci su odabrani za dalje analize i

supkultivisani na svakih 30 dana kao što je opisano u odeljku 3.1.1. Kontrolni izdanci su prenošeni na hranljivu podlogu istog sastava, kao i na hranljivu podlogu bez antibiotika. Šest meseci nakon transformacije cefotaksim i higromicin B su izostavljeni iz svih hranljivih podloga.

3.3. Molekularno biološke metode

3.3.1. Izolacija genomske DNK za PCR analizu

Izolacija genomske DNK iz potencijalno transformisanog i kontrolnog netransformisanog biljnog materijala gajenog *in vitro* rađena je po metodi Zhou i saradnika (1994). Izolacija je vršena tako što je 0,2 g biljnog materijala (listovi 30 dana starih izdanaka krompira gajenih *in vitro*) samleveno u avanu u tečnom azotu. Prah je prenet u sterilne ependorf tubice zapremine 1,5 mL koje su ohlađene na ledu. U svaki uzorak je dodato po 600 µL ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 1% PVP; 20 mM NaEDTA; 100 mM TRIS-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl) sa 0,5% β-merkaptoetanolom. Uzorci su snažno mučkani nekoliko sekundi i zatim inkubirani u vodenom kupatilu na 56 °C tokom 20 min. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi tokom 10 min u svaku ependorf tubicu dodato je po 600 µL smeše hloroform : izoamilalkohol (24:1, v:v) i sadržaj je izmešan laganim okretanjem tubica gore-dole oko 40 puta. Nakon centrifugiranja na 13000 g na sobnoj temperaturi tokom 10 min supernatant koji se odvajao u vidu gornje, bezbojne faze, prenošen je u nove ependorf tubice. Postupak hloroformske ekstrakcije je ponovljen još jednom, a zatim je, radi precipitacije DNK, dodato po 250 µL 4 M NaCl i 750 µL hladnog izopropanola i inkubirano na +4 °C tokom narednih 30 min.

Nakon 30 minuta sadržaj je centrifugiran tokom 5 min na 8000 g na sobnoj temperaturi. Supernatant je odstranjen, a talog ispran dodavanjem 1 mL hladnog 70% etanola. Sadržaj je ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Supernatant je odliven, a talog sušen u laminarnoj komori dok nije postao sasvim proziran. Resuspendovan je dodavanjem 200 μL TE pufera (1 mM EDTA, 10 mM TRIS) i inkubiran na +4 °C tokom noći do potpunog rastvaranja. Radi uklanjanja RNK dodato je po 2 μL RNK-aze (koncentracije 10 mg mL⁻¹) i inkubirano tokom 45 min u vodenom kupatilu na 37 °C. RNK-aza kao i ostaci RNK uklonjeni su hloroformskom ekstrakcijom dodavanjem po 140 μL smeše hloroform : izoamilalkohol (24:1, v:v) i centrifugiranjem od 10 min na 13000 g na sobnoj temperaturi. Gornja faza (100 μL) je prenetu u nove ependorf tubice.

Kvalitet izolovane DNK analiziran je elektroforezom na agaroznom gelu, a kvantitet je određen na spektrofotometru (Agilent 8453, Santa Clara, CA, SAD) i izračunavan prema formuli:

$$[\text{ukupna DNK}] = 50 \mu\text{g mL}^{-1} \times A_{260 \text{ nm}} \times \text{razblaženje}$$

3.3.2. PCR analiza

PCR reakcija je iskorišćena za potvrđivanje prisustva transgena u biljnom tkivu krompira. Svaka PCR reakcija se odvijala u reakcionoj smeši zapremine 25 μL (tabela 8).

Tabela 8. Sastav reakcione smeše PCR reakcije.

Komponenta	Zapremina (μL)
10 x PCR pufer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 0.01% želatin)	2,50
dNTP (10mM)	1,50
Prajmer F (5μM)	1,25
Prajmer R (5μM)	1,25
AmpliTaq Gold® DNK polimeraza (5 U/μL)	0,50
H ₂ O	15,50
DNK (100 ng/μL)	2,50
	25,00

Za amplifikaciju fragmenata gena *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* u PCR reakcijama korišćeni su prajmeri ("Forward" i "Reverse") prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama.

Gen	GenBank™ pristupni br.	Prajmeri	Amplikon
<i>AtCKX1</i>	AC002510	F: 5'-CTC AGA ACA GGT TAC GAC TTC TCC-3'	300 bp
		R: 5'-CCC CAA ATC AAC AAC GTC TAC C-3'	
<i>AtCKX2</i>	AC005917	F: 5'-CTC TAC CGA TCC TTC CAT CAT CTC-3'	374 bp
		R: 5'-ACG TTC CTC CGA CGG TTA TATG-3'	

PCR reakcije su se odvijale po sledećem protokolu:

1. Početna denaturacija DNK (95 °C, 5 min)
2. 38 ciklusa:
 - a) Denaturacija (95 °C, 1 min)
 - b) Vezivanje prajmera (55 °C, 1 min za *AtCKX1*, odnosno 60 °C, 1min za *AtCKX2*)
 - c) Ekstenzija (72 °C, 2 min)
3. Finalna ekstenzija (72 °C, 10 min)

Sve PCR reakcije sa specifičnim prajmerima urađene su pomoću GeneAmp® Gold PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, SAD) i odvijale su se u PCR mašini (Techne *Genius* thermocycler, Cambridge, UK).

Izolati DNK iz listova netransformisanih izdanaka krompira gajenih *in vitro* korišćeni su kao negativna kontrola, dok su plazmidi pBinHTX-*AtCKX1* i pBinHTX-*AtCKX2* korišćeni kao pozitivna kontrola.

3.3.3. Elektroforeza i vizuelizacija DNK

Elektroforeza DNK je vršena u 1,5% agaroznim gelovima sa 0,5 µg mL⁻¹ etidijum-bromida u 1 x TBE puferu (tabela 10), pri konstantnom naponu od 45 V (za genomsku DNK) i 75 V (za PCR produkte). Elektroforeza DNK se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu BlueMarine 100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). Posle završene elektroforeze gelovi su prosvetljivani na talasnoj dužini od 266 nm i fotografisani u transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA, SAD).

Tabela 10. Sastav 1 x TBE pufera za elektroforezu DNK.

Komponenta	Količina (na 1L pufera)
Tris (hidroksimetil) aminometan (Serva)	10,8 g
Borna kiselina (Duchefa)	5,5 g
0.5M EDTA (pH 8,0)	4 mL
Etidijum-bromid (Valeant Pharmaceuticals, Montreal, Kanada)	0,5 mg

3.3.4. Analiza po Southern-u

Genomska DNK je izolovana iz listova 30 dana starih izdanaka krompira gajenih *in vitro* kao što su opisali Murray i Thompson (1980), digerirana endonukleazom *Bam*HI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, SAD) i nanošena po 35 µg na gel. Prečišćena plazmidna DNK (pBinHTX-*AtCKX1*, odnosno pBinHTX-*AtCKX2*), digerirana endonukleazom *Bam*HI, korišćena je kao pozitivna kontrola. DNK je razdvojena elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu (Sigma) i preneti na pozitivno naelektrisanu najlonsku membranu (Roche, Basel, Švajcarska) kapilarnim transferom. Fragmenti dugi 300, odnosno 374 bp, obeleženi digoksigenin-dUTP-om (Roche) u PCR reakciji, korišćeni su kao probe za sekvence *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2*. Hibridizacija je vršena u puferu "DIG Easy Hyb" (Roche) tokom 16 sati na temperaturi od 40°C (*AtCKX1*), odnosno 45°C (*AtCKX2*). Membrana je zatim ispirana u sledećim uslovima: 2 x 5 min u 2 x SSC + 0,1% SDS na 40°C, zatim 2 x 15 min u 0,5 x SSC + 0,1% SDS na 65°C (*AtCKX1*), odnosno po 2 x 5 min u svakom od sledećih pufera: 2 x SSC + 0,1% SDS i 1 x SSC + 0,1% SDS na 45°C, zatim 0,5 x SSC + 0,1% SDS i 0,1 x SSC + 0,1% SDS na 68°C (*AtCKX2*). Za

detekciju hibridizacije korišćena su antitela na digoksinin (Roche) obeležena hemiluminiscentnim supstratom CDP-Star (Roche). Snimanje je vršeno na rentgenskom filmu (Kodak, New York, NY, SAD).

3.3.5. Izolacija ukupne RNK

Ukupna RNK izolovana je po modifikaciji metode Gašić i saradnika (2004) iz 30 dana starog transformisanog i netransformisanog biljnog materijala gajenog *in vitro*. Ekstrakcija RNK je vršena tako što je 0,2 g biljnog materijala (izdanaka ili korenova) najpre samleveno u avanu u tečnom azotu. Prah je zatim prenošen u sterilne ependorf tubice zapremine 2 mL koje su postavljane na led. Avani sa samlevenim uzorcima su dodatno ispirani sa po 1,3 mL ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 2% PVP; 0,1% DEPC; 25 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCl pH 8,0; 2 M NaCl; 0,5 g L⁻¹ spermidin; uz 2% β-merkaptotetanol dodatog neposredno pre upotrebe) prethodno zagrejanog na 60 °C, koji je zatim prenet u ependorf tubice zapremine 2 mL. Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na 60 °C tokom 15 min uz povremeno mućkanje na vorteksu. U svaki uzorak dodato je po 650 µL smeše hloroform : izoamilalkohol (24:1, v:v) i mućkano na vorteksu tokom 2 min. Nakon centrifugiranja tokom 10 min na 10000 g na +4 °C, supernatant koji se odvojio u vidu gornje, bezbojne faze, prenet je u nove ependorf tubice. Postupak sa dodavanjem smeše hloroform : izoamilalkohol i centrifugiranjem od 10 min ponovljen je još jednom.

Supernatant zapremine 500 µL odvajan je u nove ependorf tubice zapremine 2 mL, pa je dodavano po 166 µL hladnog 7,5 M LiCl. Ependorf tubice su mućkane okretanjem nekoliko puta i inkubirane na +4 °C preko noći.

Nakon precipitacije, sadržaj ependorf tubica je centrifugiran tokom 45 minuta na 12000 g na +4 °C. Supernatant je odstranjen, a talog ispran dodavanjem 300 µL hladnog 70% etanola i zatim sušen na vazduhu u laminarnoj komori tokom 5 minuta. Talog RNK je rastvoren dodavanjem 80 µL 0,1% DEPC (Sigma), potom mu je dodato 8 µL 3M Na-acetata (pH 5,5) i 220 µL 70% etanola i inkubiran je preko noći na -80 °C. Sadržaj je ponovo centrifugiran tokom 45 minuta na 12000 g, na +4 °C. Supernatant je odlivan, a talog sušen u laminarnoj komori tokom 10 minuta i zatim resuspendovan dodavanjem 200 µL 0,1% DEPC, nakon čega je čuvan trajno na -80 °C.

Kvalitet izolovane RNK proveravan je elektroforezom na agaroznom gelu istom metodom kao za DNK (odjeljak 3.3.3), a određivan je i spektrofotometrijski prema odnosu količnika A_{260}/A_{280} (za čistu RNK A_{260}/A_{280} iznosi 1,9-2,1). Kvantitet izolovane RNK određivan je na spektrofotometru Agilent 8453 i izračunavan prema formuli:

$$[\text{ukupna RNK}] = 40 \mu\text{g mL}^{-1} \times A_{260} \times \text{razblaženje}$$

3.3.6. Prečišćavanje uzoraka RNK od kontaminacije sa DNK

Pre reakcije reverzne transkripcije (RT) po 1 µg totalne RNK iz svakog uzorka je tretiran DNK-azom (Fermentas). Ovaj tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine 10 µL (tabela 11).

Tabela 11. Sastav reakcione smeše za tretman DNK-azom.

Komponenta reakcione smeše	Količina
totalna RNK	1,00 µg
10 x pufer za DNK-azu (Fermentas)	1,00 µL
DNK-aza (Fermentas)	1,00 µL
RNK-aze inhibitor (Fermentas, 40U/µL)	0,25 µL
H ₂ O	7,75 µL
	10,00 µL

Tretman DNK-azom odvijao se tokom 30 minuta na 37 °C, a potom je DNK-aza inaktivirana zagrevanjem uzoraka u koje je dodato po 1 µL EDTA (Fermentas). Zagrevanje je vršeno tokom 10 minuta na 65 °C.

3.3.7. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)

Reverzna transkripcija RNK u jednolančanu DNK (cDNK) je vršena u PCR mašini pomoću GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kita (Applied Biosystems) i odvijala se u dva koraka: 25 °C (10 min), zatim 42 °C (12 min). Reakciona smeša zapremine 20 µL sastojala se od komponenti prikazanih u tabeli 12.

Tabela 12. Sastav reakcione smeše reverzne transkripcije.

Komponenta	Zapremina (μL)
5 x RT-PCR pufer	4,0
25 mM MgCl_2	2,0
10 mM dNTP	2,0
100 mM DTT	2,0
50 μM oligo-dT prajmeri	0,5
20 U/ μl RNase inhibitor	0,5
MultiScribe® reverzna transkriptaza	0,3
H_2O	4,7
RNK ($0,1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	4,0
	20,0

Dobijena cDNK zatim je korišćena u qPCR reakciji koja se odvijala u smeši finalne zapremine $25 \mu\text{L}$ (tabela 13).

Tabela 13. Sastav pojedinačne qPCR reakcije.

Komponenta	Količina (μL)
SYBR Green I Master Mix	12,50
15 μM Prajmer F	0,50
15 μM Prajmer R	0,50
H_2O	9,00
cDNK ($40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	2,50
	25,00

SYBR Green I Master Mix je smeša DNK polimeraze (Taq), dNTP-ova, fluorescentno zelene boje SYBR Green I i referentne boje ROX u odgovarajućem PCR puferu. DNK polimeraza Taq rastvorena u puferu daje osetljivu i specifičnu PCR amplifikaciju. Boja SYBR Green I osigurava detekciju, a samim tim i analizu DNK. Boja ROX je pasivna referentna fluorescentna boja koja služi za normalizaciju varijacija između reakcija kao i grešaka u pipetiranju. Ova boja se ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju tokom reakcije.

Za amplifikaciju fragmenata *AtCKX1* odnosno *AtCKX2* gena u qPCR reakcijama korišćeni su posebni prajmeri, prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Prajmeri korišćeni u qPCR reakcijama.

Gen	GenBank™ pristupni br.	Prajmeri	Amplikon
<i>AtCKX1</i>	NM_129714	F: 5'-CAG CAG CAA ACC TCA ACG TG-3'	127 bp
		R: 5'-ATC GCT AGA GGG TCG TAG GC-3'	
<i>AtCKX2</i>	NM_127508	F: 5'-GGG AAC TTC CTC ATC CTT GGC-3'	115 bp
		R: 5'-GCG AGT CCC GAA GCT GAT TT-3'	

Radi provere ujednačenosti količine ukupne cDNK u svim uzorcima paralelno sa amplifikacijom oba *AtCKX* gena, amplifikovan je i referentni gen za aktin krompira (*PoAc58*). Prajmeri korišćeni za amplifikaciju aktinskog gena prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Set prajmera korišćenih za umnožavanje fragmenta referentnog gena za aktin.

Gen	GenBank™ pristupni br.	Prajmeri	Amplikon
<i>PoAc58</i>	X55749	F: 5'-TGT TGG ACT CTG GTG ATG GTG-3' R: 5'-AGT AAC CAC GCT CAG TGA GGA-3'	141 bp

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

Sve qPCR reakcije su se odvijale po sledećem protokolu:

1. Početna denaturacija cDNK (95 °C, 10 min)
2. 40 ciklusa:
 - a) Denaturacija (95 °C, 15 sek)
 - b) Vezivanje prajmera (56 °C, 15 sek za *AtCKX1*, odnosno 57 °C, 15 sek za *AtCKX2*, odnosno 60 °C, 15 sek za *PoAc58*)
 - c) Ekstenzija (72 °C, 30 sek)
3. Finalna ekstenzija (72 °C, 10 min)
4. Analiza krive topljenja

Za apsolutnu kvantifikaciju kao standardi korišćeni su plazmidi pBinHTX-*AtCKX1* i pBinHTX-*AtCKX2* isečeni restrikcijom endonukleazom *Bam*HI (Fermentas) u seriji razblaženja (5 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg i 10 pg plazmidne DNK po reakcionoj smeši).

Sve qPCR reakcije urađene su u tri biološka ponavljanja u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) pomoću SYBR

Green I (Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x, Fermentas), prema uputstvima proizvođača.

3.4. Određivanje enzimske aktivnosti citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX)

Citokinin oksidaza/dehidrogenaza je ekstrahovana i delimično prečišćena iz izdanaka i korenova 30 dana starih netransformisanih i transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*, po metodi koju su opisali Motyka i saradnici (2003). Aktivnost enzima CKX u ovako dobijenom proteinskom ekstraktu određivana je *in vitro* enzimskim testom zasnovanim na konverziji radioaktivno obeleženog supstrata: [2-³H]iP, [2-³H]cZ ili [2-³H]tZ u [2-³H]adenin. Reakciona smeša finalne zapremine 50 µL sastojala se od enzimskog ekstrakta (ekvivalent 2,5-35 mg sveže mase tkiva), 2 µM rastvora obeleženog citokinina ([2-³H]iP, [2-³H]cZ ili [2-³H]tZ) i 100 mM N-tris(hidroksimetil)metil-3-amino-propan-sulfonat (TAPS)-NaOH pufera (pH 8,5) u kojem je rastvoren 75 µM 2,6-dihloroindofenol.

Razdvajanje supstrata od proizvoda enzimske reakcije vršeno je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (HPLC/MS, Finnigan, San José, CA, SAD) po metodi koju su opisali Gaudinová i saradnici (2005). Koncentracija proteina u enzimskim ekstraktima određivana je po metodi Bradford-a (1976) uz upotrebu goveđeg serum-albumina (BSA) kao standarda. Određivanje aktivnosti CKX u svakom od tri biološka uzorka ponovljeno je po četiri puta.

3.5. Analiza endogenih biljnih hormona

Endogeni biljni hormoni (citokinini i IAA) ekstrahovani su iz izdanaka i korenova 30 dana starih netransformisanih i transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*, po metodi koju su opisali Dobrev i Kamínek (2002). Ekstrakcija je vršena tako što je 1 g sveže mase biljnog materijala samleveno u avanu u tečnom azotu. Prah je prenet u smešu metanola, mravlje kiseline i vode (15:1:4, v:v:v) a prečišćavanje je vršeno iz čvrste faze.

Koncentracije pojedinačnih citokininskih nukleotida određene su kao prirast koncentracije odgovarajućih ribozida usled defosforilacije alkalnom fosfatazom. Detekcija i kvantifikacija vršene su korišćenjem tečne hromatografije pod visokim pritiskom i masene spektrometrije (HPLC/MS). Kao interni standardi za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su odgovarajući citokinini obeleženi deuterijumom [²H]. Granica detekcije različitih citokinina kretala se između 0,5 i 1,0 pmol po uzorku.

Koncentracija auksina (IAA) određivana je primenom dvodimenzionalne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (2D-HPLC) po metodi koju su opisali Dobrev i saradnici (2005). Za kvantifikaciju je korišćen fluorescentni detektor LC 240 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, SAD).

Određivanje količine endogenih biljnih hormona u svakom od tri biološka uzorka ponovljeno je po četiri puta.

3.6. Određivanje morfoloških osobina biljaka krompira gajenih *in vitro*

Za potrebe određivanja morfoloških osobina, biljke su gajene pojedinačno, u epruветama sa hranljivom podlogom. Morfološke osobine koje su ispitivane obuhvataju: dužinu izdanka, broj bočnih izdanaka, broj korenova, procenat izdanaka sa krtolama, broj krtola po izdanku, prečnik i masu krtola. Ove osobine su određivane posebno u neindukujućim, odnosno indukujućim uslovima za tuberizaciju. Neindukujući uslovi podrazumevaju fotoperiod od 16 sati svetlosti i 8 sati mraka – dugi dan (DD), a indukujući, kontinuirani mrak (KM).

Dužina izdanka, broj bočnih izdanaka i broj korenova određivani su kod 30 dana starih biljaka gajenih *in vitro*.

U drugim eksperimentima, procenat izdanaka sa krtolama i broj krtola po izdanku određivani su kod biljaka gajenih *in vitro* tokom 30, 60, 90 i 120 dana. Prečnik krtola je određivan kod biljaka gajenih *in vitro* tokom 30 i 120 dana, a masa krtola kod 120 dana starih biljaka gajenih *in vitro*. Biljke su gajene u Erlenmeyer-bočicama (po pet eksplantata u svakom sudu) a kao eksplantati korišćeni su odsecci izdanka sa jednim nodusom i listom. Svi eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja od po 30 eksplantata.

3.7. Statistička obrada podataka i grafičko predstavljanje rezultata

Numerički podaci su obrađeni primenom računarskog programa Statgraphics Plus Version 2.1 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, SAD). Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćen je Mann-Whitney-jev *U*-test na nivou značajnosti $p \leq 0,05$ (Ct vrednost za

amplifikaciju referentnog gena *PoAc58* u qPCR reakciji, aktivnost CKX i analiza endogenih biljnih hormona), odnosno analiza varijanse (ANOVA) i test najmanjih značajnih razlika - LSD (eng. *Least Significant Difference*) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$ (kvantifikacija morfoloških osobina biljaka krompira gajenih *in vitro*, uključujući i parametre tuberizacije). Podaci izraženi u procentima su angularno transformisani u cilju statističke obrade i reverzno transformisani inverznom funkcijom radi grafičkog prikaza.

Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, SAD). Srednje vrednosti prikazane su sa odgovarajućom standardnom greškom, osim u slučaju apsolutne kvantifikacije qPCR produkata i Ct vrednosti za amplifikaciju referentnog gena *PoAc58*, gde su srednje vrednosti prikazane sa odgovarajućom standardnom devijacijom, što je uobičajena praksa u prikazivanju podataka vezanih za qPCR analize. Na graficima su prikazani i rezultati analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti, i to slovima ili zvezdicom. Na graficima na kojima su za označavanje statistički značajnih razlika korišćena slova, istim slovima su označene vrednosti koje se međusobno *ne razlikuju* statistički značajno. U slučaju da su na istom grafiku prikazane dve grupe podataka koje su zasebno statistički analizirane, jedna grupa podataka je obeležena velikim a druga malim slovima. Na graficima na kojima je prikazano više od dve grupe zasebno statistički analiziranih podataka, statistički značajne razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolnu vrednost označene su zvezdicom.

4. REZULTATI

4.1. Genetička transformacija krompira genima *AtCKX1* i *AtCKX2*

4.1.1. Indukcija kalusa na isečcima listova inokulisanim bakterijama *Agrobacterium tumefaciens*

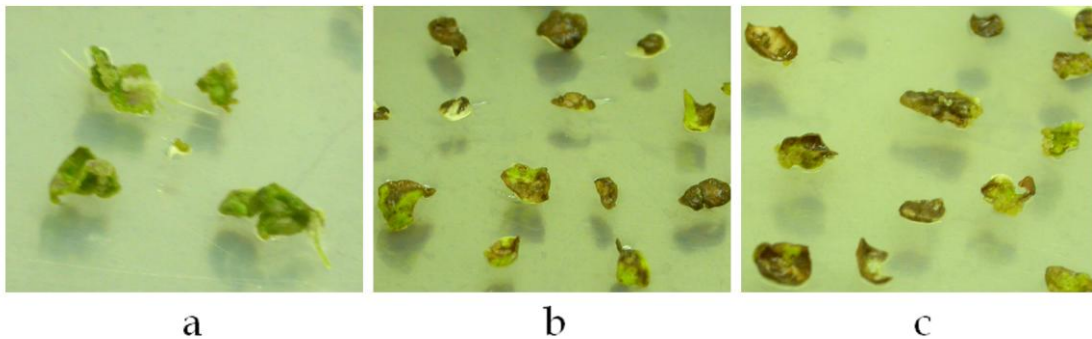
Isecci listova koji su inokulisani bakterijama *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-*AtCKX1* i pBinHTX-*AtCKX2* postavljeni su prvih 72 sata na hranljivu podlogu za indukciju kalusa (CIM) bez antibiotika. Nakon ovog perioda nekrozi je podleglo 15,7% eksplantata inokulisanih bakterijama koje su nosile konstrukt *AtCKX1* i 18,3% eksplantata inokulisanih bakterijama sa konstruktom *AtCKX2*. Na istu podlogu su kao kontrola postavljeni i neinokulisani isecci listova. Nijedan od njih nije podlegao nekrozi u datom periodu.

Preživeli inokulisani eksplantati su zatim preneti na hranljivu podlogu Hyg⁺ CIM, dok je polovina kontrolnih eksplantata preneti na Hyg⁺ CIM, a polovina na podlogu Hyg⁻ CIM. Nakon 7-10 dana došlo je do indukcije prvih kalusa duž ivica kontrolnih eksplantata gajenih na podlozi Hyg⁻ CIM, ali i inokulisanih eksplantata gajenih na Hyg⁺ CIM. Nakon 30 dana gajenja na ovoj podlozi kalusi su se pojavili na 60-65% od početnog broja inokulisanih eksplantata (tabela 16 i slika 4c), dok su eksplantati koji nisu razvili kaluse počeli da podležu nekrozi. Svi neinokulisani, kontrolni eksplantati koji su gajeni na podlozi Hyg⁻ CIM tokom ovog perioda takođe su razvili kaluse (slika 4a), dok su kontrolni eksplantati postavljeni na podlogu Hyg⁺ CIM podlegli nekrozi bez razvijanja kalusa (slika 4b).

Tabela 16. Efikasnost indukcije kalusa, regeneracije izdanaka iz dobijenih kalusa i ožiljavanja regenerisanih izdanaka *in vitro* nakon inokulacije isečaka listova krompira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) bakterijama *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-AtCKX1 i pBinHTX-AtCKX2.

Fiziološki odgovor	Početni materijal	Hranljiva podloga	Početni broj eksplantata	Broj eksplantata sa fiziološkim odgovorom	Efikasnost fiziološkog odgovora (%)	
Faza 1: Indukcija kalusa	Iseči listova	neinokulisani	Hyg ⁻ CIM	500	500	100,0
		neinokulisani	Hyg ⁺ CIM	500	0	0,0
		AtCKX1		1000	643	64,3
		AtCKX2		1000	606	60,6
Faza 2: Regeneracija izdanaka	Kalusi	neinokulisani	Hyg ⁻ SIM	250	183	73,2
		neinokulisani	Hyg ⁺ SIM	250	0	0,0
		AtCKX1		643	425	66,1 (42,5)*
		AtCKX2		606	381	62,9 (38,1)*
Faza 3: Ožiljavanje	Izdanci	neinokulisani	BM	10	10	100,0
		AtCKX1	BM + Hyg	75	12	16,0
		AtCKX2		75	11	14,7

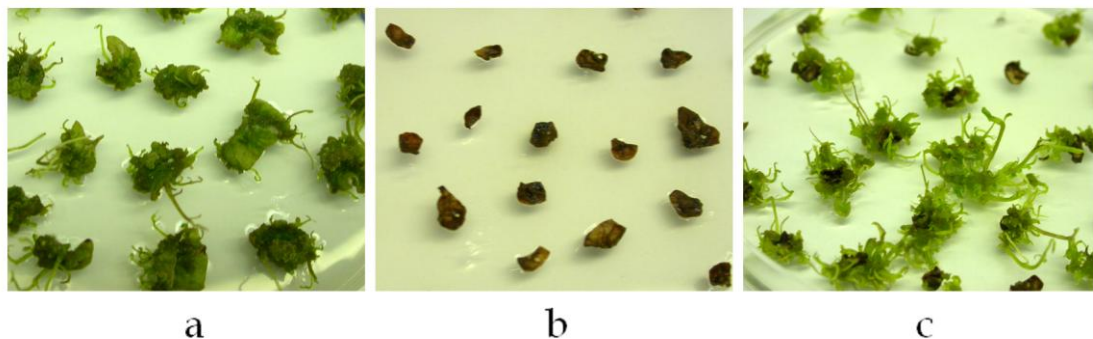
* Broj dat u zagradi predstavlja efikasnost regeneracije izdanaka (%) u odnosu na početni broj inokulisanih isečaka listova. Broj regenerisanih izdanaka po kalusu dat je u tekstu.



Slika 4. Izgled eksplantata (isečaka listova krompira) nakon 25 dana gajenja na hranljivoj podlozi za indukciju kalusa (CIM): (a) Kontrolni (neinokulisani) eksplantati na podlozi Hyg⁻ CIM; (b) Kontrolni eksplantati na podlozi Hyg⁺ CIM (50 mg L⁻¹ Hyg); (c) Eksplantati inokulisani sa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-AtCKX2 na podlozi Hyg⁺ CIM (50 mg L⁻¹ Hyg).

4.1.2. Regeneracija izdanaka iz inokuliranih eksplantata

Inokulirani eksplantati koji su razvili kaluse preneti su na hranljivu podlogu za regeneraciju izdanaka (Hyg⁺ SIM). Od kontrolnih eksplantata koji su prethodno razvili kaluse na podlozi Hyg⁻ CIM, polovina je prenet na Hyg⁺ SIM, a polovina na Hyg⁻ SIM. Posle 5-7 dana prvi regenerisani izdanci su bili vidljivi golim okom na kontrolnim eksplantatima gajenim na podlozi Hyg⁻ SIM, dok su se prvi izdanci na inokuliranim eksplantatima pojavili nešto kasnije, nakon 10-12 dana gajenja na podlozi Hyg⁺ SIM. Nakon 30 dana gajenja na ovoj podlozi izdanke je regenerisalo 60-70% (35-45% ukupnog početnog broja) inokuliranih eksplantata (tabela 16), dajući u proseku 7,5 (*AtCKX1*), odnosno 7,3 (*AtCKX2*) izdanaka po eksplantatu. Eksplantati koji nisu regenerisali izdanke, stagnerali su ili su podlegli nekrozi (slika 5c). Stagnerajući eksplantati ni kasnije nisu pokazali znake regeneracije i do kraja drugog meseca na istoj podlozi su svi podlegli nekrozi.



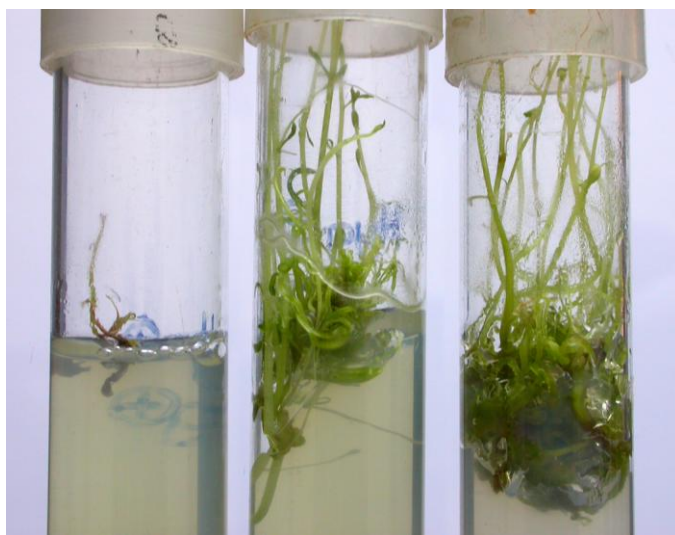
Slika 5. Izgled eksplantata (isečaka listova krompira) nakon 30 dana gajenja na hranljivoj podlozi za regeneraciju izdanaka (SIM): (a) Kontrolni (neinokulisani) eksplantati na podlozi Hyg⁻ SIM; (b) Kontrolni eksplantati na podlozi Hyg⁺ SIM (50 mg L⁻¹ Hyg); (c) Eksplantati inokulisani sa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-AtCKX2 na podlozi Hyg⁺ SIM (50 mg L⁻¹ Hyg).

Od neinokulisanih, kontrolnih eksplantata gajenih na podlozi Hyg⁻ SIM, izdanke je regenerisalo 73,2% eksplantata (tabela 16 i slika 5a). Kontrolni eksplantati postavljeni na podlogu Hyg⁺ SIM nisu regenerisali izdanke i podlegli su nekrozi u toku prve dve nedelje (slika 5b).

4.1.3. Ožiljavanje regenerisanih izdanaka

Regenerisani izdanci dužine 10-20 mm preneti su radi ožiljavanja u epruvete sa bazalnom hranljivom podlogom, uz dodatak selektivnog antibiotika higromicina B, kao i cefotaksima radi otklanjanja potencijalnih ostataka bakterijske infekcije. Po jedan regenerisani izdanak je izolovan sa svakog od po 75 eksplantata nezavisno inokulisanih svakim od dva korišćena soja *Agrobacterium tumefaciens*. Deset regenerisanih izdanaka je izolovano sa 10 kontrolnih eksplantata gajenih na podlozi Hyg⁻ SIM, radi dobijanja kontrolnih linija krompira za nastavak eksperimenta.

U toku 30 dana na bazalnoj podlozi u epruvetama došlo je do ožiljavanja izdanaka 45 linija inokulisanih sa *AtCKX1* i 37 linija inokulisanih sa *AtCKX2*. Međutim, tokom supkultivacije u narednih šest meseci mnoge linije su izgubile sposobnost ožiljavanja, odnosno odsecci izdanaka se više nisu ožiljavali nakon prenošenja na svežu hranljivu podlogu, a iz bočnih pupoljaka su se nakon supkultivacije razvijali aberantni izdanci ili se nisu razvijali uopšte (slika 6). Ove linije su eliminisane i za dalja istraživanja su korišćene samo linije koje su davale vijabilne, ožiljene biljke. Do trenutka kada je nakon šest ciklusa supkultivacije iz hranljive podloge izostavljen selektivni antibiotik higromicin B, selekciju je preživelo svega 12 linija koje su bile potencijalno transformisane genom *AtCKX1*, i 11 linija potencijalno transformisanih sa *AtCKX2* (tabela 16).



Slika 6. Izgled regenerisanih izdanaka posle inokulacije sa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pBinHTX-*AtCKX2* na hranljivoj podlozi za ožiljavanje sa higromicinom B (50 mg L^{-1} Hyg). U sredini je epruveta sa vijabilnim primarnim izdankom koji je regenerisao brojne adventivne izdanke i počeo da pokazuje znake ožiljavanja. Desno je primarni izdanak koji je regenerisao brojne adventivne izdanke ali neki od njih su delimično nekrotični i nema znakova ožiljavanja. U epruveti levo nalazi se nevijabilan, nekrotični izdanak bez znakova ožiljavanja.

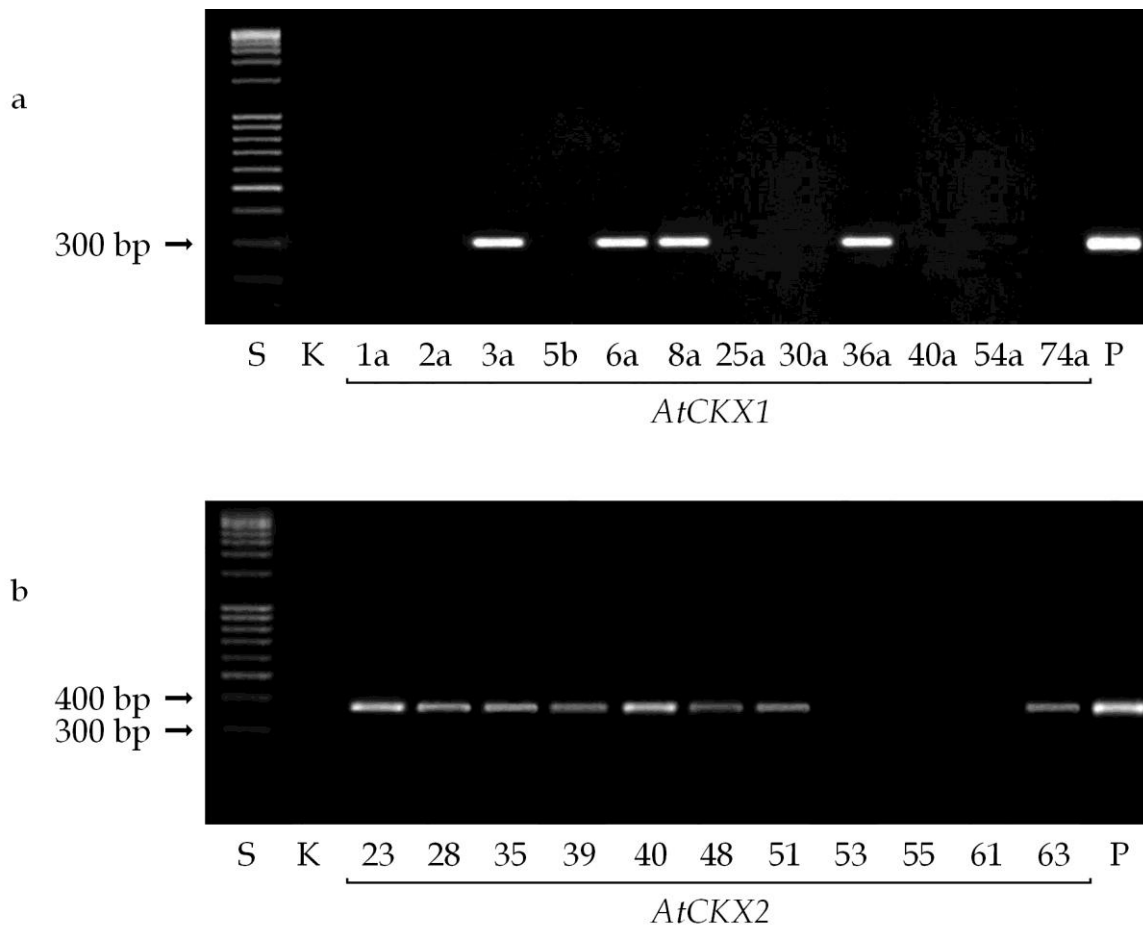
4.1.4. Provera transformacije PCR analizom

PCR analiza je pokazala da je gen *AtCKX1* bio prisutan kod 4 od testiranih 12 linija, dok je gen *AtCKX2* bio prisutan kod 8 od 11 testiranih linija. Umnožavanje fragmenta transgena *AtCKX1* veličine 300 bp dobijeno je kod linija *AtCKX1*-3a, -6a, -8a i -36a (slika 7a, dok je fragment transgena *AtCKX2* veličine 374 bp umnožen kod linija *AtCKX2*-23, -28, -35, -39, -40, -48, -51 i -63 (slika 7b). Fragmenti odgovarajuće veličine umnoženi su i kod pozitivne kontrole, gde je u reakcionu smešu umesto uzorka DNK dodata plazmidna DNK (pBinHTX-*AtCKX1*, odnosno pBinHTX-*AtCKX2*), a umnožavanje ovih fragmenata nije dobijeno kod DNK netransformisanih, kontrolnih biljaka (slika 7).

Dobijena efikasnost transformacije krompira genom *AtCKX1* iznosila je dakle 33%, dok je efikasnost transformacije genom *AtCKX2* iznosila 73% (tabela 17).

Tabela 17. Efikasnost transformacije krompira genima *AtCKX1* i *AtCKX2* dobijena na osnovu PCR analize potencijalno transformisanih linija čiji su se izdanci ožiljavali na selektivnoj podlozi BM sa higromicinom B.

Linije	Broj analiziranih linija	Broj pozitivnih linija	Efikasnost transformacije (%)
netransformisane	2	0	0
<i>AtCKX1</i>	12	4	33
<i>AtCKX2</i>	11	8	73



Slika 7. PCR analiza genomske DNK izolovane iz transformisanih 35S:*AtCKX1* (a) i 35S:*AtCKX2* (b) biljaka krompira. Signali predstavljaju umnožen fragment DNK dug 300, odnosno 374 bp. S = DNK standard (100 bp Ladder Extended, Serva); K = genomska DNK kontrolne biljke; P = plazmidna DNK pBinHTX-*AtCKX1* (a) i pBinHTX-*AtCKX2* (b) upotrebljena kao pozitivna kontrola.

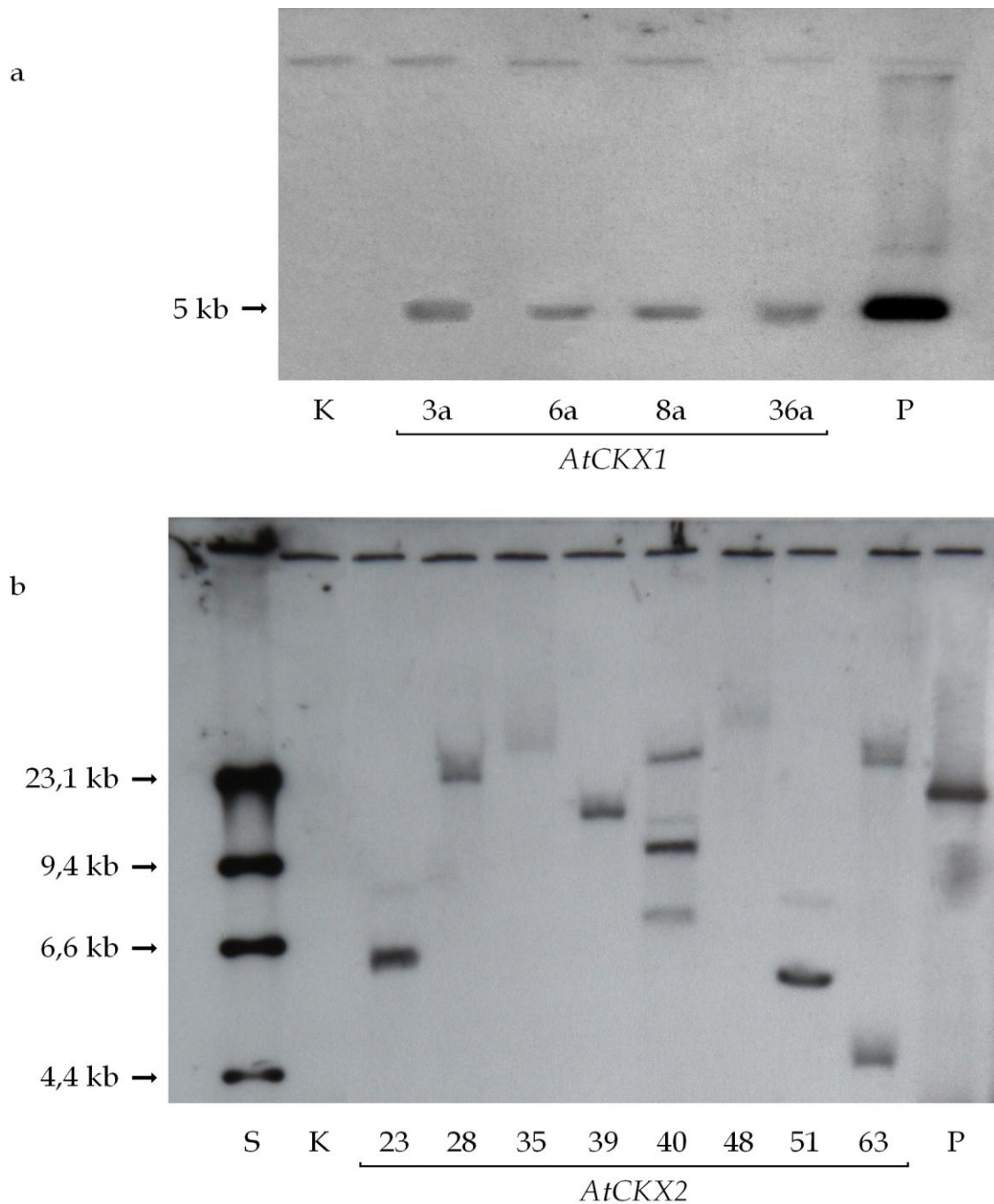
4.1.5. Potvrda integracije transgena u genomsku DNK krompira hibridizacijom po Southern-u

Analiza po Southern-u potvrdila je stabilnu integraciju transgena u genomsku DNK svih transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* linija (slika 8). Prisustvo

fragmenta približne dužine 5 kb potvrđeno je kod sve četiri transformisane *AtCKX1* linije, a fragment odgovarajuće dužine prisutan je i u plazmidnoj DNK *pBinHTX-AtCKX1*, koja je upotrebljena kao pozitivna kontrola (slika 8a). Uniformna dužina fragmenta genomske DNK koji je hibridizovao sa probom za sekvencu *AtCKX1* posledica je toga što je gen *AtCKX1* ugrađen u polilinker u okviru T-DNK plazmida *pBinHTX-AtCKX1* između dva restrikciona mesta za enzim *Bam*HI (slika 3), kojim je digerirana genomska DNK za potrebe Southern analize.

U slučaju plazmida *pBinHTX-AtCKX2*, gen *AtCKX2* je ugrađen u T-DNK *izvan* segmenta ograničenog sa dva restrikciona mesta koja prepoznaje *Bam*HI (slika 3). Fragmenti genomske DNK koji hibridizuju sa probom za *AtCKX2* iz tog razloga ograničeni su restrikcionim mestom za *Bam*HI na poziciji "562" (slika 3) u okviru T-DNK i najbližim restrikcionim mestom za *Bam*HI u genomskoj DNK biljke. Zbog toga je dužina svakog od ovih fragmenata specifična za svaku kopiju transgena. Kod šest transformisanih *AtCKX2* linija (*AtCKX2-23*, *-28*, *-35*, *-39*, *-48* i *-51*) potvrđeno je prisustvo po jedne kopije transgena (dužina fragmenata je varirala u opsegu od oko 6,5 kb kod linija *AtCKX2-23* i *AtCKX2-51*, do preko 25 kb kod linije *AtCKX2-48*). Linija *AtCKX2-63* sadržala je dve kopije transgena (fragmenti dužine oko 5 i 25 kb), dok je linija *AtCKX2-40* sadržala čak tri kopije (fragmenti dužine oko 8, 10 i 24 kb). Fragment digerirane plazmidne DNK *pBinHTX-AtCKX2* odgovarajuće veličine hibridizovao je sa probom dajući veoma jak signal (slika 8b).

Genomska DNK kontrolnih biljaka nije hibridizovala sa probama za transgene *AtCKX1* i *AtCKX2* (slika 8a i b).



Slika 8. Southern analiza genomske DNK 30 dana starih kontrolnih i transformisanih 35S:*AtCKX1* (a) i 35S:*AtCKX2* (b) biljaka krompira gajenih *in vitro*. S = DNK standard (MWMIL, Roche); K = genomska DNK kontrolne biljke; P = plazmidna DNK pBinHTX-*AtCKX1* (a) i pBinHTX-*AtCKX2* (b), upotrebljena kao pozitivna kontrola.

4.2. Ekspresija transgena u izdancima i korenovima transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*

Dalje analize transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* linija krompira ukazale su na sličnosti i razlike između transformisanih linija, po pitanju ekspresije transgena, aktivnosti CKX i nivoa endogenih citokinina i indol-sirćetne kiseline u izdancima i korenovima. U nastavku su detaljno opisane analize koje se odnose na pet transformisanih linija odabranih na osnovu visokog nivoa ekspresije transgena i aktivnosti CKX u biljkama ovih linija. Reč je o dve transformisane *AtCKX1* linije (*AtCKX1-6a* i *AtCKX1-36a*) i tri *AtCKX2* linije (*AtCKX2-39*, *AtCKX2-48* i *AtCKX2-51*).

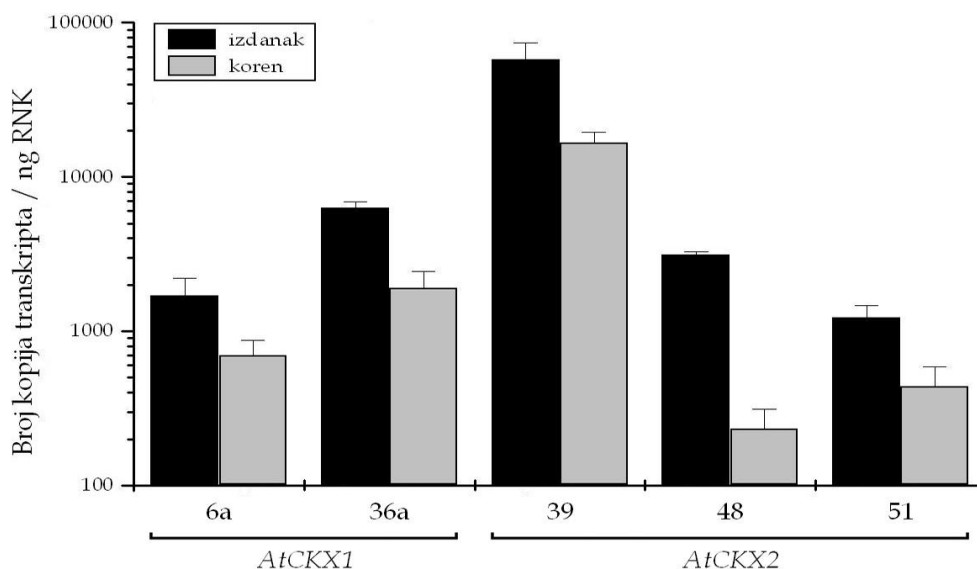
4.2.1. qRT-PCR analiza

Nivo ekspresije gena *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2* u transformisanim linijama krompira određen je pomoću qRT-PCR analize. Fragmenti cDNK gena *AtCKX1* i *AtCKX2*, dužine 127, odnosno 115 bp amplifikovani su sparivanjem prajmera na 56°C (*AtCKX1*), odnosno na 57°C (*AtCKX2*) pod standardnim uslovima qPCR reakcije, nakon čega je specifičnost amplifikacije proverena analizom krive topljenja.

Ekspresija gena *AtCKX* potvrđena je kako u izdancima, tako i u korenovima svih transformisanih linija.

Geni *AtCKX* su kod svih analiziranih linija bili jače eksprimirani u izdancima nego u korenovima. Kod transformisanih *AtCKX1* linija količina transkripta je varirala od 690 do 6300 kopija po ng RNK, dok je kod transformisanih *AtCKX2* linija variranje bilo veće i kretalo se u opsegu od 230 do

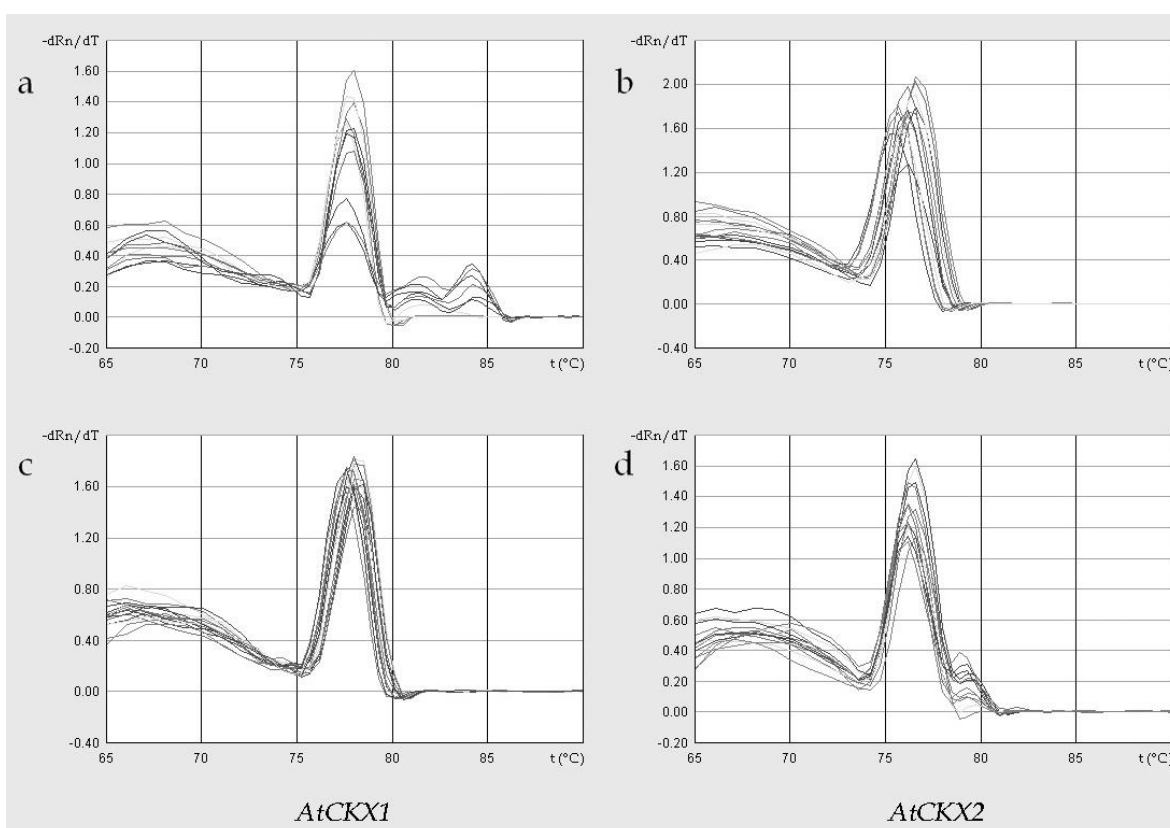
58000 kopija po ng RNK (slika 9). Daleko najintenzivnija ekspresija *AtCKX* zabeležena je kod linije *AtCKX2-39*, u čijim izdancima je bilo 58000, a u korenovima 17000 kopija transkripta *AtCKX2* po ng RNK.



Slika 9. qRT-PCR analiza ekspresije transgena u izdancima i korenovima 30 dana starih biljaka krompira transformisanih genom *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2*, gajenih *in vitro*. Količina transkripta *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2* prikazana je kao broj kopija po nanogramu ukupne RNK. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SD ($n = 3$). Kod kontrolnih biljaka nije došlo do specifične amplifikacije fragmenata sekvenci *AtCKX1* i *AtCKX2*, zbog čega kontrola nije prikazana na grafiku.

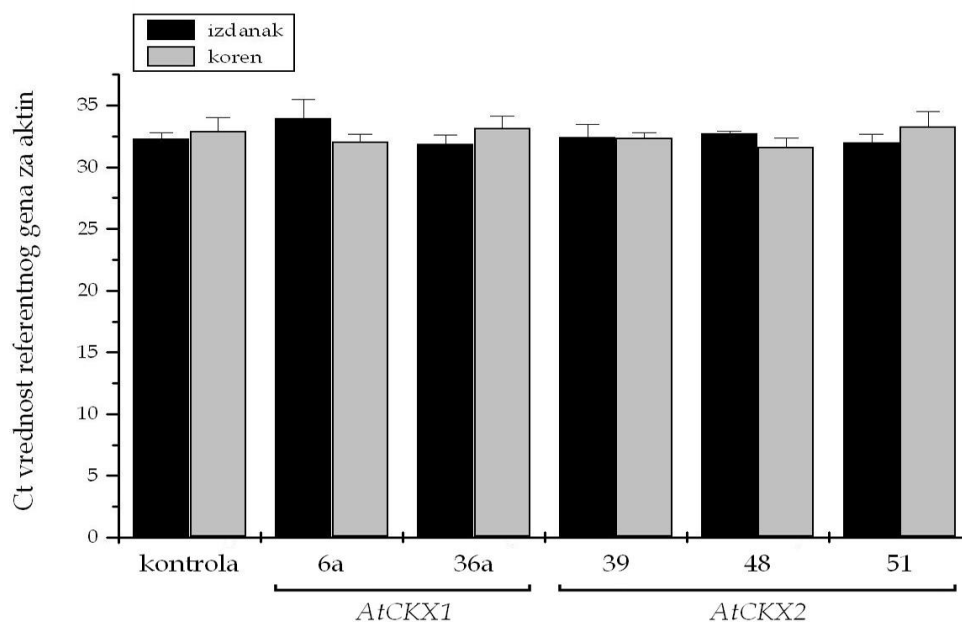
Analiza krive topljenja pokazala je da su produkti amplifikacije cDNK svih transformisanih linija specifični. Krive topljenja su kod svih uzoraka pravilne, sa naglašenim jedinstvenim maksimumom vrednosti $-dRn/dT$ koji se u slučaju amplifikacije *AtCKX1* cDNK nalazio u temperaturnom rasponu od 77-78°C (slika

10a), a kod amplifikacije *AtCKX2* cDNK u rasponu od 75-77°C (slika 10b). Budući da je kriva topljenja fragmenata dobijenih umnožavanjem digeriranog plazmida pBinHTX-*AtCKX1* u seriji razblaženja pokazivala maksimum vrednosti $-dR_n/dT$ na temperaturi od 77,6°C (slika 10c), a za plazmid pBinHTX-*AtCKX2* na temperaturi od 76,4°C (slika 10d), produkti amplifikacije u uzorcima cDNK svih transformisanih linija se mogu smatrati visoko specifičnim. U uzorcima cDNK iz korenova i izdanaka kontrolnih biljaka uočena je samo nespecifična amplifikacija sa prajmerima za gene *AtCKX1* i *AtCKX2*.

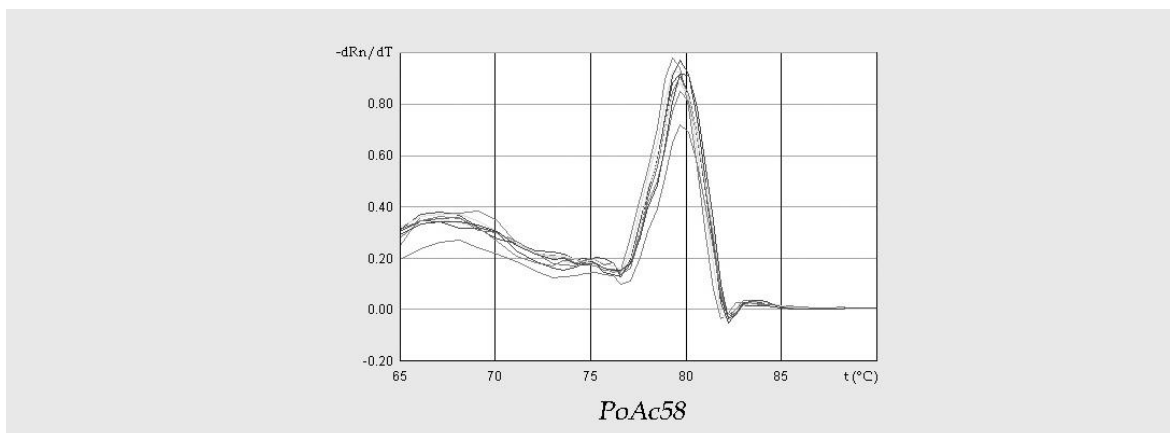


Slika 10. Krive topljenja produkata qPCR amplifikacije cDNK izdanaka i korenova 30 dana starih biljaka krompira transformisanih genima *AtCKX*, pomoću prajmera specifičnih za sekvencu transgena *AtCKX1* (a) i *AtCKX2* (b). Poređenje sa krivama topljenja produkata amplifikacije plazmidne DNK pBinHTX-*AtCKX1* (c) i pBinHTX-*AtCKX2* (d) pomoću istih prajmera, ukazuje na visoku specifičnost amplifikacije cDNK transformisanih biljaka pomoću prajmera specifičnih za transgen.

Ujednačena količina ukupne cDNK u svim uzorcima na početku qPCR analize potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena *PoAc58*, konstitutivno eksprimiranog gena koji kodira aktin kod krompira. Prosečan broj ciklusa qPCR reakcije posle kojih se dostiže prag detekcije referentnog gena *PoAc58* (Ct vrednost) prilično je ujednačen što potvrđuje odsustvo statistički značajne razlike između svih analiziranih uzoraka cDNK izdanaka i korenova, kako kontrolne, tako i transformisanih linija (slika 11). Specifičnost amplifikacije gena *PoAc58* pokazana je analizom krive topljenja, koja kod svih analiziranih uzoraka ima jasan jedinstven maksimum vrednosti $-dRn/dT$ u temperaturnom opsegu od 79-80°C (slika 12).



Slika 11. Broj ciklusa posle kojih se dostiže prag detekcije amplifikacije (Ct vrednost) sekvence referentnog gena *PoAc58* prilikom qPCR amplifikacije cDNK izdanaka i korenova 30 dana starih kontrolnih i transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* biljaka gajenih *in vitro*. Prikazani podaci predstavljaju srednju Ct vrednost \pm SD ($n = 3$). Odsustvo statistički značajne razlike između Ct vrednosti kod bilo koja dva uzorka cDNK prema Mann-Whitney-jevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$ ukazuje na ujednačeno prisustvo transkripta aktinskog gena u svim uzorcima.



Slika 12. Zbirne krive topljenja produkata qPCR amplifikacije cDNK izdanaka i korenova 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*, pomoću prajmera specifičnih za sekvencu referentnog gena *PoAc58*. Ujednačen oblik krive i položaj maksimuma potvrđuju specifičnost amplifikacije.

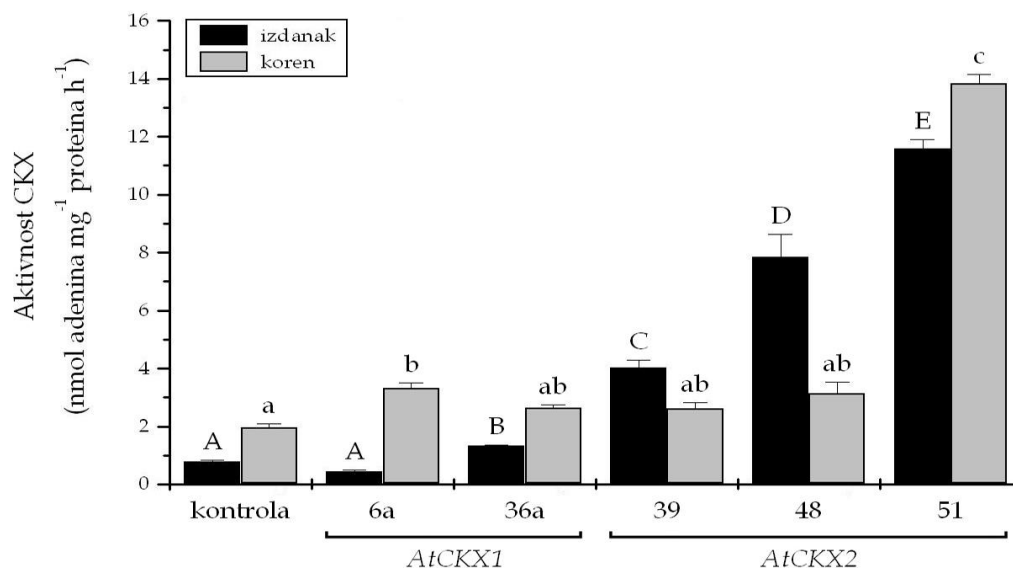
4.3. Aktivnost citokinin oksidaze / dehidrogenaze (CKX) u izdancima i korenovima *AtCKX1* i *AtCKX2* biljaka krompira gajenih *in vitro*

Proteinski ekstrakti izdanaka i korenova 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* biljaka gajenih *in vitro* analizirani su testom aktivnosti citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX) uz korišćenje $[2\text{-}^3\text{H}]\text{iP}$, $[2\text{-}^3\text{H}]\text{tZ}$ ili $[2\text{-}^3\text{H}]\text{cZ}$ kao supstrata. Najpogodniji supstrat za CKX bio je $[2\text{-}^3\text{H}]\text{iP}$, kako u izdancima tako i u korenovima svih analiziranih biljaka (tabela 18). Proteinski ekstrakti izdanaka i korenova kontrolnih, kao i biljaka linije *AtCKX1*-36a pokazivali su veću aktivnost CKX sa $[2\text{-}^3\text{H}]\text{cZ}$ kao supstratom nego sa $[2\text{-}^3\text{H}]\text{tZ}$. Suprotno tome, u analiziranim tkivima linije *AtCKX2*-51, kao i u izdancima linije *AtCKX2*-48, veća aktivnost je detektovana sa $[2\text{-}^3\text{H}]\text{tZ}$ kao supstratom nego sa $[2\text{-}^3\text{H}]\text{cZ}$. U ovim slučajevima brzina razgradnje $[2\text{-}^3\text{H}]\text{tZ}$ bila je izuzetno (10-20 puta) viša od kontrolnih vrednosti, dok se razgradnja $[2\text{-}^3\text{H}]\text{cZ}$ odvijala brzinom istog reda veličine, ili čak sporije u odnosu na kontrolne vrednosti (tabela 18).

Tabela 18. Aktivnost CKX u proteinskim ekstraktima 30 dana starih izdanaka i korenova kontrolnih i *AtCKX* biljaka gajenih *in vitro*. Kao supstrat su korišćeni citokininski molekuli obeleženi tricijumom ($2\text{-}^3\text{H}$). Aktivnost CKX je merena kao stopa razgradnje [$2\text{-}^3\text{H}$]-obeleženog citokinina do [$2\text{-}^3\text{H}$]-adenina.

Supstrat → Linija ↓	Aktivnost CKX [nmol Ade.mg ⁻¹ protein.h ⁻¹] u proteinskim ekstraktima izdanaka				Aktivnost CKX [nmol Ade.mg ⁻¹ protein.h ⁻¹] u proteinskim ekstraktima korenova			
	[$2\text{-}^3\text{H}$]iP	[$2\text{-}^3\text{H}$]tZ	[$2\text{-}^3\text{H}$]cZ	korišćenje supstrata	[$2\text{-}^3\text{H}$]iP	[$2\text{-}^3\text{H}$]tZ	[$2\text{-}^3\text{H}$]cZ	korišćenje supstrata
kontrola	0,782	0,074	0,302	iP>cZ >tZ	1,970	0,238	0,811	iP>cZ >tZ
<i>AtCKX1</i> -36a	1,265	0,064	0,352	iP>cZ >tZ	2,508	0,203	0,759	iP>cZ >tZ
<i>AtCKX2</i> -48	7,478	0,742	0,038	iP>tZ >cZ	2,935	0,327	1,504	iP>cZ >tZ
<i>AtCKX2</i> -51	11,181	1,509	0,134	iP>tZ >cZ	13,135	2,541	1,208	iP>tZ >cZ

Aktivnost CKX je prikazana kao stopa razgradnje najpogodnijeg supstrata [$2\text{-}^3\text{H}$]iP do [$2\text{-}^3\text{H}$]adenina (slika 13). U izdancima kontrolnih biljaka izmerena vrednost aktivnosti CKX je bila 0,78 nmol Ade.mg⁻¹protein.h⁻¹. Značajno povišena aktivnost CKX u odnosu na kontrolu je otkrivena u izdancima svih transformisanih linija osim *AtCKX1*-6a, pri čemu su veće vrednosti dostignute u slučaju *AtCKX2* linija, u odnosu na *AtCKX1* linije. Linija *AtCKX2*-51 pokazala je najveću vrednost aktivnosti CKX (14,3 puta više u odnosu na kontrolnu vrednost). U korenovima kontrolnih biljaka aktivnost CKX je bila viša nego u izdancima i iznosila je 1,97 nmol Ade.mg⁻¹protein.h⁻¹. Značajno povišena aktivnost CKX u odnosu na kontrolu izmerena je u korenovima dve transformisane linije, *AtCKX1*-6a i *AtCKX2*-51. Ponovo je aktivnost CKX bila najviša kod linije *AtCKX2*-51, sa vrednošću 6,7 puta višom od kontrolne (slika 13).



Slika 13. Aktivnost CKX u proteinskim ekstraktima izdanaka i korenova 30 dana starih kontrolnih i transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* biljaka gajenih *in vitro*. Aktivnost CKX je izražena kao stopa razgradnje [2-³H]iP do [2-³H]adenina. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± SG ($n = 3$). Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (izdanci), odnosno istim malim slovom (korenovi) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema Mann-Whitney-jevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za izdanke i korenove.

4.4. Analiza endogenih biljnih hormona

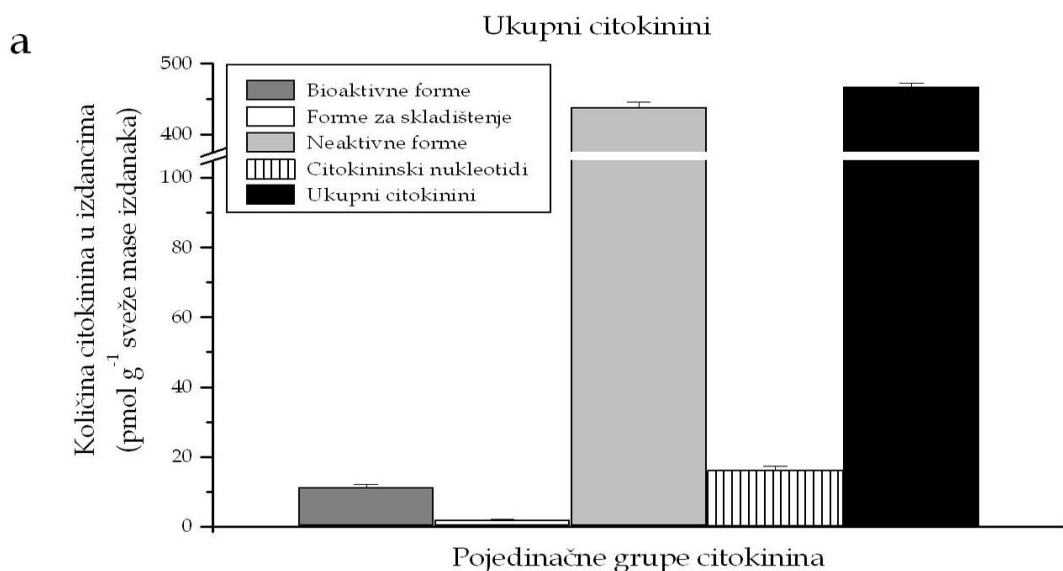
Endogeni biljni hormoni (citokinini i IAA) kvantifikovani su u izdancima i korenovima 30 dana starih netransformisanih biljaka, kao i biljaka *AtCKX* linija krompira gajenih *in vitro*. U cilju utvrđivanja promena u citokininskoj homeostazi kod transformisanih biljaka najpre je analiziran citokininski profil netransformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro* (slike 14 i 15), a zatim su upoređeni nivoi pojedinih grupa citokinina kontrolnih biljaka sa linijama

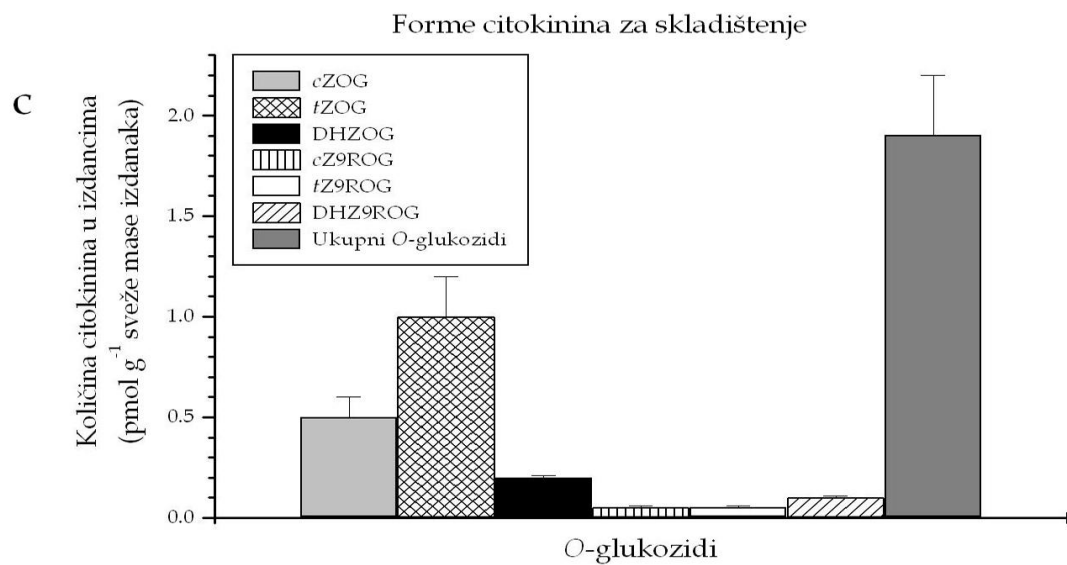
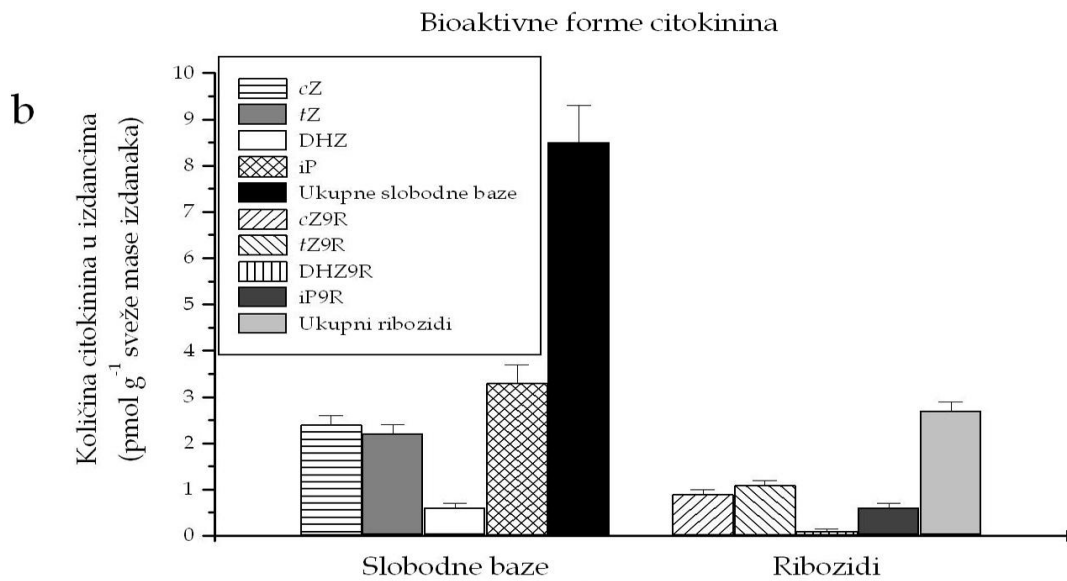
transformisanih biljaka (slika 16). Najzad, utvrđen je nivo indol-sirćetne kiseline (IAA) kod transformisanih biljaka (slika 19) i upoređen sa nivoom kod kontrolnih biljaka. Promene u nivou IAA su upoređene sa promenama u nivou bioaktivnih citokinina (slika 20).

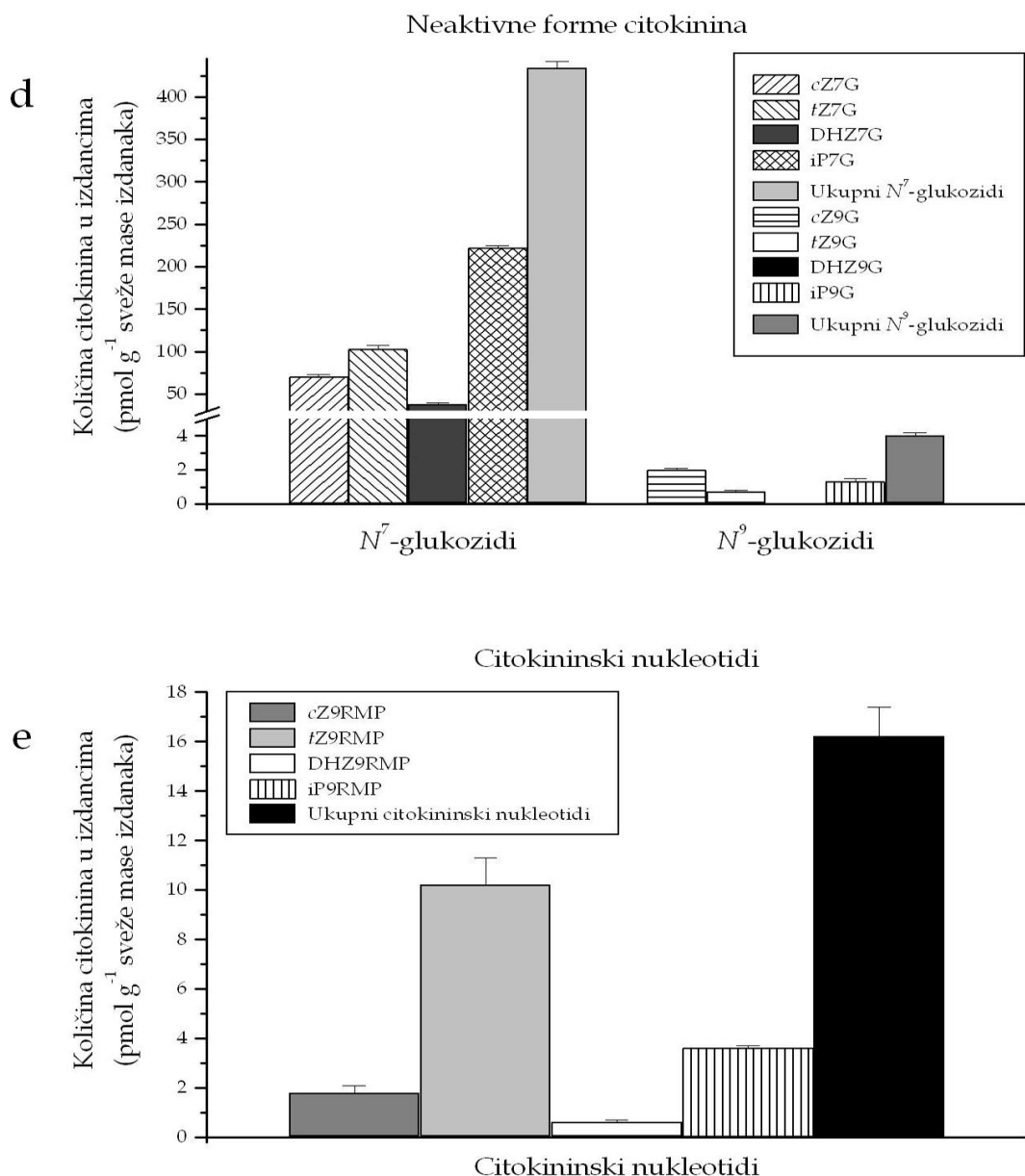
4.4.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*

Kvantifikacijom endogenih citokinina dobijen je citokininski profil izdanaka i korenova 30 dana starih netransformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Endogeni citokinini su na osnovu biološke funkcije podeljeni u četiri grupe: bioaktivne forme citokinina, forme citokinina za skladištenje, neaktivne forme citokinina i citokininski nukleotidi (Dwivedi i sar. 2010).

Citokininski profil izdanaka krompira prikazan je na slici 14. Ukupni nivo citokinina u izdancima krompira iznosio je 467,1 pmol g⁻¹ sveže mase izdanaka (slika 14a). Najveći udeo u sadržaju citokinina u izdancima (93,7%) imale su neaktivne forme citokinina, dok su citokininski nukleotidi, bioaktivne forme i forme citokinina za skladištenje bili daleko manje zastupljeni.







Slika 14. Citokininski profil izdanaka 30 dana starih biljaka kontrolne linije krompira u kulturi *in vitro*: (a) Endogeni nivo ukupnih citokinina i četiri grupe citokinina koje ulaze u njihov sastav; (b) Sastav bioaktivnih formi citokinina (slobodnih baza i ribozida); (c) Sastav formi citokinina za skladištenje (O-glukozida); (d) Sastav neaktivnih formi citokinina (N^7 - i N^9 -glukozida) i (e) Sastav citokininskih nukleotida. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 3$).

Bioaktivne forme citokinina bile su zastupljene u količini od 11,2 pmol g⁻¹ sveže mase izdanaka, odnosno 2,4% ukupnih citokinina u izdancima (slika 14a). Ova grupa citokinina obuhvata slobodne citokininske baze i ribozide (slika 14b). Slobodne citokininske baze su u izdancima zastupljenije od ribozida i čine oko tri četvrtine bioaktivnih formi citokinina. Najzastupljenija bioaktivna forma citokinina u izdancima krompira je iP, za kojim slede cZ i tZ koji su približno jednako zastupljeni, dok je DHZ slabije zastupljen. Ribozidi čine četvrtinu bioaktivnih formi citokinina u izdancima krompira, a među njima su cZ9R i tZ9R zastupljeniji nego iP9R. Najmanje zastupljen ribozid je DHZ9R čije je prisustvo u izdancima bilo malo iznad praga detekcije (slika 14b).

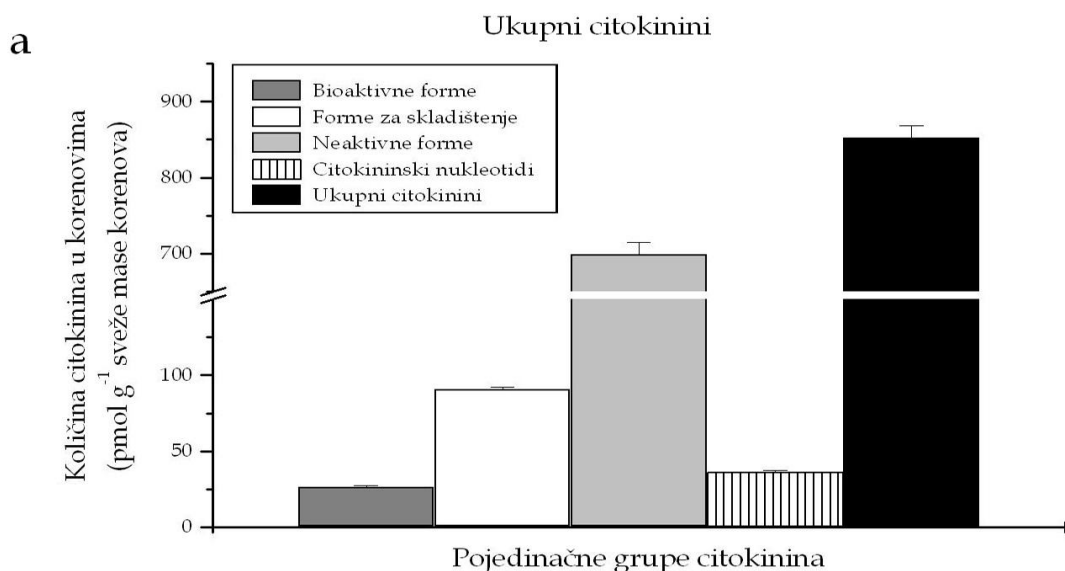
Forme citokinina za skladištenje su najmanje zastupljena grupa citokinina u izdancima krompira i prisutne su u količini od 1,9 pmol g⁻¹ sveže mase izdanaka, odnosno 0,4% ukupnih citokinina u izdancima (slika 14a). Ovi citokinini predstavljaju O-glukozilovane forme *trans*- i *cis*-zeatina i dihidrozeatina, kao i njihovih ribozida (slika 14c). Nisu detektovani O-glukozidi izopentenil-adenina niti njegovog ribozida. U izdancima dominiraju O-glukozilovane baze, tZOG, cZOG i DHZOG, dok su O-glukozilovani ribozidi prisutni malo iznad granice detekcije (slika 14c).

Neaktivne forme citokinina, odnosno N-glukozidi, predstavljaju najzastupljeniju grupu citokinina u izdancima krompira gajenim *in vitro* (437,8 pmol g⁻¹ sveže mase izdanaka, odnosno 93,7% ukupnih citokinina u izdancima; slika 14a). Ova grupa citokinina obuhvata N⁷-glukozide koji dominiraju u izdancima krompira, kao i N⁹-glukozide, koji su daleko manje zastupljeni (slika 14d). Preko 99% količine neaktivnih formi citokinina (odnosno, čak 92,9% ukupnih citokinina) u izdancima krompira čine N⁷-glukozidi. Oko polovinu ukupne količine N⁷-glukozida čini iP7G, koji predstavlja najzastupljeniju od svih formi

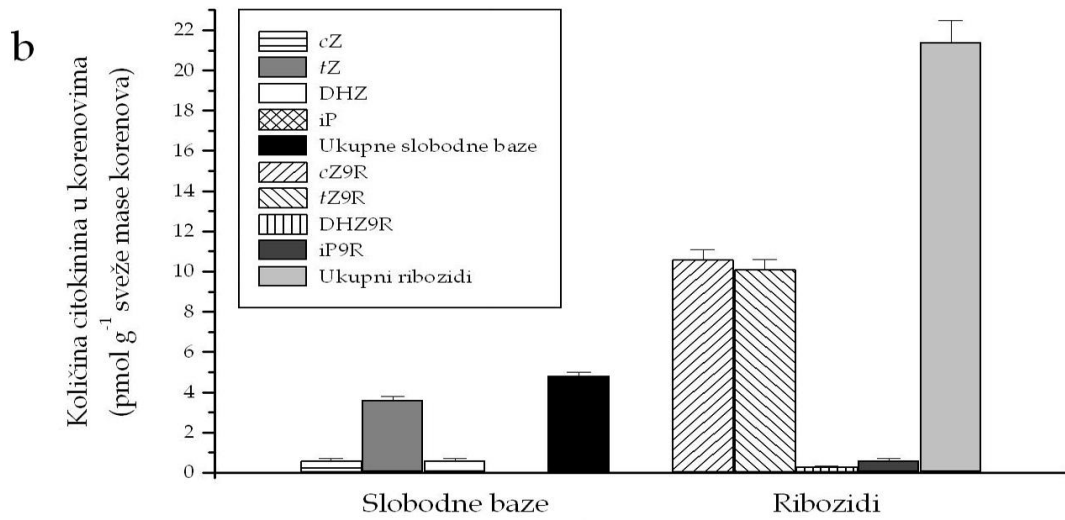
citokinina u izdancima krompira. Slede *tZ7G* i *cZ7G*, dok je DHZ7G najmanje zastupljen *N*⁷-glukozid. U manjoj količini su prisutni *N*⁹-glukozidi *cZ9G*, *iP9G* i *tZ9G*, dok DHZ9G nije detektovan u izdancima krompira (slika 14d).

Nivo **citokininskih nukleotida - monofosfata** je gotovo za polovinu viši od nivoa bioaktivnih citokinina u izdancima krompira. Citokininski nukleotidi su zastupljeni u količini od 16,2 pmol g⁻¹ sveže mase izdanaka odnosno 3,5% ukupnih citokinina u izdancima (slika 14a). Daleko najzastupljeniji citokininski nukleotid je *tZ9RMP*, a sledi *iP9RMP*, dok su *cZ9RMP* i *DHZ9RMP* manje zastupljeni (slika 14e).

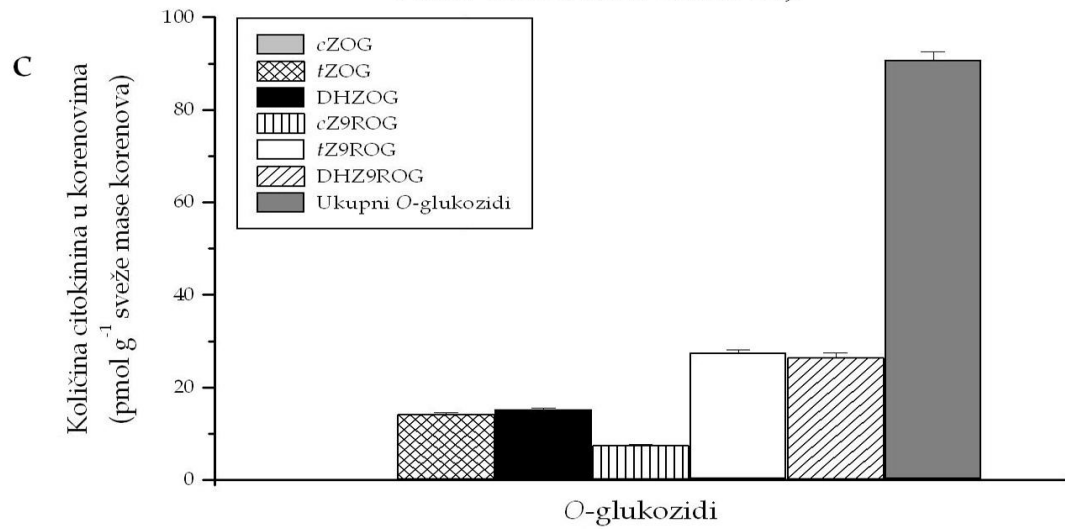
Citokininski profil korenova 30 dana starih biljaka krompira gajenih *in vitro* prikazan je na slici 15. U korenovima je izmeren viši nivo ukupnih citokinina nego u izdancima, koji iznosi 851,9 pmol g⁻¹ sveže mase korenova. Najveći udeo u sadržaju citokinina u korenovima (82,0%) imale su neaktivne forme citokinina, a značajan udeo (10,7% ukupnih citokinina) imale su i forme citokinina za skladištenje. Citokininski nukleotidi i bioaktivne forme citokinina bili su manje zastupljeni (slika 15a).

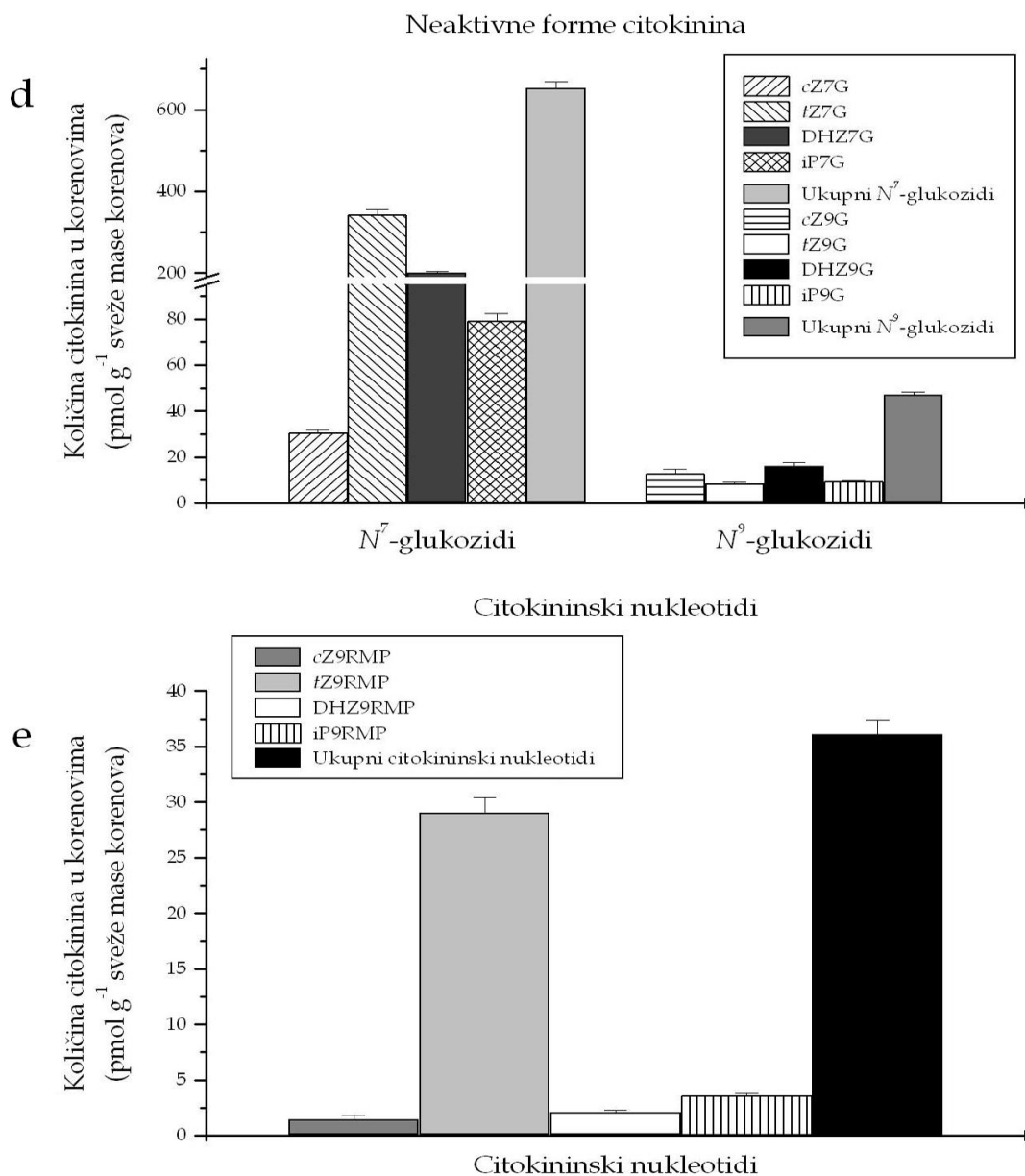


Bioaktivne forme citokinina



Forme citokinina za skladištenje





Slika 15. Citokininski profil korenova 30 dana starih kontrolnih biljaka krompira u kulturi *in vitro*: (a) Endogeni nivo ukupnih citokinina i četiri grupe citokinina koje ulaze u njihov sastav; (b) Sastav bioaktivnih formi citokinina (slobodnih baza i ribozida); (c) Sastav formi citokinina za skladištenje (*O*-glukozida); (d) Sastav neaktivnih formi citokinina (N^7 - i N^9 -glukozida) i (e) Sastav citokininskih nukleotida. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 3$).

Bioaktivne forme citokinina su zastupljene u količini od 26,2 pmol g⁻¹ sveže mase korenova, što predstavlja 3,1% ukupnih citokinina u korenovima (slika 15a). Za razliku od izdanaka, u korenovima krompira ribozidi su bili zastupljeniji od slobodnih baza, i to više nego četverostruko (slika 15b). U korenovima su, kao i u izdancima, *cZ9R* i *tZ9R* najzastupljeniji ribozidi, ali ovde su njihovi nivoi preko 15 puta veći u odnosu na nivo *iP9R*. Kao i u izdancima, i ovde je *DHZ9R* najslabije zastupljen ribozid, sa nivoom malo iznad praga detekcije. Od slobodnih baza u korenovima krompira je najzastupljeniji *tZ*, dok su *cZ* i *DHZ* oko šest puta manje zastupljeni. Prisustvo *iP* u korenovima krompira nije detektovano (slika 15b).

Forme citokinina za skladištenje su u korenovima krompira oko 50 puta zastupljenije nego u izdancima. Prisutne su u količini od 90,7 pmol g⁻¹ sveže mase korenova (10,7% ukupnih citokinina u korenovima) što ih čini oko tri puta zastupljenijim u odnosu na količinu bioaktivnih citokinina ili citokininskih nukleotida (slika 15a). Kao ni u izdancima, ni u korenovima nisu detektovani *O*-glukozidi izopentenil-adenina niti njegovog ribozida (slika 15c). Dok su u izdancima zastupljenije *O*-glukozilovane baze, u korenovima dominiraju *O*-glukozilovani ribozidi i to pre svega *tZ9ROG* i *DHZ9ROG*. Pored toga, u korenovima nije detektovano prisustvo *cZOG* (slika 15c).

Neaktivne forme citokinina, odnosno *N*-glukozidi, najzastupljenija su grupa citokinina u korenovima, baš kao i u izdancima krompira gajenim *in vitro*. Njihov nivo iznosi 698,9 pmol g⁻¹ sveže mase korenova (slika 15a), odnosno 82,0% ukupnih citokinina u korenovima krompira. Kao i u izdancima, *N*⁷-glukozidi su najzastupljenija grupa citokinina i u korenovima biljaka krompira gajenih *in vitro*, čineći 93,3% neaktivnih formi citokinina, odnosno 76,5% ukupnih citokinina (slika 15d). Više od polovine ukupne količine *N*⁷-glukozida čini *tZ7G*, koji predstavlja

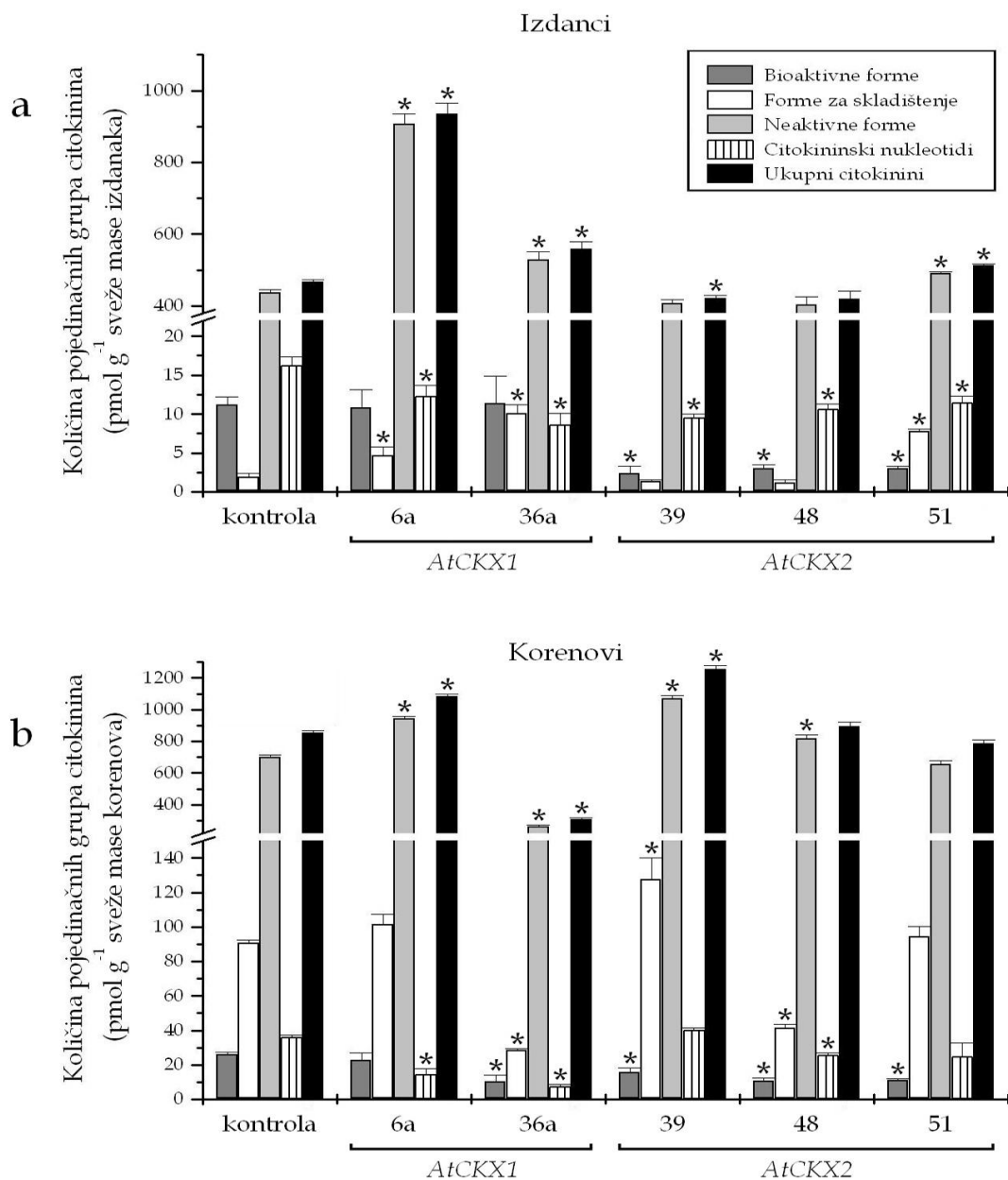
najzastupljeniju od svih formi citokinina u korenovima krompira. Slede DHZ7G, iP7G i cZ7G, a zatim i N⁹-glukozidi, DHZ9G, cZ9G, iP9G i tZ9G (slika 15d).

Nivo **citokininskih nukleotida - monofosfata** je i u korenovima, kao i u izdancima krompira nešto viši od nivoa bioaktivnih citokinina. Citokininski nukleotidi su zastupljeni u količini od 36,1 pmol g⁻¹ sveže mase korenova odnosno 4,2% ukupnih citokinina u korenovima (slika 15a). Kao i u izdancima, daleko najzastupljeniji citokininski nukleotid je tZ9RMP, a sledi iP9RMP, dok su cZ9RMP i DHZ9RMP manje zastupljeni (slika 15e).

4.4.2. Nivoi endogenih citokinina kod AtCKX linija krompira

Kvantifikacija endogenih citokinina kod biljaka pet AtCKX linija krompira gajenih *in vitro* obavljena je u cilju poređenja nivoa ukupnih citokinina i pojedinačnih grupa citokinina kod kontrolnih i kod transformisanih biljaka.

Od pet AtCKX linija krompira, do statistički značajnog smanjenja nivoa ukupnih citokinina došlo je samo u izdancima linije AtCKX2-39 (slika 16a) i u korenovima linije AtCKX1-36a (slika 16b). Nivo ukupnih citokinina je čak značajno povećan u izdancima tri transformisane linije (AtCKX1-6a, AtCKX1-36a i AtCKX2-51; slika 16a) i korenovima dve linije (AtCKX1-6a i AtCKX2-39; slika 16b). Kod linije AtCKX2-48 količina ukupnih citokinina je u nivou kontrole i u izdancima i u korenovima.

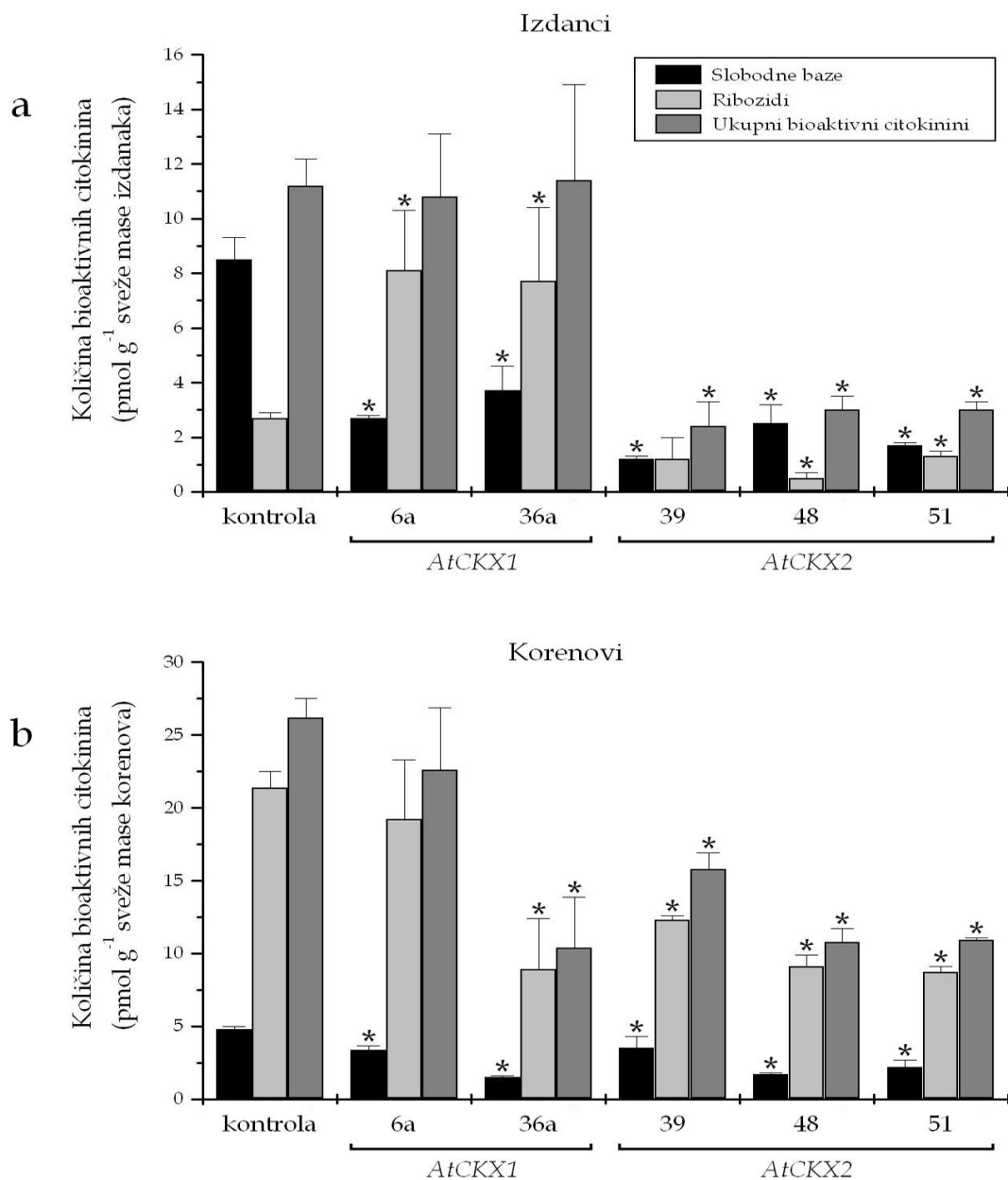


Slika 16. Citokininski profil izdanaka (a) i korenova (b) 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Citokinini su na osnovu biološke funkcije podeljeni u četiri grupe: bioaktivne forme, forme za skladištenje, neaktivne forme citokinina i citokininski nukleotidi. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 3$). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost, prema Mann-Whitney-jevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$, označene su zvezdicom (*).

Nivo bioaktivnih citokinina značajno je smanjen kod svih *AtCKX2* linija krompira, i to čak 3-5 puta u izdancima (slika 16a) i oko 2 puta u korenovima (slika 16b). Nivo bioaktivnih citokinina takođe je značajno smanjen (oko 2,5 puta) i u korenovima linije *AtCKX1-36a*, dok u izdancima ove linije, kao i u izdancima i korenovima linije *AtCKX1-6a* nije došlo do značajne promene u nivou bioaktivnih formi citokinina u odnosu na kontrolu (slika 16).

U izdancima tri (*AtCKX1-6a*, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-51*) i korenovima jedne transformisane linije (*AtCKX2-39*) povišeni su nivoi kako formi citokinina za skladištenje, tako i neaktivnih formi citokinina (slika 16). Nivo neaktivnih formi citokinina je povišen i u korenovima linija *AtCKX1-6a* i *AtCKX2-48* (slika 16b). Nasuprot tome, konstatovan je snižen nivo formi citokinina za skladištenje u korenovima linija *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-48*, kao i neaktivnih formi citokinina u korenovima linije *AtCKX1-36a* (slika 16b). Nivo citokininskih nukleotida značajno je smanjen u izdancima svih pet, kao i u korenovima tri (*AtCKX1-6a*, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-48*) transformisane linije, dok kod preostale dve transformisane linije (*AtCKX2-39* i *AtCKX2-51*) nije došlo do statistički značajne promene nivoa citokininskih nukleotida (slika 16).

Na slici 17 prikazan je nivo slobodnih citokininskih baza i ribozida kao i ukupnih bioaktivnih citokinina u izdancima i korenovima *AtCKX* linija krompira, i upoređen sa istim vrednostima kod kontrolnih biljaka. Interesantno je da je nivo slobodnih citokininskih baza značajno snižen i u izdancima i u korenovima svih pet *AtCKX* linija, dok je nivo ribozida snižen u izdancima dve (*AtCKX2-48* i *AtCKX2-51*) i korenovima svih transformisanih linija osim *AtCKX1-6a*. U izdancima linije *AtCKX2-39* i korenovima *AtCKX1-6a* nema značajne promene u nivou citokininskih ribozida, dok je njihov nivo povišen u izdancima obeju linija transformisanih genom *AtCKX1* (slika 17).

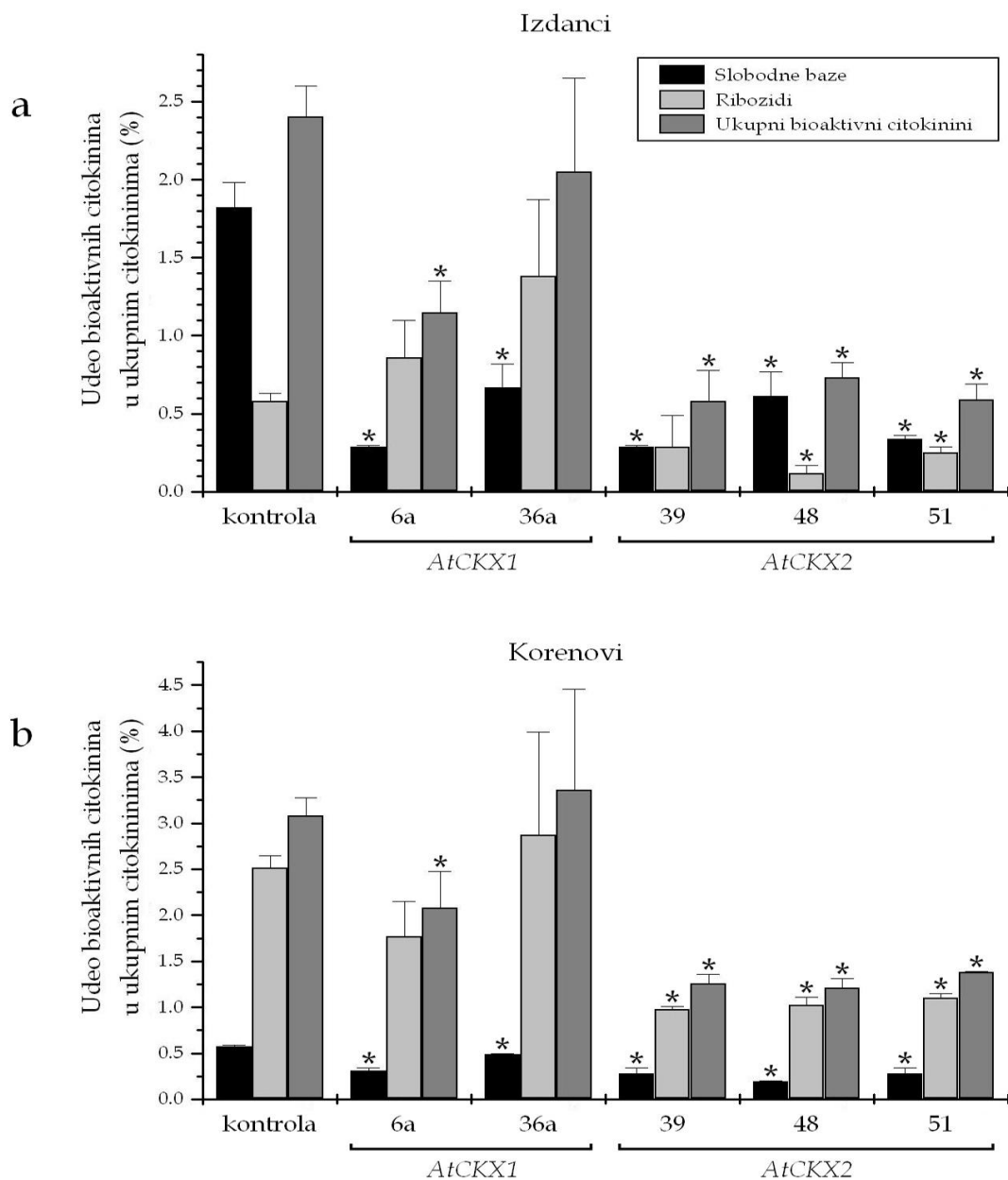


Slika 17. Sadržaj pojedinačnih (slobodne citokininske baze i ribozidi) i ukupnih bioaktivnih formi citokinina u izdancima (a) i korenovima (b) 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 3$). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost, prema Mann-Whitney-jevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$, označene su zvezdicom (*).

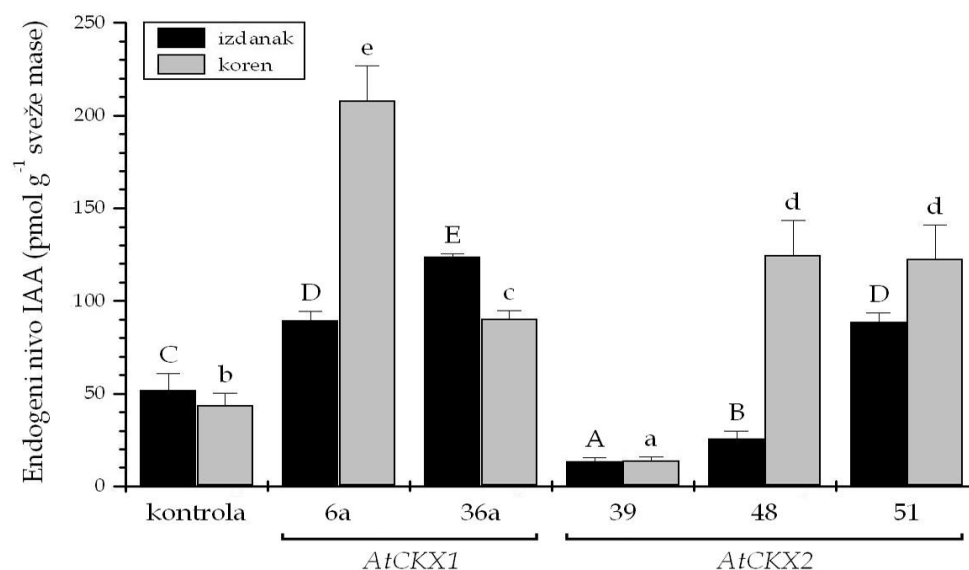
Udeo bioaktivnih citokinina u ukupnim citokininima značajno je smanjen i u izdancima i u korenovima svih transformisanih linija osim *AtCKX1-36a* (slika 18), gde se ovaj udeo ne razlikuje značajno od kontrolne vrednosti. Udeo bioaktivnih citokinina u ukupnim citokininima je naročito snižen kod *AtCKX2* linija, čak na 0,6-0,7% u izdancima (u odnosu na 2,4% kod kontrolnih biljaka) i 1,2-1,4% u korenovima (u odnosu na 3,1% kod kontrole). Udeo slobodnih citokininskih baza u ukupnim citokininima značajno je snižen i u izdancima i u korenovima svih transformisanih linija. Ovaj udeo u izdancima kontrolnih biljaka iznosi 1,8% što je kod transformanata smanjeno na 0,3-0,7%, dok u korenovima kontrolnih biljaka iznosi 0,6%, što je u korenovima transformisanih biljaka smanjeno na 0,2-0,5%. Udeo citokininskih ribozida u ukupnim citokininima smanjen je i u izdancima i u korenovima transformisanih linija *AtCKX2-48* i *AtCKX2-51*, kao i u korenovima linije *AtCKX2-39* (slika 18).

4.4.3. Nivo endogene IAA kod transformisanih linija krompira

Nivo endogene indol-sirćetne kiseline (IAA) određen je u izdancima i korenovima 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* biljaka krompira gajenih *in vitro* (slika 19). Kod kontrolnih biljaka, nivo endogene IAA je iznosio 82 pmol g⁻¹ sveže mase izdanaka, odnosno 62 pmol g⁻¹ sveže mase korenova. Nivo IAA je kod tri transformisane linije (*AtCKX1-6a*, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-51*) značajno povišen u odnosu na kontrolne vrednosti i u izdancima i u korenovima. Kod ovih linija, nivo IAA je povišen 1,5-5 puta u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, kod linije *AtCKX2-39* nivo IAA je značajno snižen i u izdancima (4 puta manja vrednost u odnosu na kontrolu) i u korenovima (3,2 puta niža vrednost od kontrole). Kod linije *AtCKX2-48* nivo IAA je značajno snižen u izdancima (na polovinu kontrolne vrednosti), ali značajno povišen u korenovima, gde dostiže gotovo trostruku vrednost kontrole (slika 19).

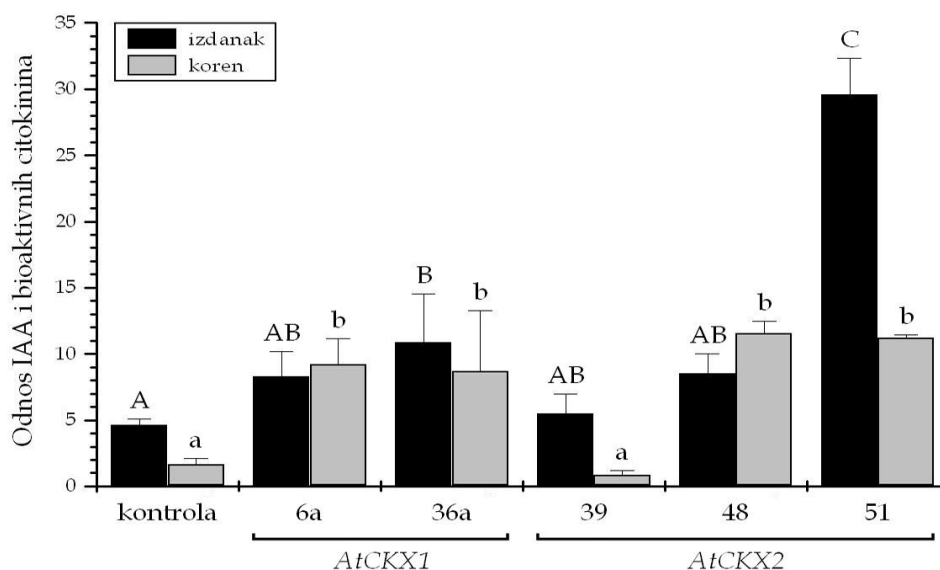


Slika 18. Udeo pojedinačnih (slobodne citokininske baze i ribozidi) i ukupnih bioaktivnih formi citokinina u ukupnim citokinima izdanaka (a) i korenova (b) 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Vrednosti su izražene u procentima od količine ukupnih citokinina. Podaci su angularno transformisani u cilju statističke obrade i reverzno transformisani inverznom funkcijom radi grafičkog prikaza, koji predstavlja srednju vrednost \pm SG ($n = 3$). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost, prema Mann-Whitney-jevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$, označene su zvezdicom (*).



Slika 19. Sadržaj endogene indol-sirćetne kiseline (IAA) u izdancima i korenovima 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 3$). Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (izdanci), odnosno istim malim slovom (korenovi) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema Mann-Whitneyjevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za izdanke i korenove.

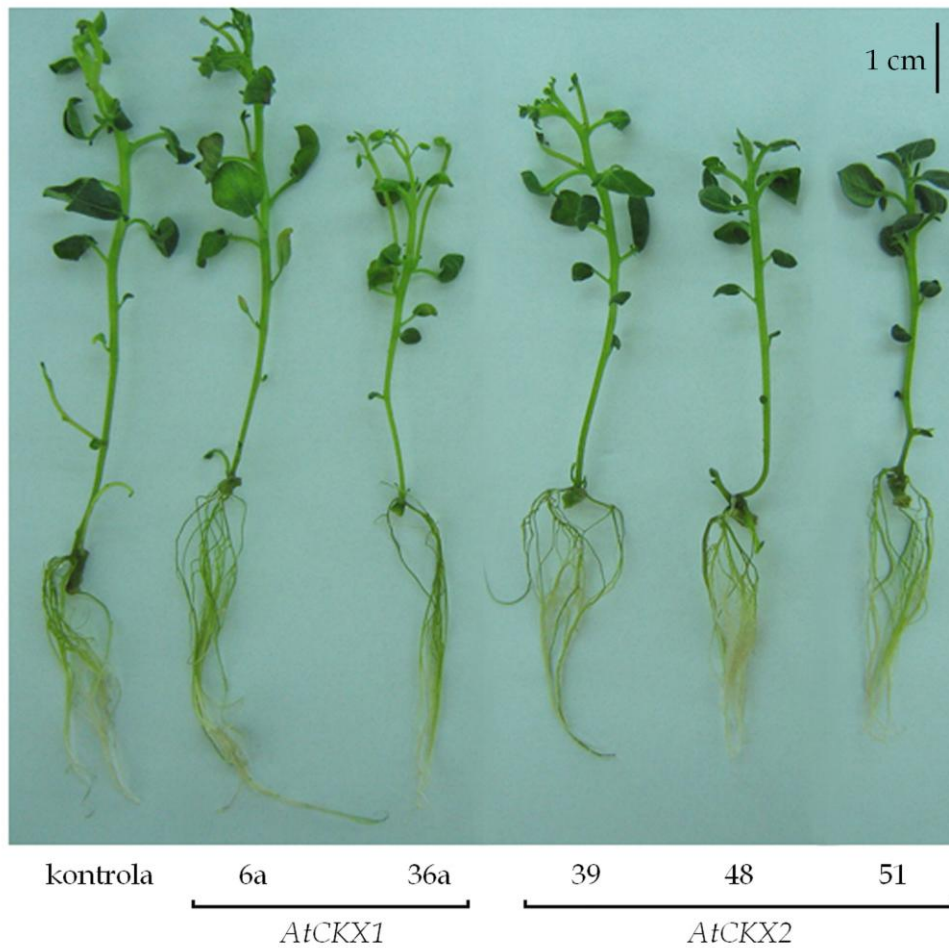
Odnos koncentracije endogene IAA i bioaktivnih citokinina značajno je povećan u izdancima linija *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-51*, kao i u korenovima svih transformisanih linija osim *AtCKX2-39* (slika 20).



Slika 20. Kvantitativni odnos endogenog nivoa indol-sirćetne kiseline (IAA) i ukupnih bioaktivnih citokinina, u izdancima i korenovima 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 3$). Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (izdanak), odnosno istim malim slovom (korenovi) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema Mann-Whitney-jevom *U*-testu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za izdanke i korenove.

4.5. Morfološke osobine *AtCKX* linija krompira gajenih *in vitro*

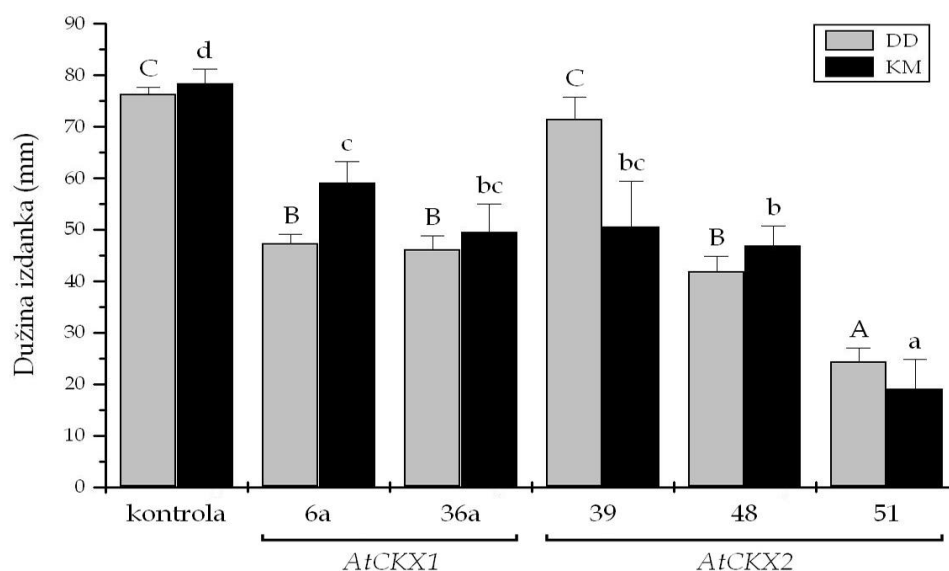
Transformisane biljke gajene *in vitro* pokazivale su razlike u odnosu na morfologiju kontrolnih biljaka. Slika 21 prikazuje izgled 30 dana starih biljaka tipičnih za kontrolnu liniju, kao i svaku od pet *AtCKX* linija krompira u uslovima dugog dana.



Slika 21. Izgled 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro* u uslovima dugog dana (16 sati svetlosti i 8 sati mraka). Biljke koje su prikazane na slici odabrane su tako da odražavaju morfološke karakteristike tipične za liniju kojoj pripadaju.

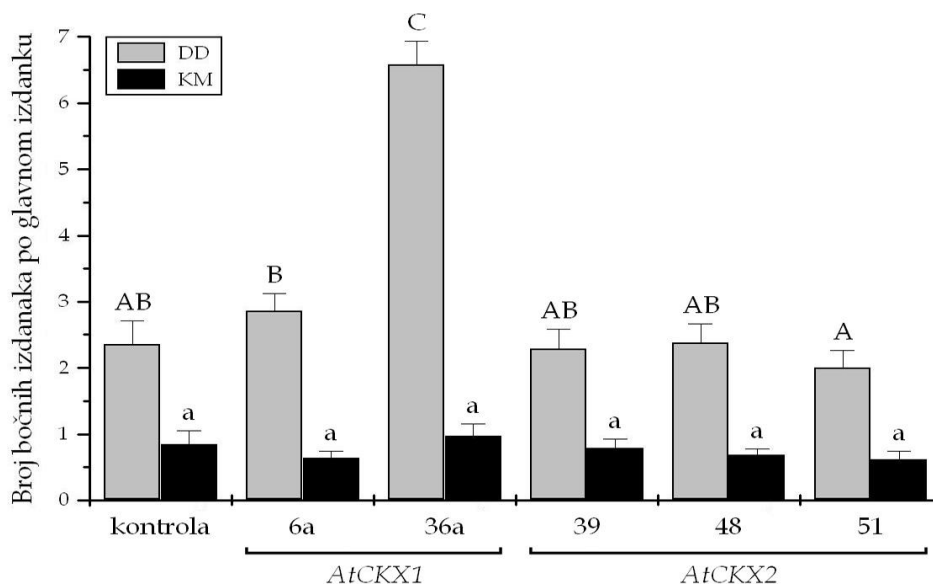
Odabrane morfološke osobine *AtCKX* linija krompira gajenih *in vitro* merene su u uslovima dugog dana ili kontinuiranog mraka i poređene sa morfološkim osobinama kontrolnih biljaka (slike 22, 23 i 24).

Na dugom danu prosečna dužina izdanka kontrolnih biljaka iznosila je oko 76 mm, a *AtCKX* biljke su razvijale značajno kraće izdanke u odnosu na kontrolu (24-50 mm), sa izuzetkom linije *AtCKX2-39* (slika 22). Najkraće izdanke razvijale su biljke linije *AtCKX2-51*. U kontinuiranom mraku kontrolne biljke su razvijale izdanke prosečne dužine 78 mm, dok je dužina izdanaka svih transformisanih linija bila značajno manja. Najkraći izdanci, prosečne dužine 19 mm, javljali su se ponovo kod linije *AtCKX2-51* (slika 22).



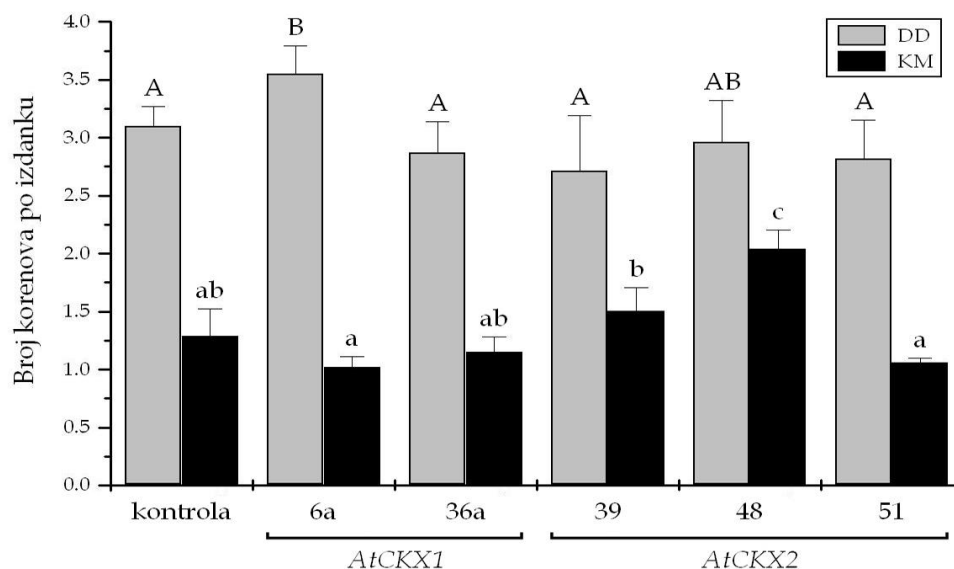
Slika 22. Dužina izdanka 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro* u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 90$). Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (DD), odnosno istim malim slovom (KM) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za podatke u uslovima dugog dana i kontinuiranog mraka.

Prosečan broj bočnih izdanaka kod kontrolnih biljaka posle 30 dana u kulturi, u uslovima dugog dana bio je 2,36, dok je kod linije *AtCKX1-36a* bio značajno veći i iznosio čak 6,58 (slika 23). Kod ostalih transformisanih *AtCKX* linija ovaj broj je varirao od 2,00 do 2,86, bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. U kontinuiranom mraku nije zabeleženo značajno variranje u broju bočnih izdanaka, koji se kod kontrole i svih transformisanih linija kretao između 0,62 i 0,97 (slika 23).



Slika 23. Broj bočnih izdanaka po glavnom izdanku 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro* u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 90$). Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (DD), odnosno istim malim slovom (KM) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za podatke u uslovima dugog dana i kontinuiranog mraka.

Kod kontrolnih biljaka gajenih 30 dana na dugom danu prosečan broj korenova je iznosio 3,10 (slika 24). Biljke linije *AtCKX1-6a* razvijale su značajno veći broj korenova (3,55), dok su kod ostalih linija razvijale broj korenova približan kontroli, od 2,71 do 2,96. U kontinuiranom mraku kontrolne biljke su imale prosečan broj korenova 1,29, a značajno veći broj korenova (2,04) se javljao kod linije *AtCKX2-48*. Kod ostalih transformisanih linija broj korenova je varirao od 1,02 do 1,50, bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (slika 24).



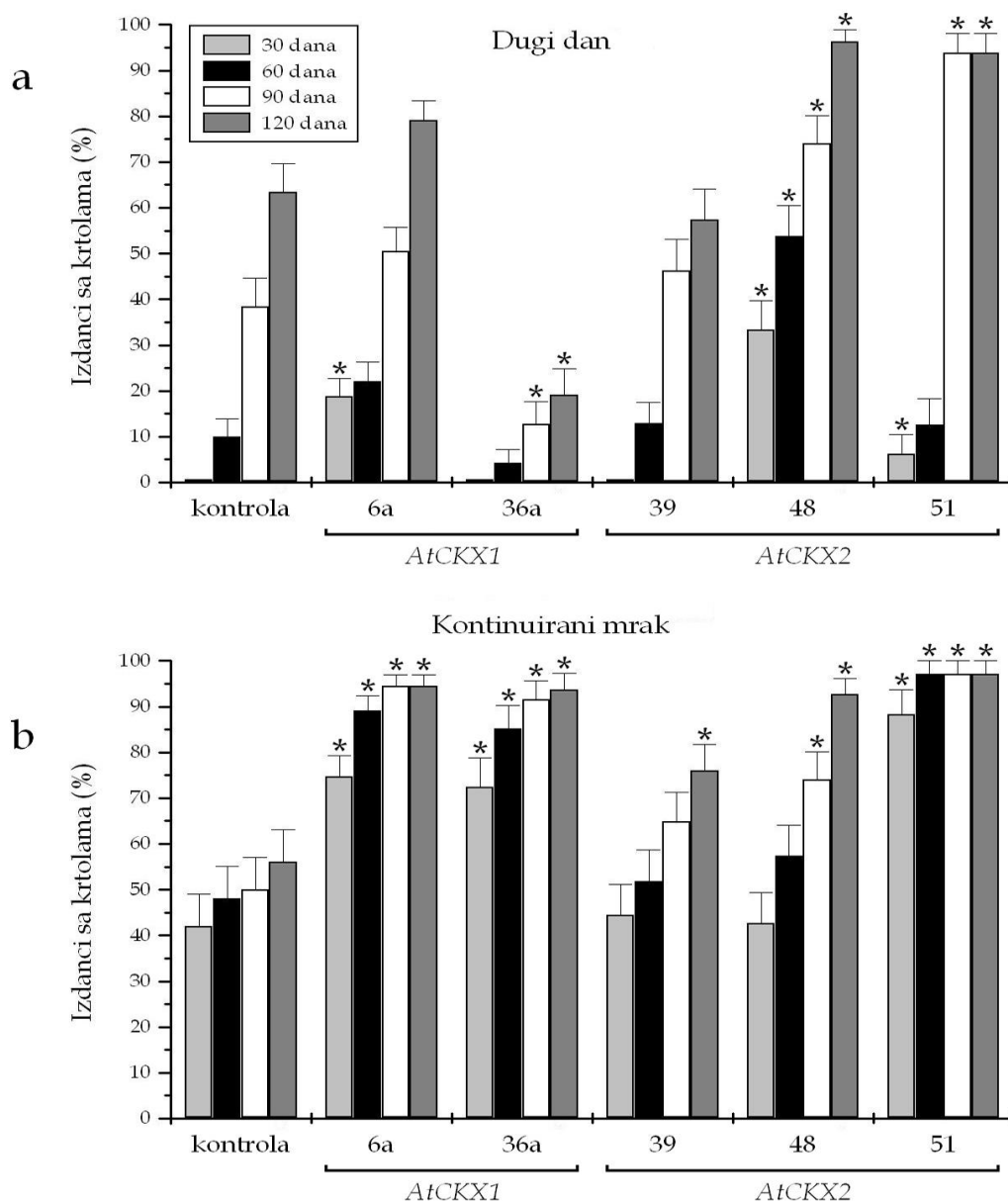
Slika 24. Broj korenova kod 30 dana starih kontrolnih i *AtCKX* transformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro* u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 90$). Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (DD), odnosno istim malim slovom (KM) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za podatke u uslovima dugog dana i kontinuiranog mraka.

4.6. Tuberizacija kod *AtCKX* linija krompira gajenih *in vitro*

Kod *AtCKX* linija krompira gajenih *in vitro* uočene su promene u formiranju krtola u odnosu na kontrolne biljke. Ove promene su zabeležene tokom supkulture koja je trajala 120 dana, praćenjem parametara tuberizacije: procenta izdanaka koji su razvili krtole (slika 25), broja krtola po eksplantatu-izdanku (slika 26) i prečnika formiranih krtola (slika 27). Posle 120 dana izmerene su i mase svih krtola koje su se do tada formirale (slika 28).

4.6.1. Procenat izdanaka sa krtolama

Prve razlike u formiranju krtola u neindukujućim uslovima (dugi dan) između *AtCKX* linija krompira i kontrole, bile su uočljive već nakon 30 dana u kulturi. Kontrolne biljke nisu razvijale krtole u toku prvih 30 dana, što je takođe bio slučaj i sa linijama *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-39* (slika 25a). Nasuprot tome, krtole su se pojavile na izdancima biljaka kod linija *AtCKX1-6a* (18,7% izdanaka je razvilo krtole), *AtCKX2-48* (33,3% izdanaka) i *AtCKX2-51* (6,2% izdanaka). Većina ovih krtola pojavila se na vrhovima stolona (tabela 19).



Slika 25. Procenat izdanaka sa krtolama kod kontrolnih i *AtCKX* biljaka krompira posle 30, 60, 90 i 120 dana *in vitro*, u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Podaci su angularno transformisani u cilju statističke obrade i reverzno transformisani inverznom funkcijom radi grafičkog prikaza, koji predstavlja srednju vrednost \pm SG ($n = 90$). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost, prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$, označene su zvezdicom (*).

Tabela 19. Položaj krtola ($n \geq 30$) na izdancima kontrolnih i transformisanih *AtCKX* biljaka gajenih 30 dana *in vitro*, u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM).

Foto-period	Linija	Položaj krtole						
		sesilna krtola (%)	baza biljke (%)	sredina biljke (%)	vrh biljke (%)	sedeća bočno (%)	vrh b. izdanka (%)	vrh stolona (%)
Dugi dan	Kontrola	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>AtCKX1-6a</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3 ± 2,3	94,7 ± 2,3
	<i>AtCKX1-36a</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>AtCKX2-39</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>AtCKX2-48</i>	9,5 ± 2,9	0,0	0,0	0,0	4,8 ± 2,1	33,3 ± 4,6	52,4 ± 4,9
	<i>AtCKX2-51</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0 ± 0,0
Kontinuirani mrak	Kontrola	15,4 ± 3,5	11,5 ± 3,1	0,0	19,3 ± 3,9	42,3 ± 4,8	11,5 ± 3,1	0,0
	<i>AtCKX1-6a</i>	13,4 ± 3,8	4,9 ± 2,4	3,7 ± 2,1	37,8 ± 5,4	28,0 ± 5,0	12,2 ± 3,6	0,0
	<i>AtCKX1-36a</i>	16,2 ± 3,5	8,1 ± 2,6	0,0	32,5 ± 4,4	29,7 ± 4,3	10,8 ± 2,9	2,7 ± 1,5
	<i>AtCKX2-39</i>	33,4 ± 4,8	0,0	0,0	20,8 ± 4,1	16,7 ± 3,8	20,8 ± 4,1	8,3 ± 2,8
	<i>AtCKX2-48</i>	54,1 ± 5,1	0,0	0,0	29,2 ± 4,6	4,2 ± 2,0	12,5 ± 3,4	0,0
	<i>AtCKX2-51</i>	30,0 ± 4,8	0,0	3,3 ± 1,9	26,7 ± 4,7	10,0 ± 3,2	23,3 ± 4,5	6,7 ± 2,6

U periodu između 30-og i 60-og dana gajenja na dugom danu, krtole su se pojavile i kod ostalih linija krompira, uključujući i kontrolu. Međutim, dinamika formiranja krtola tokom četiri "meseca" (perioda od po 30 dana) razlikovala se od linije do linije. Kod linije *AtCKX2-39* dinamika formiranja krtola nije se razlikovala od kontrole tokom svih 120 dana eksperimenta. Kod linije *AtCKX1-36a* dinamika formiranja krtola se u prvih 60 dana nije razlikovala od kontrole, da bi između 60-og i 90-og dana došlo do kašnjenja u formiranju krtola u odnosu na kontrolu, pa je kod 90 i 120 dana starih kultura procenat izdanaka sa krtolama bio niži nego kod kontrole. Kod linije *AtCKX1-6a* krtole su, za razliku od kontrole, formirane u toku prvih 30 dana ali je već do 60-og dana procenat izdanaka sa krtolama kod kontrole i ove linije izjednačen. Kod linije *AtCKX2-48* procenat izdanaka sa krtolama je u svakom od četiri trenutka merenja bio viši nego kod kontrole, dok je kod linije *AtCKX2-51* bio viši kod 30, 90 i 120 dana starih kultura. Kod ove linije došlo je do naročito naglog porasta procenta izdanaka sa krtolama između 60-og i 90-og dana u kulturi, kada je formiranje krtola indukovano kod gotovo svih (93,8%) biljaka. Kod preostalih biljaka ove linije do formiranja krtola nije došlo ni u toku narednih 30 dana, pa je posle 120 dana zabeležen jednak rezultat kao i posle 90 dana (slika 25a).

Na kraju eksperimentalnog perioda od 120 dana na dugom danu, krtole su formirane na 63,3% kontrolnih biljaka. Značajno manji procenat izdanaka sa krtolama zabeležen je kod linije *AtCKX1-36a* (19,2%), dok je značajno veći procenat zabeležen kod linija *AtCKX2-48* (96,3%) i *AtCKX2-51* (93,8%), gde su na gotovo svim izdancima formirane krtole (slika 25a).

U indukujućim uslovima, odnosno kontinuiranom mraku, krtole su u toku prvih 30 dana formirane na 42,0% kontrolnih izdanaka, dok je statistički značajno veći procenat izdanaka sa krtolama zabeležen kod linija *AtCKX1-6a* (74,7%),

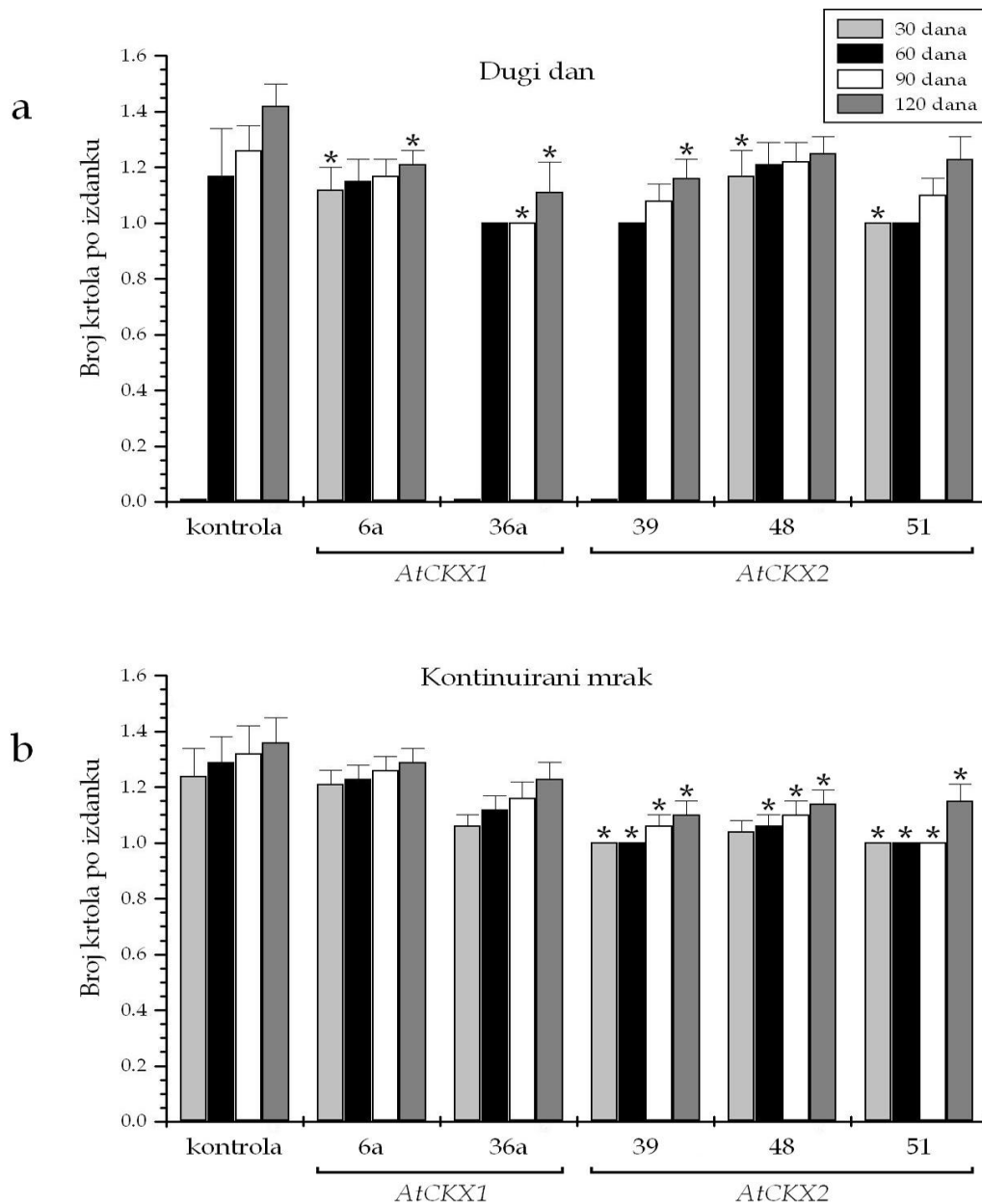
AtCKX1-36a (72,3%) i *AtCKX2-51* (88,2%), kao što je prikazano na slici 25b. Kod kontrolnih kao i kod transformisanih biljaka, krtole su se u mraku formirale u različitim položajima duž izdanka (tabela 19).

Kod linija *AtCKX1-6a*, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-51* procenat izdanaka sa krtolama ostao je značajno viši od kontrolne vrednosti do isteka eksperimentalnog perioda od 120 dana. Kod preostale dve transformisane linije procenat izdanaka sa krtolama se nije razlikovao od kontrolne vrednosti tokom prvih 60 dana, ali je u kasnijim fazama formiranje krtola ubrzano u odnosu na kontrolu, i to između 60-og i 90-og dana kod linije *AtCKX2-48*, odnosno između 90-og i 120-og dana kod linije *AtCKX2-39* (slika 25b).

Na kraju eksperimentalnog perioda od 120 dana u kontinuiranom mraku, krtole su bile formirane na 56,0% kontrolnih izdanaka, a značajno veći procenat izdanaka sa krtolama zabeležen je kod svih pet *AtCKX* linija i varirao je od 75,9% kod linije *AtCKX2-39* do 97,1% kod linije *AtCKX2-51* (slika 25b).

4.6.2. Broj krtola po izdanku

Na slici 26 predstavljena je dinamika povećavanja srednjeg broja krtola po izdanku sa krtolama. Posle 30 dana gajenja *in vitro* u neindukujućim uslovima (dugi dan), izdanci linije *AtCKX2-51* su razvijali isključivo po jednu krtolu, te je prosečan broj krtola po izdanku bio 1,0 (slika 26a). Izdanci linija *AtCKX1-6a* i *AtCKX2-48* su razvijali po jednu ili dve krtole, te je prosečan broj krtola po izdanku iznosio 1,1 (kod *AtCKX1-6a*), odnosno 1,2 (kod *AtCKX2-48*). Ostale *AtCKX* linije, kao i kontrola, u toku prvog meseca nisu razvile krtole.



Slika 26. Broj krtola po izdanku sa krtolama kod kontrolnih i *AtCKX* biljaka krompira posle 30, 60, 90 i 120 dana *in vitro*, u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n = 90$). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost, prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$, označene su zvezdicom (*).

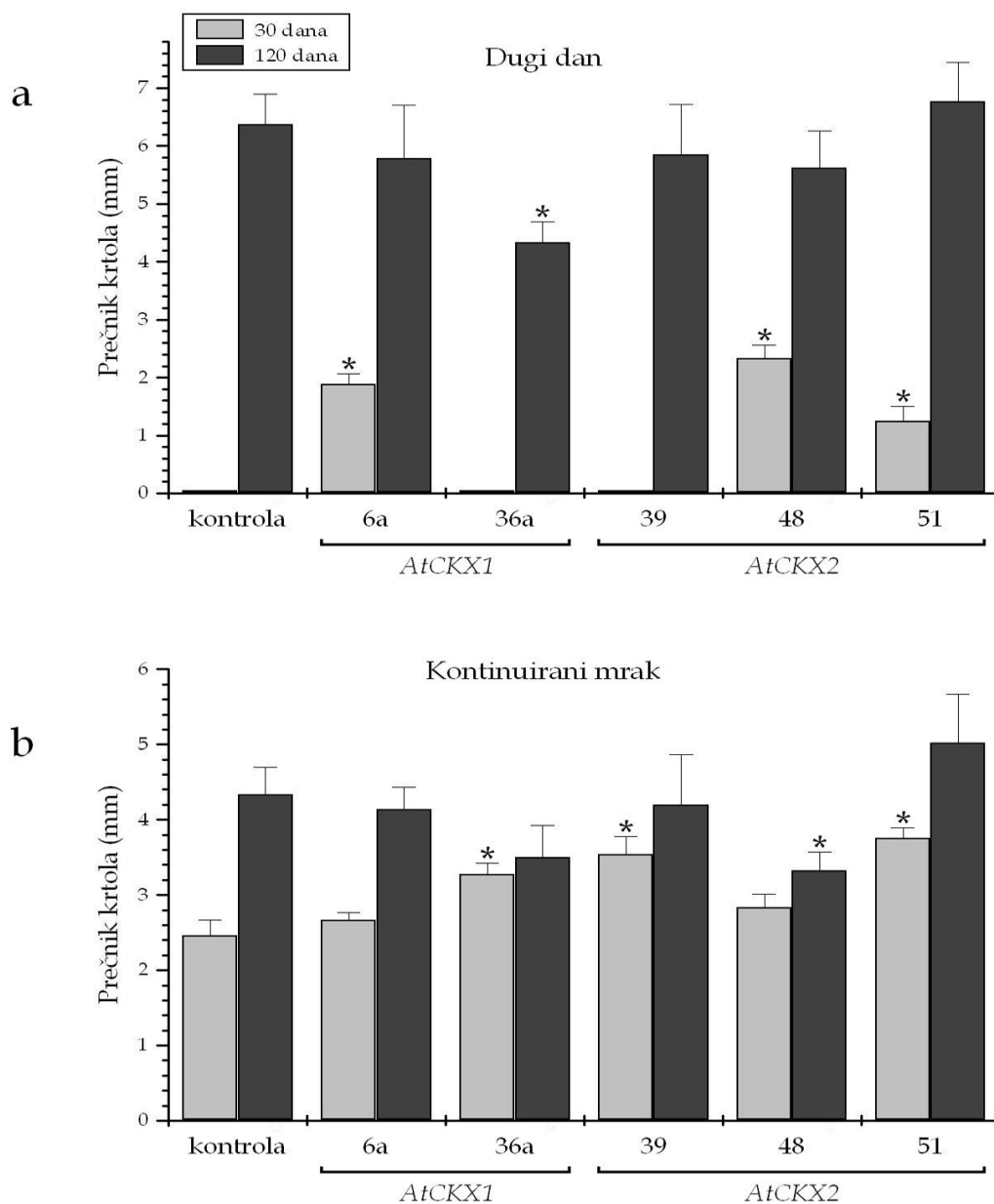
U periodu između 30-og i 60-og dana gajenja na dugom danu, krtole su se pojavile i kod ostalih linija krompira, uključujući i kontrolu. Kod 60 dana starih kultura izdanaka, broj krtola po izdanku se nije značajno razlikovao od kontrolne vrednosti ni kod jedne od *AtCKX* linija krompira. Kod linije *AtCKX1-36a* i posle 90 dana gajenja na dugom danu prosečan broj krtola po izdanku sa krtolama je ostao 1,0, što je bilo značajno manje od kontrolne vrednosti. Između 90-og i 120-og dana kod ove linije na pojedinim izdancima se razvila i druga krtola, pa je prosečni broj krtola po izdanku porastao na 1,1, što je još uvek bilo značajno ispod kontrolne vrednosti. Na kraju eksperimentalnog perioda od 120 dana na dugom danu, broj krtola po izdanku bio je značajno niži od kontrolne vrednosti kod tri transformisane linije – *AtCKX1-6a*, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-39*, dok se kod preostale dve linije nije značajno razlikovao od kontrole (slika 26a).

U toku prvih 30 dana u kontinuiranom mraku kontrolni izdanci su razvijali u proseku 1,2 krtole po izdanku, dok su izdanci linija *AtCKX2-39* i *AtCKX2-51* razvijali značajno manji broj krtola, uvek samo jednu krtolu po izdanku (slika 26b). Kod 60, 90 i 120 dana starih kultura gajenih u kontinuiranom mraku broj krtola po izdanku je bio značajno manji kod sve tri linije transformisane genom *AtCKX2*, dok se kod linija transformisanih genom *AtCKX1* prosečni broj krtola po izdanku nije razlikovao od kontrolne vrednosti ni u jednom od četiri trenutka merenja (slika 26b).

4.6.3. Prečnik krtola

Prečnik krtola formiranih na 30 dana starim izdancima krompira gajenim *in vitro* u uslovima dugog dana iznosio je 1,9 mm kod linije *AtCKX1-6a*, 2,4 mm kod linije *AtCKX2-48* i 1,3 mm kod linije *AtCKX2-51* (slika 27a). Na kraju eksperimentalnog perioda od 120 dana na dugom danu, prečnik krtola kod kontrolnih biljaka iznosio je 6,4 mm, a krtole značajno manjeg prečnika javljale su se kod linije *AtCKX1-36a* (4,3 mm), dok je prečnik preostalih transformisanih linija varirao od 5,6 do 6,8 mm, bez značajne razlike u odnosu na kontrolu (slika 27a).

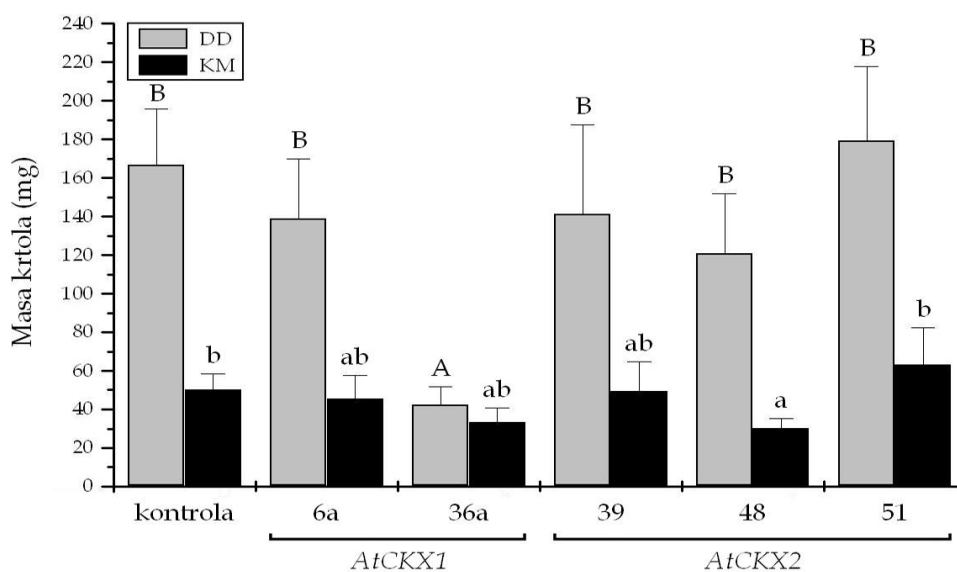
U kontinuiranom mraku, prosečni prečnik krtola formiranih na kontrolnim biljkama posle 30 dana iznosio je 2,4 mm (slika 27b). Kod linija *AtCKX1-36a*, *AtCKX2-39* i *AtCKX2-51* javljale su se krtole značajno većeg prečnika (3,2, 3,5, odnosno 3,7 mm) u odnosu na kontrolu, dok se prečnik krtola kod preostale dve linije nije značajno razlikovao od kontrolne vrednosti. Na kraju eksperimentalnog perioda od 120 dana u kontinuiranom mraku, prečnik krtola kod kontrolnih biljaka iznosio je 4,3 mm, a krtole značajno manjeg prečnika javljale su se kod linije *AtCKX2-48* (3,3 mm), dok je prečnik preostalih transformisanih linija varirao od 3,5 do 5,0 mm, bez značajne razlike u odnosu na kontrolu (slika 27b).



Slika 27. Prečnik krtola kod kontrolnih i *AtCKX* biljaka krompira posle 30 i 120 dana *in vitro*, u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n \geq 30$) izraženu u milimetrima. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost, prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$, označene su zvezdicom (*), radi vizuelne analogije sa slikama 25 i 26.

4.6.4. Masa krtola

Masa krtola formiranih na izdancima kontrole i pet *AtCKX* linija izmerena je posle 120 dana u kulturi *in vitro*, u uslovima dugog dana i kontinuiranog mraka (slika 28).



Slika 28. Masa krtola kod kontrole i transformisanih *AtCKX* linija krompira nakon 120 dana gajenja *in vitro* u uslovima dugog dana (DD) ili kontinuiranog mraka (KM). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SG ($n \geq 30$) izraženu u miligramima. Srednje vrednosti označene istim velikim slovom (DD), odnosno istim malim slovom (KM) međusobno se *ne razlikuju* statistički značajno prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD) na nivou značajnosti $p \leq 0,05$. Poređenje je rađeno zasebno za podatke u uslovima dugog dana i kontinuiranog mraka.

Krtole koje su se formirale na kontrolnim izdancima na dugom danu, posle 120 dana u kulturi imale su prosečnu masu 166,8 mg (slika 28). Značajno, gotovo četverostruko manju prosečnu masu imale su krtole formirane kod linije *AtCKX1-36a* (42,4 mg). Prosečna masa krtola kod ostalih *AtCKX* linija varirala je između 120,9 i 179,4 mg, bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (slika 28).

U kontinuiranom mraku, prosečna masa krtola formiranih na kontrolnim izdancima posle 120 dana iznosila je 50,1 mg. Značajno manju masu imale su krtole formirane kod linije *AtCKX2-48* (30,3 mg). Prosečna masa krtola formiranih na izdancima ostalih *AtCKX* linija varirala je između 33,5 i 63,0 mg, bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (slika 28).

5. DISKUSIJA

Značaj krompira kao prehrambene kulture potiče od tuberizacije odnosno sposobnosti formiranja krtola, osobine koja nije univerzalna u biljnom svetu. Pored toga što ima veliki ekonomski značaj, krompir predstavlja i važan model sistem za proučavanje procesa tuberizacije. Ključnu ulogu u regulaciji ovog procesa igraju biljni hormoni. Najznačajnija grupa hormona u regulaciji tuberizacije su giberelini, ali izvesno je da i drugi biljni regulatori rasteња, poput citokinina, auksina i jasmonske kiseline takođe učestvuju u regulaciji tuberizacije, iako je značaj i mehanizam njihovog uticaja na tuberizaciju još uvek nejasan.

Konstrukcija transgenih biljaka koje eksprimiraju gen za citokinin oksidazu/dehidrogenazu (CKX) danas predstavlja široko rasprostranjen pristup u istraživanjima biološke funkcije citokinina. Zbog nepostojanja mutanata za biosintezu citokinina, ovakve biljke predstavljaju dragocen model sistem u studijama citokininske deficijencije. Takva istraživanja su, na objektima kao što su transgeni duvan i *Arabidopsis*, doprinela potpunijem razumevanju uloge citokinina u nizu procesa vezanih za rasteње i razviće biljaka, kao što su meristemska aktivnost izdanka i korena, razviće i senescencija lista, cvetanje, apikalna dominacija i razviće vaskularnih elemenata.

U ovom radu, konstrukti koji su ranije korišćeni za dobijanje transgenih *AtCKX* biljaka duvana (Werner i sar. 2001) i *Arabidopsis thaliana* (Werner i sar. 2003), upotrebljeni su da bi se dobile transformisane *AtCKX* linije krompira. Efekti ekspresije transgena *AtCKX* na citokininsku homeostazu biljaka praćeni su *in vitro*, a dobijene linije su poslužile kao model sistem za utvrđivanje da li, i kako,

izmenjena citokininska homeostaza utiče na proces tuberizacije. Istraživanja čiji su rezultati ovde prikazani predstavljaju doprinos razumevanju uloge citokinina u procesima vezanim za tuberizaciju *in vitro*.

5.1. Transformacija krompira genima *AtCKX1* i *AtCKX2*

Transformacija biljaka pomoću *Agrobacterium tumefaciens* postala je rutinski pristup konstrukciji genetičkih linija sa poželjnim komercijalnim svojstvima, ali i neizostavni deo fundamentalnih istraživanja u mnogim oblastima biljne biologije. Transformacija krompira genima od interesa u izuzetno je širokoj primeni zahvaljujući ekonomskom značaju ove biljne vrste i korišćena je za dobijanje genetičkih linija sa komercijalno korisnim osobinama kao što su povećana otpornost na viruse (Solomon-Blackburn i Barker, 2001), insekte (Grafius i Douches, 2008), gljivične patogene (Gururani i Park, 2012) ili poboljšanje hranljive vrednosti krtola (Pribylova i sar. 2006). Genetičko inženjerstvo krompira korišćeno je i u brojnim fundamentalnim istraživanjima (Börnke i sar. 2007; Chakravarty i sar. 2007). Kada su u pitanju istraživanja citokininskog metabolizma i njegove povezanosti sa tuberizacijom, do sada su za transformaciju krompira korišćeni: gen za izopentenil-transferazu (*ipt*) poreklom iz *Agrobacterium tumefaciens* (Gális i sar. 1995; Macháčková i sar. 1997; Ninković i sar. 1999; Tao i sar. 2010), gen *rolC* poreklom iz *A. rhizogenes* (Romanov i sar. 2000) i gen *dxs* (1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfat sintaza) poreklom iz *Escherichia coli* (Morris i sar. 2006). Nedavno je objavljeno i istraživanje u kojem je krompir (sorta "Solara") transformisan genom za citokinin oksidazu/dehidrogenazu poreklom iz *Arabidopsis thaliana* (*AtCKX1*), radi ispitivanja interakcije između citokinina i giberelina u klijanju krtola (Hartmann i sar. 2011).

Tokom poslednjih 30 godina, u širokom spektru istraživanja razvijeno je preko 20 protokola za transformaciju krompira pomoću *A. tumefaciens* (Vinterhalter i sar. 2008). Protokol korišćen u ovom istraživanju razvijen je prethodno u našoj laboratoriji kao kombinacija ranije objavljenih metoda i pokazao se kao optimalan sa stanovišta efikasnosti indukcije kalusa i regeneracije izdanaka (Cingel i sar. 2010).

Kada su iseći listova postavljeni na podlogu za indukciju kalusa, do razvijanja kalusa je došlo na svim kontrolnim eksplantatima gajenim na podlozi Hyg⁻ CIM, kao i na 60-65% inokulisanih eksplantata gajenih na podlozi Hyg⁺ CIM, dok su preostali inokulisani eksplantati posle izvesnog vremena podlegli nekrozi, kao i svi kontrolni eksplantati postavljeni na podlogu Hyg⁺ CIM (slika 4 i tabela 16). Podloga sa higromicinom B delovala je kao selektivni agens za eliminaciju netransformisanih eksplantata, ali je verovatno da su u ovom koraku i neki od transformisanih eksplantata podlegli nekrozi nezavisno od higromicinske selekcije. Poznato je da nakon inokulacije sa *A. tumefaciens* u biljnom tkivu dolazi do aktiviranja hipersenzitivne nekrotičke reakcije, koja predstavlja kratkoročni, brz i intenzivan odbrambeni mehanizam biljke protiv infekcije i transfera T-DNK (Kuta i Tripathi, 2005; Dan, 2008). Osim toga, prilikom inkorporacije transgena u genomsku DNK može doći do delecije ekspresione kasete sa genom za rezistenciju na selektivni marker (Goldstein i sar. 2005). Efikasnost indukcije kalusa na inokulisanim isećima listova u našem eksperimentu (60-65%) bila je znatno niža u odnosu na efikasnost indukcije kalusa (86-90%) koju su, takođe za sortu "Désirée", dobili Cingel i saradnici (2010).

Inokulisani eksplantati koji su razvili kaluse na podlozi Hyg⁺ CIM, posle 30 dana su preneti na podlogu za regeneraciju izdanaka, Hyg⁺ SIM. Blizu trećine njih na ovoj podlozi nije regenerisalo izdanke i podlegli su nekrozi (slika 5 i tabela 16).

Propadanje inokulisanih eksplantata na podlozi Hyg⁺ SIM može se pripisati pre svega daljem delovanju selektivnog antibiotika na ćelije u kojima nije došlo do stabilne integracije transgena (a samim tim i selektivnog markera). Moguće je da je nekroza eksplantata na Hyg⁺ SIM donekle i posledica oksidativnih oštećenja do kojih je došlo usled hipersenzitivne nekrotičke reakcije prilikom inokulacije sa *A. tumefaciens*.

Efikasnost regeneracije izdanaka u ovom istraživanju (38-43%) bila je dvostruko niža u odnosu na efikasnost regeneracije (76-86%) koju su dobili Cingel i saradnici (2010), ali je broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu (7,3-7,5) bio u okvirima vrednosti dobijenih u njihovom istraživanju (6,3-9,0). Niža efikasnost regeneracije izdanaka (kao i indukcije kalusa) u ovom istraživanju u odnosu na rezultate Cingela i saradnika, može se pripisati korišćenju različitih tipova konstrukta za transformaciju u ova dva eksperimenta. Dok su Cingel i saradnici (2010) za transformaciju koristili konstrukt sa markerom za kanamicinsku selekciju, u ovom istraživanju je korišćen konstrukt sa markerom za higromicinsku selekciju, za koji je ranije utvrđeno da daje nižu efikasnost regeneracije transformisanih izdanaka krompira, u odnosu na kanamicinsku selekciju (Barrell i sar. 2002).

Kada su regenerisani izdanci preneti sa podloge Hyg⁺ SIM na podlogu za ožiljavanje sa higromicinom B, svega 14-16% genetičkih linija potencijalno transformisanih *AtCKX* genima zadržalo je sposobnost ožiljavanja tokom narednih 6 meseci (tabela 16), iako se primenjena koncentracija higromicina (50 mg L⁻¹) pokazala kao optimalna za selekciju u ranijim istraživanjima (El-Kharbotly i sar. 1996; van Enckevort i sar. 2000). Ostale potencijalno transformisane linije davale su biljke koje nikada nisu razvijale korenov sistem, ili su ga razvijale samo u prvim supkulturama, da bi tokom dalje supkultivacije izgubile sposobnost ožiljavanja

(slika 6). Efikasnost ožiljavanja u ovom eksperimentu mnogo je niža u odnosu na rezultate Cingela i saradnika (2010), što je takođe u skladu sa opservacijama da je razlika u efikasnosti između kanamicinske i higromicinske selekcije još uvek prisutna u stadijumu ožiljavanja regeneranata (Barrell i sar. 2002).

5.2. Potvrda transformacije i ekspresije transgena

PCR analizom je potvrđena transformacija genom *AtCKX1* kod 4 od 12 testiranih linija, i transformacija genom *AtCKX2* kod 8 od 11 testiranih linija (slika 7). Lažno pozitivni rezultati kod selekcije zasnovane na primeni antibiotika, odnosno uspešna regeneracija netransformisanih inokulisanih izdanaka na selektivnoj hranljivoj podlozi, nažalost je redovna pojava u primeni selektivnih markera kod genetičkih transformacija (Conner i sar. 1991; Davidson i sar. 2004), pa je PCR analiza neophodna za proveru transformacije, što je potvrđeno i u ovom istraživanju. S druge strane, pouzdanost PCR analize je, kao što je i očekivano, bila stoprocentna, jer je stabilna transformacija kasnije potvrđena kod svih transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* linija, Southern analizom (slika 8).

Međutim, stabilna integracija transgena u genom biljke ne mora biti garant njegove uspešne ekspresije. Zbog opasnosti od utišavanja gena preporučuje se eliminacija transformisanih linija koje su ugradile više od jedne kopije transgena u genom (Birch, 1997). Ovo je razlog što su transformisane linije *AtCKX2-40* i *AtCKX2-63*, koje su ugradile tri, odnosno dve kopije transgena *AtCKX2* (slika 8b), eliminisane iz daljih istraživanja. Pored toga, ekspresija transgena *AtCKX1*, odnosno *AtCKX2* bila je veoma slaba ili je izostala i kod transformisanih linija *AtCKX1-3a*, *AtCKX1-8a*, *AtCKX2-28* i *AtCKX2-35*, pa su i ove linije eliminisane iz nastavka istraživanja. Kod ovih transformisanih linija, transgen je mogao biti

ugrađen u transkripciono neaktivni deo genoma, što je uobičajena pojava prilikom transformacije biljaka (Iglesias i sar. 1997; Francis i Spiker, 2005) uključujući i krompir (Jacobs i sar. 1995). Druga mogućnost je da je ekspresija transgena *AtCKX* kod ovih linija mogla podleći transkripcionom ili posttranskripcionom utišavanju koje se dovodi u vezu sa upotrebom promotora CaMV 35S u genetičkom inženjerstvu biljaka (Elmayan i Vaucheret, 1996).

Razlike u intenzitetu ekspresije između preostalih transformisanih *AtCKX* linija krompira, koje su u slučaju *AtCKX1* bile desetostruke, a u slučaju *AtCKX2* čak i 250-ostruke (slika 9), mogu se takođe pripisati pozicionom efektu, odnosno ugradnji u delove genoma koji se odlikuju različitim nivoima transkripcione aktivnosti. Pored toga, na osnovu razlika u količini transkripta *AtCKX* u tkivima izdanka i korena kod svake od transformisanih linija (slika 9) možemo pretpostaviti da je promotor CaMV 35S pokazivao generalno veću transkripcionu aktivnost u tkivu izdanka, nego korena. Tkivno-specifične razlike u aktivnosti promotora CaMV 35S sugerisane su i kod drugih biljnih vrsta, kao što su vinova loza (Li i sar. 2001) i pamuk (Sunilkumar i sar. 2002).

5.3. Aktivnost CKX kod *AtCKX* linija krompira gajenih *in vitro*

Aktivnost CKX je bila značajno povišena u korenu ili izdanku kod svih *AtCKX* linija krompira, a kod linije *AtCKX2-51* u oba analizirana tkiva (slika 13). Sa izuzetkom jedne linije, izdanci transformisanih *AtCKX* biljaka krompira pokazali su povećanje aktivnosti CKX od 1,7 do 14,3 puta više od kontrolne vrednosti, što je uporedivo sa povećanjem prethodno zabeleženim kod transformisanih *AtCKX* biljaka duvana (2,6 do 10,4 puta više od kontrolne vrednosti; Werner i sar. 2001) i *Arabidopsis thaliana* (3 do 10 puta više od kontrolne vrednosti; Werner i sar. 2003).

U korenovima, aktivnost CKX je bila povišena u odnosu na kontrolu kod samo dve transformisane linije (slika 13).

Iako je gen *AtCKX* bio izraženije eksprimiran u izdancima nego u korenovima transformisanih linija (slika 9), aktivnost CKX je u tri od pet transformisanih linija, kao i kod kontrole, bila viša u korenovima nego u izdancima (slika 13). Aktivnost CKX u korenovima mogla bi (makar kod nekih transformisanih linija, kao i kod kontrole) biti pojačana povećanom dostupnošću supstrata (Motyka i sar. 2003), s obzirom na viši endogeni nivo citokinina u korenu, u odnosu na izdanak (slike 14-16).

Proteinski ekstrakti izdanaka i korenova kontrolnih i *AtCKX* biljaka krompira pokazivali su veću aktivnost CKX sa $[2\text{-}^3\text{H}]i\text{P}$ kao supstratom, nego sa $[2\text{-}^3\text{H}]c\text{Z}$ ili $[2\text{-}^3\text{H}]t\text{Z}$, pri vrednosti pH 8,5 (tabela 18). Galuszka i saradnici (2007) dobili su nešto drugačije rezultate ispitujući citokinin oksidaznu/dehidrogenaznu aktivnost proteinskih ekstrakata transgenih *AtCKX* biljaka duvana. U njihovim istraživanjima, *iP* i *tZ* su se pokazali kao približno jednako pogodni supstrati za citokinin oksidazu/dehidrogenazu u proteinskim ekstraktima transgenih *AtCKX2* biljaka duvana pri vrednosti pH 8,5, dok su proteinski ekstrakti transgenih *AtCKX1* biljaka duvana čak efikasnije razlagali *tZ* nego *iP* pri istoj vrednosti pH. Pored toga, Galuszka i saradnici (2007) nisu uspeali da detektuju razlaganje *cZ* kao supstrata za bilo koju od izoformi *AtCKX*, dok je u ovde prikazanim rezultatima pokazana efikasnija razgradnja $[2\text{-}^3\text{H}]c\text{Z}$ u odnosu na $[2\text{-}^3\text{H}]t\text{Z}$ (tabela 18). Dobijena razlika u rezultatima mogla bi se pripisati razlikama u osetljivosti metoda korišćenih za detekciju aktivnosti CKX u ova dva istraživanja. Spektrofotometrijska metoda, koju su koristili Galuszka i saradnici, zahteva korišćenje viših koncentracija citokininskog supstrata (250 μM) nego radioizotopska metoda korišćena u ovom radu, koja može da registruje aktivnost

CKX pri znatno nižim koncentracijama citokinina (2 μ M), približnijim njihovoj fiziološkoj koncentraciji u tkivu. Nedavno je analiza supstratne specifičnosti rekombinantnih enzima CKX iz *Arabidopsis thaliana*, pokazala razlike u efikasnosti pojedinih izoformi AtCKX da razgrade *cZ* i *tZ*. Tako je AtCKX2 pokazivala veći afinitet ka *tZ* nego ka *cZ* kao supstratu, dok je sa AtCKX1 bio obrnut slučaj (Gajdošová i sar. 2011). Taj odnos je potvrđen i u ovom radu, gde su se proteinski ekstrakti izdanaka *AtCKX2-48* i *AtCKX2-51*, i ekstrakti korenova *AtCKX2-51* odlikovali većom preferencijom prema *tZ* nego *cZ* kao supstratu, za razliku od tkivnih ekstrakata kontrolnih biljaka, kao i biljaka linije *AtCKX1-36a*, kod kojih je bio obrnut slučaj (tabela 18).

5.4. Sadržaj citokinina i IAA kod kontrolnih i transformisanih AtCKX biljaka krompira

5.4.1. Citokininski profil netransformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*

U ovom istraživanju po prvi put je urađen potpuni citokininski profil izdanaka i korenova krompira gajenih *in vitro*. Do sada, jedine podatke o količini pojedinih endogenih citokinina kod krompira objavili su Dermastia i saradnici (1996) i Yakovleva i saradnici (1997), ali su istraživači u ovim studijama pratili svega nekoliko molekulskih vrsta citokinina, i to u celim biljčicama iz kulture *in vitro* – bez podele na izdanke i korenove.

Kod citokininskog profila kontrolnih biljaka krompira primetan je viši sadržaj citokinina u korenovima u odnosu na izdanke krompira (slike 14a i 15a), što je u skladu sa ranije primećenim "pravilom" da su citokinini kod biljaka generalno zastupljeniji u korenu nego u izdanku (Letham, 1994). Kod kontrolnih

biljaka krompira, naglašena dominacija neaktivnih formi citokinina (*N*-glukozida), zajedno sa niskom zastupljenošću bioaktivnih formi citokinina i u izdanku i u korenu (slike 14a i 15a) upućuje na zaključak da krompir koristi veoma mali deo svojih ukupnih citokinina. Osim toga, nivo formi citokinina za skladištenje je oko 50 puta viši u korenu (slika 15c) nego u izdanku (slika 14c), što ukazuje na značaj korena kao organa za deponovanje citokinina kod krompira.

Sastav citokinina u tkivima kontrolnih biljaka sugerise nam obrasce transporta citokinina, kao i tkivne specifičnosti u metabolizmu ovih hormona (slike 14 i 15). Dominantna akumulacija citokinina izopentenil-adeninskog (iP) tipa u izdancima (slika 14) i *trans*-zeatinskog (*tZ*) tipa u korenovima (slika 15) može biti pokazatelj transporta citokinina kakav je pokazan kod kukuruza (Takei i sar. 2001) i *Arabidopsis thaliana* (Corbesier i sar. 2003). Kod *A. thaliana* je pokazano i da je metaboličko prevođenje citokinina iP-tipa u citokinine *tZ*-tipa intenzivnije u korenovima, nego u listovima i izdancima (Takei i sar. 2004b).

5.4.2. Promene u citokininskoj homeostazi kod *AtCKX* linija krompira

Citokininski profil transformisanih *AtCKX* biljaka krompira razlikuje se od citokininskog profila kontrole (slika 16). Ipak, nivo ukupnih citokinina nije značajno snižen kod većine *AtCKX* linija. Umesto toga, endogeni nivo bioaktivnih citokinina (slobodnih baza i ribozida), kao i njihov udeo u ukupnim citokininima, značajno su sniženi kod većine *AtCKX* linija (slike 17 i 18).

Uprkos značajnim varijacijama u količini transkripta i aktivnosti CKX, značajne i proporcionalne varijacije sniženja nivoa bioaktivnih citokinina kod transformisanih *AtCKX* linija krompira nisu uočene. Većina *AtCKX* linija je pokazivala relativno ujednačen stepen sniženja nivoa bioaktivnih citokinina,

ukazujući na moguće prisustvo homeostatskih mehanizama koji ne dozvoljavaju da nivo bioaktivnih citokinina padne ispod određene minimalne vrednosti. Sniženje nivoa bioaktivnih citokinina dobijeno kod većine linija u ovom istraživanju (na svega 22-27% kontrolne vrednosti u izdancima i 41-60% kontrolne vrednosti u korenovima kod *AtCKX2* linija – slika 17) poklapa se sa sniženjem nivoa bioaktivnih citokinina koje je dobijeno kod duvana, gde su nivoi iP, tZ i njihovih ribozida kod transformisanih *AtCKX* biljaka varirali između 23 i 92% od kontrolne vrednosti (Werner i sar. 2001). Naglašeno sniženje nivoa bioaktivnih citokinina, na primer, u izdancima *AtCKX2* linija krompira (slika 17), u skladu je sa značajnim povišenjem aktivnosti CKX u tim organima (slika 13). S druge strane, kod nekih transformisanih linija je nivo bioaktivnih citokinina značajno snižen i u korenu, iako aktivnost CKX u ovom organu nije značajno povećana. Takav je slučaj sa linijama *AtCKX1-36a*, *AtCKX2-39* i *AtCKX2-48*. To ukazuje na mogući značaj transporta citokinina između korena i izdanka, kao i na relevantnost citokininske homeostaze u izdanku za homeostazu čitave biljke.

Za razliku od bioaktivnih citokinina, nivo formi citokinina za skladištenje i neaktivnih formi citokinina značajno je povećan kod većine *AtCKX* linija krompira, doprinoseći, u mnogim slučajevima, povećanju nivoa ukupnih endogenih citokinina (slika 16). Ovakvi rezultati ukazuju na moguće postojanje regulatornih mehanizama u metabolizmu citokinina, koji funkcionišu po principu negativne povratne sprege. Mehanizmi regulacije nivoa citokinina koji počivaju na principu negativne povratne sprege opisani su u brojnim istraživanjima i predstavljaju uobičajenu strategiju održavanja hormonske homeostaze kod biljaka (Brugière i sar. 2003; Motyka i sar. 2003; Miyawaki i sar. 2004). U regulaciju citokininske homeostaze mogu biti uključene i druge grupe biljnih hormona, pre svega auksini (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004; Rashotte i sar. 2005; Jones i sar. 2010; Liu i sar. 2010).

Pretpostavljeni regulatorni mehanizmi u slučaju transformisanih *AtCKX* biljaka krompira trebalo bi da kompenzuju konstantni gubitak bioaktivnih citokinina do kojeg dolazi dejstvom citokinin oksidaze/dehidrogenaze. Kompenzatorni mehanizmi bi mogli počivati na stimulaciji *de novo* biosinteze citokinina, čime bi se mogle objasniti varijacije nivoa ukupnih citokinina kod transformisanih biljaka. Novosintetisani citokinini konkurentno bi podlegali modifikacijama - *O*- i *N*-glikozilaciji, što bi kod pojedinih transformisanih linija dovodilo do nakupljanja formi citokinina za skladištenje i neaktivnih formi citokinina (slika 16), koje ne predstavljaju supstrat za CKX (Galuszka i sar. 2007; Stirk i sar. 2012).

Međutim, pretpostavljeni kompenzatorni mehanizmi nisu bili dovoljni da održe nivo bioaktivnih citokinina kod *AtCKX* biljaka krompira - naročito u slučaju *AtCKX2* linija. Stoga je povišenju nivoa ukupnih citokinina doprinelo pre svega povišenje nivoa formi citokinina za skladištenje ili neaktivnih formi citokinina, a nivo bioaktivnih citokinina pritom nije vraćen na kontrolnu vrednost (slika 16). Osim toga, Hartmann i saradnici (2011) su microarray analizom krtola transformisanog *AtCKX1* krompira, utvrdili povišen nivo transkripta gena koji kodira zeatin-*O*-ksiloziltransferazu, što sugerise da pojačana produkcija formi citokinina za skladištenje može biti jedna od opštih odlika krompira koji eksprimira gene *AtCKX*. U tom smislu, povišeni nivo citokininskih konjugata (*O*- i *N*-glukozida) najverovatnije predstavlja indirektnu posledicu promena koje su nastale u metabolizmu citokinina kod transformisanih *AtCKX* biljaka krompira.

5.4.3. Promena nivoa IAA kod transformisanih *AtCKX* biljaka krompira

Kao i sadržaj citokinina, i nivo endogene indol-sirćetne kiseline (IAA) je izmenjen kod *AtCKX* biljaka krompira gajenih *in vitro*. Interesantno je da su promene u nivou IAA u izdancima i korenovima transformisanih biljaka varirale od značajnog sniženja do značajnog povišenja u odnosu na kontrolu (slika 19). Poznato je da između metabolizma auksina i citokinina postoji odnos uzajamne regulacije koji funkcioniše po principu negativne povratne sprege (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004; Rashotte i sar. 2005; Jones i sar. 2010; Liu i sar. 2010). Auksini mogu negativno regulisati biosintezu citokinina (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004; Shimizu-Sato i sar. 2009), a pokazano je da mogu i aktivirati transkripciju gena za citokinin oksidazu/dehidrogenazu (Shimizu-Sato i sar. 2009). Međutim, postoje i suprotni podaci, po kojima kod klijanaca *Arabidopsis thaliana* auksini pozitivno regulišu nivo citokinina, bilo pojačavanjem njihove biosinteze (Miyawaki i sar. 2004), ili inhibicijom transkripcije *AtCKX* (Rashotte i sar. 2005).

Slično tome, postoje i različiti podaci o citokininima kao pozitivnim (Jones i sar. 2010) ili negativnim (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004; Liu i sar. 2010) regulatorima biosinteze auksina.

Jones i saradnici (2010) pokazali su da egzogena aplikacija *cZ* ili *tZ*, kao i povećanje endogenog nivoa citokinina inducibilnom ekspresijom transgena *ipt*, vode povećanoj stopi biosinteze IAA i povećanju endogenog nivoa ovog hormona u izdancima i korenovima klijanaca *Arabidopsis thaliana*, ali ne i u tkivima starijih biljaka. Pored toga, inducibilna ekspresija gena *AtCKX3*, kao i konstitutivna ekspresija *AtCKX1* kod transgenih biljaka *A. thaliana* vodili su sniženju endogenog nivoa IAA pored toga što su snižavali nivo endogenih citokinina, a sličan efekat

imale su i mutacije u genima *ipt1*, *ipt3*, *ipt5* i *ipt7* kod biljaka iste vrste (Jones i sar. 2010).

Suprotne rezultate dobili su Eklöf i saradnici (1997), koji su pokazali da povećanje biosinteze citokinina ekspresijom gena *ipt* iz *Agrobacterium tumefaciens* u transgenim biljkama duvana, vodi sniženju stope biosinteze IAA i endogenog nivoa ovog hormona. Nordström i saradnici (2004) su pokazali da biosinteza citokinina, uzrokovana inducibilnom ekspresijom bakterijskog gena *ipt* kod *Arabidopsis thaliana* vodi sporom snižavanju stopu biosinteze IAA. Pretpostavlja se da auksini regulišu biosintezu citokinina na brz i direktan način, dok je mehanizam regulacije nivoa auksina u kojem učestvuju citokinini, spor i indirektan (Nordström i sar. 2004). Brza i direktna stimulacija biosinteze auksina od strane citokinina kasnije je pokazana u određenim tkivima klijanaca *Arabidopsis thaliana*, ali smatra se da je ovakva regulacija tkivno-specifična i da nije univerzalno rasprostranjena (Jones i sar. 2010). Citokinini mogu regulisati nivo auksina utičući na njihovu međucelijsku mobilizaciju, odnosno redistribuciju (Laplaze i sar. 2007; Pernisová i sar. 2009). Postojeću sliku dodatno komplikuje heterogenost model sistema koji su korišćeni u dosadašnjim istraživanjima. Moguće je da je način na koji auksini i citokinini međusobno regulišu biosintezu tkivno, razvojno i/ili species-specifičan, što bi moglo da objasni ovako heterogene rezultate (Rashotte i sar. 2005).

Auksinsko-citokininska regulatorna petlja veoma je kompleksna i sa njom interferiraju i drugi elementi hormonske homeostaze, kao što je etilen (Rashotte i sar. 2005; Liu i sar. 2010). U slučaju *AtCKX* biljaka krompira, izgleda da je sniženje nivoa bioaktivnih citokinina vodilo povišenju nivoa endogene IAA kod većine transformisanih linija (slika 19), možda povećavanjem stope biosinteze IAA, s obzirom na brojne literaturne podatke koji ukazuju na citokinine kao negativne

regulatore biosinteze IAA (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004; Liu i sar. 2010). Međutim, očigledno je da je promena nivoa citokinina i na druge načine uticala na nivo IAA kod *AtCKX* linija krompira, s obzirom na to da dobijeni rezultati nisu jednoznačni (slika 19).

Kvantitativnim odnosom između endogenih nivoa auksina i citokinina određeni su mnogi morfofenetski procesi biljaka, uključujući diferencijaciju tkiva (Skoog i Miller, 1965), apikalnu dominaciju (Bangerth, 1994; Faiss i sar. 1997; Tanaka i sar. 2006; Shimizu-Sato i sar. 2009), kao i tuberizaciju kod krompira (Sergeeva i sar. 2000). Količnik nivoa IAA i bioaktivnih citokinina je u tkivima biljaka različitih *AtCKX* linija krompira bio uglavnom povećan (slika 20), usled sniženog nivoa bioaktivnih citokinina i (uglavnom) povećanog nivoa endogene IAA. Ipak, ovaj odnos je izuzetno mnogo varirao, što se verovatno odrazilo na relativno raznovrsne varijacije u morfološkim osobinama, uključujući i parametre tuberizacije kod različitih transformisanih linija.

5.5. Morfološke osobine *AtCKX* biljaka krompira gajenih *in vitro*

Transformisane *AtCKX* biljke dobijene u ovom istraživanju bile su u velikoj meri morfološki slične kontrolnim biljkama (slika 21). Ipak, karakterisale su se skraćenim izdankom u odnosu na kontrolne biljke (slika 22). Skraćeni izdanci uočeni su i kod transformisanih *AtCKX* biljaka duvana (Werner i sar. 2001) i *Arabidopsis thaliana* (Werner i sar. 2003), kao jedan od simptoma "sindroma citokininske deficijencije", uz smanjenu apikalnu dominaciju izdanaka i povećanu masu korenova.

Ranije je primećeno da biljke duvana i *A. thaliana* koje eksprimiraju transgen *AtCKX1*, pokazuju izraženije morfološke simptome "sindroma citokininske deficijencije", nego biljke koje eksprimiraju *AtCKX2* (Werner i sar. 2001; 2003). U skladu sa time, na dugom danu biljke krompira koje su eksprimirale transgen *AtCKX1* pokazivale su neke od simptoma "sindroma citokininske deficijencije" koji se nisu javljali kod *AtCKX2* biljaka. Tako su se biljke linije *AtCKX1-6a* odlikovale većim brojem korenova (slika 24), a biljke linije *AtCKX1-36a* izuzetno pojačanim bočnim grananjem izdanka (slika 23).

U istraživanju Hartmann i saradnika (2011), *AtCKX1* biljke krompira koje su gajene u zemljištu imale su izražene simptome "sindroma citokininske deficijencije". Ipak, morfološke razlike koje su zabeležene između kontrolnih i transformisanih *AtCKX* biljaka dobijenih u ovom radu (slika 21), nisu bile toliko upečatljivo izražene kao u prethodnim istraživanjima (Werner i sar. 2001; 2003; Hartmann i sar. 2011). Iako je kod gotovo svih linija zabeležena smanjena dužina izdanka (slika 22), prosečan broj korenova i broj bočnih izdanaka kod većine transformisanih linija nisu se značajno razlikovali od kontrolnih vrednosti (slike 23 i 24). Postavlja se pitanje, zbog čega su biljke, koje su korišćene u ovom istraživanju, pokazivale samo umereno morfološko odstupanje od kontrole, za razliku od *AtCKX* biljaka duvana, *A. thaliana* i krompira u ranijim istraživanjima?

Transgene *AtCKX* biljke duvana i *A. thaliana* dobijene su samooplodnjom, kao homozigotno potomstvo u T₂ generaciji (Werner i sar. 2001; 2003). S druge strane, istraživanja predstavljena u ovom radu vršena su na biljkama krompira T₀ generacije u kulturi *in vitro*, a istraživanja Hartmann i saradnika (2011) takođe na krompiru T₀ generacije, ali gajenom u zemljištu. Kod krompira, za razliku od većine drugih biljnih vrsta, istraživanja na heterozigotnim biljkama T₀ generacije predstavljaju neminovnost, usled preferencijalno vegetativnog razmnožavanja, kao

i gubitka osobina karakterističnih za sortu u F₂ (odnosno, T₁) generaciji (Conner, 2007).

U ovom radu, ekspresija transgena *AtCKX* bila je dovoljna da poveća aktivnost CKX proteinskih ekstrakata izdanaka i korenova transformisanih T₀ biljaka krompira i da doprinese snižavanju nivoa bioaktivnih citokinina u približnoj ili čak većoj meri od one koja je postignuta ranije kod *AtCKX* biljaka duvana T₂ generacije (Werner i sar. 2001). Na primer, razlika između aktivnosti CKX u proteinskim ekstraktima *AtCKX* i kontrolnih biljaka bila je istog reda veličine u slučaju izdanaka krompira (slika 13) i listova duvana (Werner i sar. 2001). Koeficijent sniženja nivoa bioaktivnih citokinina takođe je imao sličnu vrednost kod krompira (slika 17) i duvana (Werner i sar. 2001). Izgleda da heterozigotnost nije imala značajan efekat na aktivnost CKX i sniženje nivoa bioaktivnih citokinina u tkivima *AtCKX* krompira, pošto su ove vrednosti kod transformisanih T₀ biljaka krompira bile slične onima dobijenim kod transgenog duvana T₂ generacije (Werner i sar. 2001).

Uprkos sličnostima u stepenu pojačanja aktivnosti CKX i stepenu sniženja bioaktivnih citokinina kod krompira i duvana, efekat ovih metaboličkih promena na morfologiju *AtCKX* biljaka krompira gajenih *in vitro* bio je mnogo manje izražen nego što je prethodno zabeleženo kod transgenih biljaka duvana i *Arabidopsis thaliana* gajenih u zemljištu. S obzirom na blisku filogenetsku srodnost krompira i duvana i zajednička genetička svojstva (kao što je tetraploidija), bilo bi očekivano da efekat na morfologiju biljaka bude sličan kod ove dve vrste. Pretpostavlja se da se razlike u efektu sniženih nivoa bioaktivnih citokinina na morfologiju krompira gajenog *in vitro* u odnosu na podatke dobijene na duvanu gajenom u staklenoj bašti mogu objasniti različitim uslovima gajenja biljaka.

Brojna istraživanja na krompiru pokazala su da se morfološki efekti različitih fizioloških procesa kod krompira mogu u velikoj meri razlikovati u zavisnosti od toga da li se istraživanje vrši *in vitro* ili *ex vitro*. Tako su Conner i saradnici (1994) pokazali da pojedine linije krompira, transformisane marker genima za rezistenciju na selektivne antibiotike, prilikom sađenja u polju konzistentno pokazuju morfološke karakteristike koje se tokom prethodnog gajenja *in vitro* nisu ispoljavale. Romanov i saradnici (1998) pokazali su da razlike u morfologiji, kao i u sposobnosti tuberizacije između različitih transformisanih linija krompira, mogu biti izražene u različitoj meri *in vitro*, u odnosu na uslove *ex vitro*. Pored toga, Konstantinova i saradnici (1999) pokazali su da se rastenje biljaka krompira u odgovoru na različite fotoperiodske tretmane značajnije menja *ex vitro*, nego *in vitro*. Pošto se biljke u kulturi *in vitro* razvijaju pod drugačijim uslovima sredine (snižen intenzitet svetlosti, drugačiji sastav svetlosnog spektra, veća vlažnost vazduha, slabija razmena gasova), to može biti uzrok neispoljavanju mnogih morfoloških i fizioloških karakteristika koje dolaze do izražaja kod biljaka gajenih u zemljištu.

5.6. Tuberizacija kod *AtCKX* biljaka krompira *in vitro*

Uprkos brojnim pokazateljima koji upućuju na citokinine kao pozitivne regulatore tuberizacije, njihova tačna uloga u ovom procesu još uvek nije potpuno rasvetljena (Jackson, 1999). Do nedavno, istraživanja uloge citokinina u procesu tuberizacije počivala su isključivo na model sistemima *in vitro*, u kojima su biljke izlagane povišenim koncentracijama citokinina, bilo putem egzogenog dodavanja u hranljivu podlogu (Hussey i Stacey, 1984; Gális i sar. 1995; Romanov i sar. 2000; Dragičević i sar. 2004) ili ekspresijom transgena uključenih u biosintezu citokinina (Gális i sar. 1995; Macháčková i sar. 1997; Romanov i sar. 2000). Slična istraživanja

su kasnije proširena na biljke gajene u zemljištu (Morris i sar. 2006; Tao i sar. 2010). Međutim, prvi rezultati vezani za tuberizaciju u uslovima citokininske deficijencije objavljeni su tek 2011. godine, kada je krompir (sorta "Solara") transformisan genom *AtCKX1* (Hartmann i sar. 2011). Dobijene *AtCKX1* biljke, koje su gajene u zemljištu, odlikovale su se smanjenim prinosom krtola i manjim prosečnim brojem krtola po biljci.

U ovom radu praćeni su parametri tuberizacije kod transformisanih *AtCKX1* i *AtCKX2* biljaka krompira gajenih *in vitro*, a rezultati su diskutovani u kontekstu aktivnosti CKX i nivoa bioaktivnih citokinina u izdancima transformisanih linija. Indukcija i inicijacija krtola praćene su na svakih 30 dana tokom perioda od 120 dana bez supkultivacije, i to beleženjem procenta izdanaka sa krtolama (slika 25) i broja krtola po izdanku (slika 26). Uvećavanje krtola praćeno je merenjem prećnika krtola u 30 i 120 dana starim kulturama izdanaka (slika 27), kao i merenjem mase krtola posle 120 dana bez supkultivacije (slika 28).

Citokinini su ukljućeni u indukciju krtola (Hussey i Stacey, 1984; Gális i sar. 1995; Malkawi i sar. 2007), kao i u njihovu inicijaciju i uvećavanje (Obata-Sasamoto i Suzuki, 1979; Kefi i sar. 2000). Pokazano je da citokinini stimulišu ćelijske deobe kod *Arabidopsis thaliana* i duvana (Riou-Khamlichi i sar. 1999), te je verovatno da utiću na intenzivnu deobu ćelija koja karakteriše rane faze uvećavanja tek inicirane krtole. Pored toga, poznato je da citokinini ućestvuju u metabolizmu organa uvira, usmeravajući transport asimilata iz autotrofnih tkiva do organa za skladištenje (Roitsch i Ehneß, 2000). Budući da krtola koja raste postaje dominantni organ uvira kod krompira (Ferne i Willmitzer, 2001), logićna je pretpostavka da citokinini ućestvuju u ovom procesu.

5.6.1. Indukcija krtola *in vitro* kod *AtCKX* biljaka krompira

Indukcija krtola predstavlja izuzetno složen fiziološki proces koji biljku krompira priprema za formiranje krtola, a regulisana je fotoperiodski i hormonalno. Ključni elementi koji učestvuju u ovoj regulaciji svakako su fitohrom B (PHYB) i giberelini (Jackson i Prat, 1996; Martínez-García i sar. 2001), ali sve je jasnije da na indukciju krtola utiču i fitohrom A (Yanovsky i sar. 2000), jasmonska kiselina (Koda i sar. 1991; Sarkar i sar. 2006; Malkawi i sar. 2007) i citokinini (Hussey i Stacey, 1984; Gális i sar. 1995; Malkawi i sar. 2007).

S obzirom na to da se procesi indukcije i inicijacije krtola mogu vremenski preklapati, između njih se ne može povući jasna granica (Vreugdenhil i Struik, 1989). Ne može se sa sigurnošću tvrditi da biljka koja nije razvila nijednu krtolu nije indukovana, ali je zato izvesno da sve biljke koje su razvile krtole, jesu indukovane. Otuda se može pretpostaviti da procenat biljaka koje su razvile krtole predstavlja pogodan *statistički pokazatelj* indukcije krtola, iako je stvaran procenat biljaka kod kojih su indukovane krtole nemoguće utvrditi.

U toku prvih 30 dana kontrolne netransformisane biljke krompira, kao ni biljke pojedinih transformisanih *AtCKX* linija, nisu razvijale krtole (slika 25a). Poznato je da je kod sorte "Désirée" ne dolazi do formiranja krtola posle četiri nedelje gajenja *in vitro*, u uslovima dugog dana (Dobránszki, 2001; Dobránszki i Tábori, 2010; Dragičević i sar. 2008). Proces tuberizacije je kod ove sorte usporen, ali ne i inhibiran na dugom danu, tako da se krtole mogu formirati i u neindukujućim uslovima posle šest nedelja. U kulturi *in vitro* pojedini uslovi, kao što je nizak intenzitet osvetljenosti u odnosu na uslove *ex vitro* takođe deluju stimulatивно na indukciju krtola kod krompira (Seabrook, 2005).

Kod tri transformisane *AtCKX* linije, krtole su se formirale na dugom danu već u toku prvih 30 dana (slika 25a), što znači da su, verovatno zahvaljujući sniženom nivou bioaktivnih citokina, ove biljke prevazišle inhibitorski efekat dugog dana na indukciju krtola. Krtole su se kod ovih biljaka razvijale pretežno na vrhovima stolona, a sesilne krtole su se javljale samo kod linije *AtCKX2-48* (tabela 19). Poznato je da se sesilne krtole u kulturi *in vitro* formiraju kao odgovor na izuzetno jak induktivni stimulus, dok stimulus umerene jačine vodi formiranju krtola na drugim pozicijama (McGrady i sar. 1986).

Za razliku od dugog dana, u kontinuiranom mraku su biljke svih transformisanih linija kao i kontrolne biljke, bile izložene jakom induktivnom stimulusu te je formiranje krtola bilo favorizovano u odnosu na formiranje stolona i razvoj i izduživanje bočnih izdanaka, a pojava sesilnih krtola je bila rasprostranjena kod svih ispitivanih linija (tabela 19). Krtole su se u mraku tokom svih 120 dana kod većine *AtCKX* linija javljale na većem broju izdanaka nego kod kontrole (slika 25b), što ukazuje da su transformisane biljke verovatno osetljivije na induktivni stimulus, ili je inicijacija krtola na njihovim izdancima povećana. Međutim, pošto podaci o broju krtola po izdanku u kontinuiranom mraku (slika 26b) ne govore u prilog hipotezi o povećanoj inicijaciji krtola, verovatnije je da se u ovom slučaju radi o većoj osetljivosti transformisanih biljaka na stimulus za indukciju krtola.

Tri transformisane linije (*AtCKX1-6a*, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-51*) kod kojih je procenat izdanaka sa krtolama u kontinuiranom mraku tokom svih 120 dana bio značajno viši od kontrole (slika 25b) ujedno su imale značajno povišen nivo endogene IAA u izdancima (slika 19), pa je moguće da je upravo razlika u endogenom nivou IAA doprinela razlikama u indukciji i/ili inicijaciji krtola između kontrolnih i transformisanih *AtCKX* biljaka u kontinuiranom mraku. Ova

hipoteza je u skladu sa rezultatima Dragičević i saradnika (2008), koji pokazali su da egzogena primena IAA favorizuje pojavu krtola u kulturi izdanaka krompira u kontinuiranom mraku.

Ranija istraživanja (Macháčková i sar. 1997; Sergeeva i sar. 2000) na biljkama krompira transformisanim genom *ipt*, pokazala su da je kod biljaka gajenih *in vitro* koje prekomerno sintetišu citokinine, tuberizacija favorizovana u odnosu na kontrolne biljke. Iz toga bi se moglo zaključiti da citokinini pozitivno regulišu tuberizaciju kod krompira, te da bi ovaj proces trebalo da bude inhibiran kod biljaka krompira koje imaju snižen nivo bioaktivnih citokinina. U tom smislu, deluje iznenađujuće da bi *AtCKX* biljke, koje imaju snižen endogeni nivo bioaktivnih citokinina, mogle biti osetljivije na signal za indukciju krtola, nego kontrolne biljke. Ovakvi rezultati sugerišu da citokinini nisu jedini (niti najvažniji) faktor koji reguliše indukciju, odnosno inicijaciju krtola i da su u ove procese umešani i drugi regulatorni faktori, među kojima su verovatno auksini.

Sličan odnos između transformisanih *ipt* i *AtCKX* biljaka već je zabeležen tokom protekle decenije u dva istraživanja sprovedena na duvanu – *Nicotiana tabacum* (Guivarc'h i sar. 2002; Werner i sar. 2008). Duvan je vrsta filogenetski bliska krompiru ali nema sposobost formiranja krtola. Međutim, kod transgene linije duvana BIK62 koja eksprimira bakterijski gen *ipt* za biosintezu citokinina, došlo je do formiranja zadebljanja na izdanku u kojima se nakupljao skrob, što je donekle uporedivo sa tuberizacijom kod krompira (Guivarc'h i sar. 2002). Sličan fenomen zabeležen je nekoliko godina kasnije kod biljaka duvana transformisanih genima *AtCKX1* i *AtCKX2* pod kontrolom promotora 35S (Werner i sar. 2008). Iako je u prvom slučaju nivo endogenih citokinina bio povećan, a u drugom smanjen usled ekspresije transgena, poremećena citokininska homeostaza vodila je u oba

slučaja akumulaciji skroba u zadebljanjima na izdanku biljke koja uobičajeno nema sposobnost tuberizacije.

Po svemu sudeći, kod krompira kao i kod duvana, transgene biljke koje eksprimiraju gene citokininskog metabolizma, kako *ipt*, tako i *AtCKX*, mogu biti sposobne da formiraju krtole ili slična zadebljanja izdanka, u uslovima u kojima to kod kontrolnih biljaka nije moguće. Prevazilaženje inhibitornih stimulusa koji u uobičajenim uslovima sprečavaju ili odlažu formiranje krtola u izdanku, može uključivati različite signalne mehanizme kod biljaka sa povećanim, odnosno sniženim nivoima bioaktivnih citokinina. Time bi mogla biti objašnjena prividna kontradiktornost u pojačanom odgovoru na indukciju krtola i kod biljaka krompira sa povišenim, kao i kod onih sa sniženim nivoom bioaktivnih citokinina, u odnosu na kontrolne biljke.

Iako se citokinini generalno smatraju stimulatorima tuberizacije kod krompira, literaturni podaci koji se odnose na njihovu ulogu u samom procesu indukcije krtola, oskudni su i kontradiktorni. Dodavanje BA u hranljivu podlogu u nekim istraživanjima je doprinosilo prevazilaženju inhibicije tuberizacije u uslovima dugog dana (Hussey i Stacey, 1984), a u nekima nije (Xu i sar. 1998a; Dragičević i sar. 2004). U većini istraživanja, efekat citokinina na inicijaciju krtola *in vitro* (bilo njihovim dodavanjem u podlogu, ili ekspresijom transgena za njihovu biosintezu) bio je ispitivan u kontinuiranom mraku pa ne možemo govoriti o efektu citokinina na indukciju krtola, već na proces inicijacije krtola kod već indukovanih biljaka (Macháčková i sar. 1997; Sergeeva i sar. 2000; Romanov i sar. 2000). U istraživanjima na transgenim biljkama krompira gajenim u zemljištu, krtole su do trenutka beleženja rezultata već formirane i kod kontrolnih i kod transgenih biljaka pa ne raspoložemo podacima o eventualnoj inhibiciji tuberizacije ni iz ovih istraživanja (Tao i sar. 2010; Hartmann i sar. 2011).

Međutim, u ovom radu je prevazilaženje inhibitornog uticaja svetlosti postignuto ne povećanjem, već smanjenjem endogenog nivoa bioaktivnih citokinina, kod tri od pet transformisanih *AtCKX* linija. Nameće se pretpostavka da je kod ovih transformisanih linija upravo sniženje nivoa bioaktivnih citokinina pomoglo prevazilaženju inhibitornog uticaja svetlosti na tuberizaciju, što bi ukazalo na međusobnu povezanost signalnih puteva svetlosti i citokinina. Ovakva povezanost već je dokumentovana u brojnim istraživanjima (Chory i sar. 1994; Kusnetsov i sar. 1999; Cluis i sar. 2004; Vandenbussche i sar. 2007) i često uključuje interakciju signalnih puteva citokinina sa fitohromom B (Su i Howell, 1995; Sweere i sar. 2001; Mira-Rodado i sar. 2007).

Transgene biljke krompira (sorta "Désirée") koje eksprimiraju gen *phyB* poreklom iz *Arabidopsis thaliana*, pokazuju pojačanu fotoperiodsku osetljivost i karakterišu se kasnijim početkom tuberizacije u uslovima dugog dana (Thiele i sar. 1999). Bilo bi interesantno proveriti pretpostavku da do tuberizacije na dugom danu kod nekih od transformisanih *AtCKX* linija krompira dolazi, na sličan način, zbog snižene osetljivosti na fotoperiod - i to usled sniženja nivoa bioaktivnih citokinina.

Za sada ne postoje podaci o učešću citokinina u fotoperiodskoj indukciji krtola. S druge strane, poznato je da su signalni putevi fotoperiodske indukcije tuberizacije krompira blisko povezani sa putevima indukcije cvetanja (Rodríguez-Falcón i sar. 2006), u kojima je kod mnogih drugih biljnih vrsta potvrđeno učešće citokinina (Bonhomme i sar. 2000; Doi i sar. 2004). Stoga je moguće da i kod krompira citokinini posreduju u percepciji fotoperioda. U tom slučaju, sniženje nivoa bioaktivnih formi citokinina u izdancima *AtCKX* biljaka moglo bi dovesti do smanjenja efikasnosti percepcije fotoperioda i na taj način oslabiti uticaj dugog dana na indukciju krtola.

Međutim, prevazilaženje inhibitornog uticaja svetlosti na indukciju krtola nije uočeno kod dve transformisane linije, *AtCKX1-36a* i *AtCKX2-39* (slika 25a). Linija *AtCKX2-39* se po procentu izdanaka sa krtolama nije gotovo ni u jednom trenutku razlikovala od kontrole – nakon 30, 60, 90 ili 120 dana, na dugom danu ili u mraku (slika 25a i b). Očigledno je da kod biljaka ove transformisane linije nije došlo do pomenutog efekta na indukciju krtola, bez obzira što je u izdancima ovih biljaka nivo bioaktivnih citokinina bio značajno snižen (slika 17a).

Sa biljkama linije *AtCKX1-36a* bio je sasvim drugačiji slučaj. Kod ovih biljaka dinamika formiranja krtola značajno se razlikovala od kontrole, i to na različite načine na dugom danu i u mraku. Kod ove linije, počev od 90-og dana na dugom danu procenat izdanaka sa krtolama bio je niži nego kod kontrole, a u kontinuiranom mraku viši (slika 25). Moguća su dva različita objašnjenja ove pojave. S jedne strane, moguće je da kod biljaka *AtCKX1-36a*, isto kao i *AtCKX2-39*, nije prevaziđen inhibitoran uticaj svetlosti na indukciju krtola, utoliko pre što kod ovih biljaka nivo bioaktivnih citokinina u izdancima čak i nije bio značajno snižen (slika 17a). Sa druge strane, moguće je da uočena razlika u procentu izdanaka sa krtolama ne odražava razlike u indukciji, već razlike u inicijaciji krtola. U tom slučaju, kod ovih biljaka je mogao postojati aktivan signal za indukciju krtola, ali je tranzicija iz stolona u krtolu, ili čak nakupljanje skroba u iniciranoj krtoli, bilo otežano. U skladu sa ovom pretpostavkom, kod biljaka *AtCKX1-36a* na dugom danu je formiran mali broj krtola po izdanku. Ovo je jedina linija kod koje su se izdanci sa više od jedne krtole pojavili tek posle više od 90 dana na dugom danu (slika 26a). Pored toga, krtole formirane na biljkama *AtCKX1-36a* na dugom danu bile su posle 120 dana u kulturi značajno sitnije nego kod svih ostalih linija (slika 27a i 28). Ovi parametri tuberizacije biljaka *AtCKX1-36a* u skladu su sa podacima dobijenim kod "CKX-4", jedne od linija *AtCKX1* biljaka gajenih u zemljištu iz istraživanja Hartmann i saradnika (2011).

5.6.2. Inicijacija krtola kod *AtCKX* biljaka krompira *in vitro*

Za razliku od procenta izdanaka sa krtolama, koji može zavisiti i od indukcije i od inicijacije krtola, praćenjem *broja krtola po izdanku sa krtolama* moguće je ograničiti kvantifikaciju procesa inicijacije krtola samo na one biljke kod kojih su krtole indukovane (slika 26).

U uslovima dugog dana, između 30-og i 60-og dana kod kontrolnih izdanaka je, kao i kod svih transformisanih linija, prevaziđen inhibitorski uticaj svetlosti na tuberizaciju. Od tada na dalje, broj krtola po izdanku kod kontrole uvek je bio veći ili jednak vrednostima dobijenim za svaku od transformisanih *AtCKX* linija, a u poslednjih 30 dana je bio značajno viši nego kod tri transformisane linije (slika 26a). U kontinuiranom mraku, kontrolna vrednost je već počev od 60-og dana bila uvek značajno viša nego kod sve tri *AtCKX2* linije (slika 26b), što se poklapa sa značajnim sniženjem nivoa bioaktivnih citokinina u izdancima ovih linija (slika 17a). Očigledno je da je sniženje nivoa bioaktivnih citokinina imalo jasan efekat na smanjenje broja krtola po izdanku, što je sasvim očekivano kada se imaju u vidu literaturni podaci, bilo u sistemima sa povišenim (Macháčková i sar. 1997; Romanov i sar. 2000; Dragičević i sar. 2004; Tao i sar. 2010) ili sniženim nivoima citokinina (Hartmann i sar. 2011).

Inicijacija krtola kod krompira praćena je serijom promena na morfološkom i histološkom (Xu i sar. 1998b), ali i fiziološkom (Vreugdenhil i Struik, 1989), molekularno-biološkom (Visser i sar. 1994) i biohemijskom nivou (Appeldoorn i sar. 1997; 1999; 2002; Viola i sar. 2001; Geigenberger i sar. 2004). Priroda ovih promena zajednička je za biljke gajene *in vitro* i one koje su gajene u zemljištu. Najznačajnija razlika u tuberizaciji između biljaka gajenih *in vitro* i *ex vitro* je u tome što se krtole *in vitro* mogu razviti na bilo kojem delu izdanka, a ne samo na

vrhu stolona, i uglavnom se stvaraju iznad nivoa hranljive podloge. Pored toga, krtole formirane *in vitro* obično prestaju da rastu pošto dostignu prečnik od 8 mm, bez obzira na dostupnost nutrijenata u hranljivoj podlozi (Xu i sar. 1998b).

Učešće citokinina u inicijaciji i uvećavanju krtola potvrđeno je mnogo puta (Obata-Sasamoto i Suzuki, 1979; Kefi i sar. 2000). Inicijacija krtola je praćena inhibicijom izduživanja ćelija u subapikalnom regionu stolona i prelaskom na obrazac radijalnog (lateralnog) rasteња (Vreugdenhil i Struik, 1989; Xu i sar. 1998b).

S obzirom na to da je u izdancima većine *AtCKX* linija krompira kvantitativni odnos IAA i bioaktivnih citokinina bio značajno povišen u korist IAA (slika 20), moguće je da je ovakav hormonalni balans bio nepovoljan za inicijaciju novih krtola na stolonima, bilo na dugom danu ili u kontinuiranom mraku. To ne znači da je formiranje krtola kod transformisanih *AtCKX* biljaka bilo onemogućeno, već samo da je verovatnoća inicijacije krtole bila snižena usled nepovoljnog hormonalnog balansa pa je zato ukupan broj krtola bio manji nego kod kontrolnih biljaka (slika 26). Kvantitativni odnos između endogenog nivoa auksina i citokinina značajan je za tuberizaciju (Sergeeva i sar. 2000). Citokinini stimulišu ćelijske deobe kod *Arabidopsis thaliana* i duvana (Riou-Khamlichi i sar. 1999), te je verovatno da utiču na intenzivnu deobu ćelija koja prati proces inicijacije krtole. Osim toga, oni su identifikovani kao hormonski signal u radijalnom debljanju izdanka topole (Nieminen i sar. 2008). S druge strane, poznato je da su auksini odgovorni za longitudinalno rasteње biljnih ćelija (Rayle i Cleland, 1992; Perrot-Rechenmann, 2010), te je opravdano pretpostaviti da kvantitativni odnos auksina i citokinina može određivati obrazac rasteња izdanka (longitudinalni, odnosno radijalni), kao što je onaj po kojem se krtole razlikuju od stolona. Promena kvantitativnog odnosa auksina i citokinina u subapikalnom

regionu stolona mogla bi biti jedan od hormonalnih okidača za promenu obrasca rastenja koja vodi inicijaciji krtola. U skladu sa tom pretpostavkom, pokazano je da endogeni nivo auksina, koji je povišen u stolonima neposredno pre inicijacije krtola, naglo opada u ranim fazama rastenja krtola, dok endogeni nivo citokinina raste (Obata-Sasamoto i Suzuki, 1979). Nije isključeno da upravo ove promene u odnosu endogenih nivoa hormona diktiraju promenu obrasca rastenja stolona i njihovo pretvaranje u krtole.

Romanov i saradnici (2000) pokazali su da pri indukujućim uslovima (kontinuirani mrak, 5% saharoze u hranljivoj podlozi) egzogena primena kinetina doprinosi povećanju broja krtola po izdanku, dok primena IAA vodi povećanju mase krtola. Smanjen broj krtola po izdanku kod transformisanih *AtCKX* biljaka u uslovima kontinuiranog mraka (slika 26b) u skladu je sa rezultatima Romanova i saradnika (2000), prema kojima citokinini u indukujućim uslovima doprinose povećavanju broja krtola po izdanku. U tom smislu očekivano je da se sniženje nivoa bioaktivnih citokinina kod transformisanih *AtCKX* biljaka krompira odrazi na smanjenje broja krtola po izdanku. Smanjen broj krtola po izdanku zabeležili su i Hartmann i saradnici (2011) kod *AtCKX1* biljaka krompira gajenih u zemljištu.

5.6.3. Uvećavanje krtola kod *AtCKX* biljaka krompira *in vitro*

Uvećavanju krtola doprinose kako intenzivne ćelijske deobe u perimedularnoj zoni, tako i rastenje ćelija u perimedularnoj zoni i srži krtole (Xu i sar. 1998b). U fazi uvećavanja u krtoli dolazi do promene u ekspresiji gena usled čega se intenzivira transport saharoze u krtolu i metabolizam ugljenih hidrata, a krtola počinje da akumulira velike količine skroba i postaje dominantan organ uvira (Ferne i Willmitzer, 2001; Geigenberger i sar. 2004). Učešće citokinina u aktivaciji membranskih transportera i enzima metabolizma ugljenih hidrata do

sada je više puta potvrđeno (Roitsch i Ehneß, 2000; Proels i Roitsch, 2009), a pokazano je i u slučaju ranih faza tuberizacije kod krompira (Kefi i sar. 2000).

Iako su krtole kod tri *AtCKX* linije na dugom danu formirane ranije nego kod kontrolnih biljaka, na kraju eksperimentalnog perioda od 120 dana njihove krtole nisu imale veći prečnik (slika 27a) niti masu (slika 28) u odnosu na krtole kontrolnih biljaka. Kod jedne od transformisanih linija, *AtCKX1-36a* krtole su posle 120 dana imale značajno manji prečnik (slika 27a) i masu (slika 28) u odnosu na krtole kod kontrole i svih ostalih linija. Masa krtola kod ove linije bila je posle 120 dana preko tri puta manja u odnosu na kontrolu (slika 28). Hartmann i saradnici (2011) takođe su zabeležili kod *AtCKX1* krompira gajenog u zemljištu, značajno smanjenje mase krtola u odnosu na kontrolu. U ovom radu, međutim, do smanjenja mase krtola došlo je samo kod linije *AtCKX1-36a*. Interesantno je da je linija *AtCKX1-36a* takođe ispoljavala vrlo izražene simptome "sindroma citokininske deficijencije" - značajno skraćenje izdanka (slika 22) i izuzetno povećan prosečan broj bočnih izdanaka (slika 23), što je biljke ove linije činilo donekle vizuelno prepoznatljivim u odnosu na biljke drugih linija (slika 21). Moguće je da su kod biljaka transformisanih genom *AtCKX2* ovako značajna odstupanja od kontrole u morfološkim osobinama (uključujući i masu krtola) izostala iz istih razloga, zbog kojih su se i u ranijim istraživanjima na duvanu i *Arabidopsis thaliana*, *AtCKX2* biljke manje morfološki razlikovale od kontrole nego *AtCKX1* biljke (Werner i sar. 2001; 2003).

U kontinuiranom mraku je uočena promena odnosa između veličine krtola kontrolnih i transformisanih biljaka u vremenu. Posle prvih 30 dana je prečnik krtola kod tri transformisane linije bio veći nego kod kontrolnih biljaka, da bi na kraju perioda od 120 dana ova razlika nestala, a umesto toga krtole na kontrolnim biljkama su imale čak značajno veći prečnik u odnosu na jednu od transformisanih

linija, *AtCKX2-48* (slika 27b). Masa krtola kod kontrolnih biljaka takođe je bila veća u odnosu na krtole kod ove linije (slika 28).

Krtole krompira se mogu posmatrati kao organi uvira koji međusobno kompetiraju za asimilate (Struik i sar. 1991; Müller-Röber i sar. 1992) što može biti razlog tome da se posle prvih 30 dana krupnije krtole javljaju kod transformisanih linija koje ne razvijaju više od jedne krtole po izdanku (slike 26b i 27b). Saglasno sa ovim rezultatom, u jednom od eksperimenata sa transgenim biljkama krompira koje eksprimiraju gen *ipt* zabeležena je upravo obrnuta situacija – dobijene su krtole manjih dimenzija, ali veći broj krtola po biljci (Tao i sar. 2010).

Međutim, do završetka perioda od 120 dana u kontinuiranom mraku došlo je do izjednačavanja prosečnih dimenzija krtola kontrolnih biljaka, sa krtolama koje su se javljale kod transformisanih linija, a prečnik krtola kod linije *AtCKX2-48* postao je čak značajno manji nego kod kontrole (slika 27b). Krtole koje su se javljaju kod ove linije imale su i manju masu od kontrolnih krtola (slika 28). Može se pretpostaviti da je kod linije *AtCKX2-48* sniženje nivoa bioaktivnih citokinina doprinelo slabijem nakupljanju asimilata u krtolama, s obzirom da u ovom procesu citokinini igraju značajnu ulogu (Kefi i sar. 2000). Ipak, izgleda da pomenuti efekat nije bio od naročitog značaja u uslovima kontinuiranog mraka, jer je zabeležen samo kod jedne transformisane linije.

Različiti efekti sniženja nivoa bioaktivnih citokinina na različite faze procesa tuberizacije kod različitih transformisanih *AtCKX* linija krompira mogu se pripisati činjenici da citokinini nisu jedini, a ni najznačajniji endogeni faktor u kontroli tuberizacije. Razlike između transformisanih linija mogle bi biti posledica insercije transgena na različite pozicije u genomu, što može uticati na morfološke osobine biljaka (uključujući i parametre tuberizacije), interferirajući sa efektima izmenjene

citokininske homeostaze i na taj način ih čineći manje očiglednim. Zbog tetraploidnosti, smatra se da je kod krompira efekat insercije transgena (putem pozicionog efekta ili insercione mutagenoze) na ispoljavanje morfoloških osobina ograničen, ali ne i potpuno isključen (Conner i sar. 1994).

Poređenje rezultata dobijenih u ovom istraživanju sa rezultatima koji su već objavljeni u literaturi, daje prilično jasnu sliku. Jasno je da sniženje endogenih nivoa bioaktivnih citokinina kod transformisanih *AtCKX* biljaka krompira u interakciji sa drugim endogenim faktorima može (i ne mora) voditi prevazilaženju inhibitornog uticaja svetlosti na tuberizaciju, smanjenoj inicijaciji krtola i prolaznom ubrzavanju uvećavanja krtola, da bi posle određenog vremena krtole transformisanih biljaka bile približnih, ili čak manjih dimenzija i mase u odnosu na krtole kod kontrole.

* * *

Citokinini učestvuju u različitim regulatornim mehanizmima uključenim u kontrolu različitih faza tuberizacije kako u indukujućim, tako i u neindukujućim uslovima. Uticaj citokinina na formiranje krtola (u smislu stimulacije ili inhibicije) razlikuje se u različitim fazama tuberizacije, a može zavisiti i od uticaja drugih spoljašnjih i endogenih faktora, kao što su fotoperiod, dostupnost šećera, hormonalni status i tome slično. Najzad, sniženje nivoa endogenih citokinina ne mora nužno imati suprotan efekat na pojedine fiziološke procese, u odnosu na prekomernu produkciju citokinina kakva, prema nekim istraživačima, postoji kod biljaka transformisanih genom *ipt*. Na primer, moguće je da biljke koje prekomerno sintetišu citokinine, kao i one koji imaju snižen endogeni nivo citokinina, imaju povećanu osetljivost na stimulus za indukciju krtola, zahvaljujući potpuno

različitim regulatornim mehanizmima. Potrebna su dalja istraživanja ovih interakcija na transgenim biljkama koje bi eksprimirale kako kataboličke (*AtCKX*) tako i gene biosinteze citokinina (*ipt*), kako bismo identifikovali signalne puteve pomoću kojih citokinini utiču na različite faze procesa tuberizacije kako u indukujućim, tako i u neindukujućim uslovima. Možemo se nadati da će, u budućnosti, nove perspektive za poboljšanje prinosa i kvaliteta krompira proizaći iz ovakvih istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

1. Izvršena je genetička transformacija krompira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) genima za citokinin oksidazu/dehidrogenazu (CKX) iz *Arabidopsis thaliana* - *AtCKX1* i *AtCKX2*. Po prvi put su dobijene biljke krompira transformisane genom *AtCKX2*. Stabilna integracija transgena u genom i stabilna ekspresija u izdancima i korenovima potvrđeni su kod dve linije transformisane genom *AtCKX1* i tri linije transformisane sa *AtCKX2*. Povećana aktivnost citokinin oksidaze/dehidrogenaze zabeležena je u izdancima četiri i korenovima dve od pet transformisanih linija.
2. Po prvi put je utvrđen citokininski profil izdanaka i korenova netransformisanih biljaka krompira gajenih *in vitro*. Ukupni nivo citokinina gotovo je dvostruko veći u korenovima nego u izdancima krompira. Bioaktivne forme citokinina - slobodne baze i ribozidi - čine svega 2,4% ukupnih citokinina u izdancima i 3,1% ukupnih citokinina u korenovima. Daleko najzastupljenija grupa citokinina kako u izdancima, tako i u korenovima krompira, jesu neaktivne forme i to pre svega N⁷-glukozidi. Osnovni organi za skladištenje citokinina su korenovi, u kojima je nivo formi citokinina za skladištenje oko 50 puta viši nego u izdancima. Citokininski nukleotidi su tek malo zastupljeniji od bioaktivnih formi citokinina kako u izdancima, tako i u korenovima krompira.
3. Ekspresija gena *AtCKX1* i *AtCKX2* u transformisanom krompiru nije nužno vodila sniženju nivoa ukupnih citokinina, ali je izmenila citokininski profil transformisanih biljaka. Kod većine transformisanih

linija, uključujući sve linije koje eksprimiraju *AtCKX2*, nivo bioaktivnih formi citokinina je značajno snižen, kako u izdancima, tako i u korenovima. Kod linija kod kojih nivo ukupnih citokinina nije snižen ili je čak povećan, uglavnom je došlo do pojačanog nakupljanja formi citokinina za skladištenje, i/ili neaktivnih formi citokinina.

4. **Promene u citokininskoj homeostazi bile su praćene promenama u endogenom nivou indol-sirćetne kiseline (IAA), koji je kod većine transformisanih linija bio značajno povišen.**
5. **"Sindrom citokininske deficijencije", kakav je prethodno opisan kod transformisanog duvana i *Arabidopsis thaliana* nije u potpunosti uočen, ali su se transformisane *AtCKX* biljke karakterisale skraćenim izdankom u odnosu na kontrolu,** a kod jedne transformisane linije bilo je izraženo bočno grananje. Efekat sniženja endogenog nivoa citokinina na morfološke osobine transformisanih biljaka verovatno je bio izmenjen usled toga što su biljke gajene *in vitro*.
6. Promene u metabolizmu citokinina i auksina odrazile su se na proces tuberizacije *in vitro*, kako na dugom danu, tako i u kontinuiranom mraku. **Kod tri od pet transformisanih linija došlo je do prevazilaženja inhibitornog uticaja svetlosti na indukciju krtola,** pa su se krtole pojavile već u toku prvih 30 dana pri uslovima dugog dana, što se nikada ne događa kod kontrolnih biljaka ove sorte krompira.
7. **Transformisane *AtCKX* biljke formirale su u proseku manji broj krtola po izdanku nego kontrolne biljke,** što ukazuje na smanjenu inicijaciju krtola kod biljaka sa sniženim nivoima bioaktivnih citokinina, a može biti

posledica povećanog odnosa između endogene IAA i bioaktivnih citokinina. Efekat na inicijaciju krtola je mnogo izraženiji u kontinuiranom mraku, nego na dugom danu.

8. Prečnik i masa krtola nakon 120 dana gajenja u kulturi, kod većine transformisanih linija se nisu značajno razlikovali od kontrolnih vrednosti. **Samo kod jedne od pet transformisanih linija, *AtCKX1-36a* izmereni su manji prečnik i masa krtola.**

9. **Citokinini različito utiču na različite faze u procesu tuberizacije kod krompira.** Sniženje nivoa bioaktivnih citokinina povoljno deluje na indukciju krtola kod transformisanih *AtCKX* biljaka, ali ovaj efekat nije praćen odgovarajućim efektima na inicijaciju i uvećavanje krtola.

7. LITERATURA

Abelenda JA, Navarro C, Prat S (2011) From the model to the crop: genes controlling tuber formation in potato. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 287-292.

Ahmad P, Ashraf M, Younis M, Hu X, Kumar A, Akram NA, Al-Qurainy F (2012) Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances* 30: 524-540.

Almekinders CJM, Struik PC (1996) Shoot development and flowering in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research* 39: 581-607.

Appeldoorn NJG, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, van der Plas LHW (1997) Developmental changes in enzymes involved in the conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberization of potato. *Planta* 202: 220-226.

Appeldoorn NJG, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, van der Plas LHW (1999) Developmental changes in enzymes involved in the conversion of hexose phosphate and its subsequent metabolites during early tuberization of potato. *Plant, Cell and Environment* 22: 1085-1096.

Appeldoorn NJG, Sergeeva L, Vreugdenhil D, van der Plas LHW, Visser RGF (2002) *In situ* analysis of enzymes involved in sucrose to hexose-phosphate conversion during stolon-to-tuber transition in potato. *Physiologia plantarum* 115: 303-310.

Argueso CT, Raines T, Kieber JJ (2010) Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 533-539.

Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309: 741-745.

Assaad FF, Tucker KL, Signer ER (1993) Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 22: 1067-1085.

Åstot C, Dolezal K, Nordström A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua NH, Sandberg G (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 14778-14783.

Bae E, Bingman CA, Bitto E, Aceti DJ, Phillips Jr. GN (2008) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70: 303-306.

Bajguz A, Piotrowska A (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* 70: 957-969.

Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ (2006) Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *The Plant Cell* 18: 3443-3457.

Bangerth F (1994) Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta* 194: 439-442.

Barrell PJ, Yongjin S, Cooper PA, Conner AJ (2002) Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 61-68.

Benfey PN, Ren L, Chua NH (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *The EMBO Journal* 8: 2195-2202.

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis I: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.

Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.

Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.

Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* 125: 378-386.

Birch RG (1997) Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 297-326.

Blagoeva E, Dobrev PI, Malbeck J, Motyka V, Gaudinová A, Vaňková R (2004) Effect of exogenous cytokinins, auxins and adenine on cytokinin N-glucosylation and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity in de-rooted radish seedlings. *Plant Growth Regulation* 44: 15-23.

Bonhomme F, Kurz B, Melzer S, Bernier G, Jacquard A (2000) Cytokinin and gibberellin activate *SaMADS A*, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *The Plant Journal* 24: 103-111.

Börnke F, Sonnewald U, Biemelt S (2007) IV.1 Potato. In: Pua EC, Davey MR (eds): *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 59: Transgenic Crops IV*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Nemačka, pp. 297-315.

Bou-Torrent J, Martínez-García JF, García-Martínez JL, Prat S (2011) Gibberellin A₁ metabolism contributes to the control of photoperiod-mediated tuberization in potato. *PLoS ONE* 6: Article number e24458.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bradshaw JE, Bryan GJ, Ramsay G (2006) Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Research* 49: 49-65.

Brencic A, Winans SC (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 155-194.

Brown CR (2005) Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research* 82: 163-172.

Brown CR, Kwiatkowski S, Martin MW, Thomas PE (1988) Eradication of PVS from potato clones through excision of meristems from *in vitro*, heat-treated shoot tips. *American Potato Journal* 65: 633-638.

Brugière N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu X, Jones RJ, Habben JE (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology* 132: 1228-1240.

Buddendorf-Joosten JMC, Woltering EJ (1996) Controlling the gaseous composition *in vitro* - description of a flow system and effects of the different gaseous components on *in vitro* growth of potato plantlets. *Scientia Horticulturae* 65: 11-23.

Buechel S, Leibfried A, To JPC, Zhao Z, Andersen SU, Kieber JJ, Lohmann JU (2010) Role of A-type *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS* in meristem maintenance and regeneration. *European Journal of Cell Biology* 89: 279-284.

Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34: 13-26.

Burlingame B, Mouillé B, Charrondière R (2009) Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 494-502.

Carabelli M, Possenti M, Sessa G, Ciolfi A, Sassi M, Morelli G, Ruberti I (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes and Development* 21: 1863-1868.

Carputo D, Frusciante L, Peloquin SJ (2003) The role of $2n$ gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in tuber-bearing Solanums. *Genetics* 163: 287-294.

Carrera E, Bou J, García-Martínez JL, Prat S (2000) Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *The Plant Journal* 22: 247-256.

Chakravarty B, Wang-Pruski G, Flinn B, Gustafson V, Regan S (2007) Genetic transformation in potato: Approaches and strategies. *American Journal of Potato Research* 84: 301-311.

Chandra S (2012) Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters* 34: 407-415.

Chen H, Banerjee AK, Hannapel DJ (2004) The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1*. *The Plant Journal* 38: 276-284.

Chen H, Rosin FM, Prat S, Hannapel DJ (2003) Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation. *Plant Physiology* 132: 1391-1404.

Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *det* mutants have an altered response to cytokinins. *Plant Physiology* 104: 339-347.

Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual Review of Microbiology* 59: 451-485.

Cingel A, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Čalić-Dragosavac D, Smigocki A, Ninković S (2010) *Agrobacterium*-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragačevka and cv. Jelica). *African Journal of Biotechnology* 9: 4644-4650.

Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS (2004) The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *The Plant Journal* 38: 332-347.

Conner AJ (2007) Field testing of transgenic potatoes. In: Vreugdenhil D (ed): *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Elsevier, Oxford, Ujedinjeno Kraljevstvo, pp. 687-703.

Conner AJ, Williams MK, Abernethy DJ, Fletcher PJ, Genet RA (1994) Field performance of transgenic potatoes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 22: 361-371.

Conner AJ, Williams MK, Gardner RC, Derolles SC, Shaw ML, Lancaster JE (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation of New Zealand potato cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19: 1-8.

Corbesier L, Prinsen E, Jacquard A, Lejeune P, Van Onckelen H, Périlleux C, Bernier G (2003) Cytokinin level in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* 54: 2511-2517.

Dan Y (2008) Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 44: 149-161.

Davidson MM, Takla MFG, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD, Conner AJ (2004) Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars with a *cry1Ac9* gene confers resistance to potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 32: 39-50.

Dean C, Jones J, Favreau M, Dunsmuir P, Bedbrook J (1988) Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Research* 16: 9267-9283.

Dermastia M, Ravnikar M, Kovač M (1996) Morphology of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Sante) stem node cultures in relation to the level of endogenous cytokinins. *Journal of Plant Growth Regulation* 15: 105-108.

Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: Abusing MAPK defense signaling. *Science* 318: 453-456.

Dobránszki J (2001) Effects of light on *in vitro* tuberization of the potato cultivar Désirée and its relatives. *Acta Biologica Hungarica* 52: 137-147.

Dobránszki J, Tábori KM (2010) Influence of nitrogen supply of potato plantlets on *in vitro* tuberization pattern under inductive and non-inductive conditions. *Potato Research* 53: 121-127.

Dobrev PI, Havlíček L, Vágner M, Malbeck J, Kamínek M (2005) Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1075: 159-166.

Dobrev PI, Kamínek M (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 950: 21-29.

Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A (2004) *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1*. *Genes and Development* 18: 926-936.

Donnelly DJ, Coleman WK, Coleman SE (2003) Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research* 80: 103-115.

Dragičević I, Konjević R, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Nešković M (2008) The effects of IAA and tetcyclacis on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot cultures *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 54: 189-193.

Dragičević I, Vinterhalter B, Konjević R (2004) Efekti 6-benzil aminopurina i tetciklacisa na proces tuberizacije kod krompira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) u uslovima *in vitro*. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 65: 69-76.

Duke C, Macleod J, Summons R, Letham D, Parker C (1978) The structure and synthesis of cytokinin metabolites. II. Lupinic acid and O- β -D-glucopyranosylzeatin from *Lupinus angustifolius*. *Australian Journal of Chemistry* 31: 1291-1301.

Dwivedi S, Vanková R, Motyka V, Herrera C, Zizkova E, Auer C (2010) Characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant *ror-1* (*roscovitine-resistant*) and its utilization in understanding of the role of cytokinin N-glucosylation pathway in plants. *Plant Growth Regulation* 61: 231-242.

Eklöf S, Ástot C, Blackwell J, Moritz T, Olsson O, Sandberg G (1997) Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology* 38: 225-235.

El-Kharbotly A, Jacobs JM, Hekkert BT, Stiekema WJ, Pereira A, Jacobsen E, Ramanna MS (1996) Localization of Ds-transposon containing T-DNA inserts in the diploid transgenic potato: linkage to the R1 resistance gene against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Genome* 39: 249-257.

Elmayan T, Vaucheret H (1996) Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal* 9: 787-797.

Faiss M, Zalubilová J, Strnad M, Schmülling T (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *The Plant Journal* 12: 401-415.

Fang Y, Spector DL (2010) Live cell imaging of plants. *Cold Spring Harbor Protocols* 2010; doi: 10.1101/pdb.top68.

FAO (2009) *International Year of the Potato 2008: New light on a hidden treasure (an end-of-year review)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim, Italija.

FAO (2012) web stranica <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> pretražena u decembru 2012.

Feng DS, Wang HG, Zhang XS, Kong LR, Tian JC, Li XF (2008) Using an inverse PCR method to clone the wheat cytokinin oxidase/dehydrogenase gene *TaCKX1*. *Plant Molecular Biology Reporter* 26: 143-155.

Fernie AR, Willmitzer L (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127: 1459-1465.

Fernie AR, Willmitzer L, Trethewey RN (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *TRENDS in Plant Science* 7: 35-41.

Finnegan J, McElroy D (1994) Transgene inactivation: Plants fight back! *Nature Biotechnology* 12: 883-888.

Fletcher PJ, Fletcher JD, Cross RJ (1998) Potato germplasm: *in vitro* storage and virus reduction. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 26: 249-252.

Fock I, Collonnier C, Luisetti J, Purwito A, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D (2001) Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 899-908.

Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D (2000) Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Science* 160: 165-176.

Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

Francis KE, Spiker S (2005) Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. *The Plant Journal* 41: 464-477.

Frébortová J, Fraaije MW, Galuszka P, Šebela M, Peč P, Hrbáč J, Novák O, Bilyeu KD, English JT, Frébort I (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* 380: 121-130.

Frébortová J, Galuszka P, Werner T, Schmülling T, Frébort I (2007) Functional expression and purification of cytokinin dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologia plantarum* 51: 673-682.

Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 2827-2840.

Gális I, Macas J, Vlasák J, Ondřej M, Van Onckelen HA (1995) The effect of an elevated cytokinin level using the *ipt* gene and N⁶-benzyladenine on single node and intact potato plant tuberization *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 143-150.

Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* 268: 450-461.

Galuszka P, Frébortová J, Werner T, Yamada M, Strnad M, Schmülling T, Frébort I (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: Cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry* 271: 3990-4002.

Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortová J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmülling T, Frébort I (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 255-267.

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: 437a-437g.

Gaudinová A, Dobrev PI, Šolcová B, Novák O, Strnad M, Friedecký D, Motyka V (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 188-200.

Geigenberger P, Stitt M, Fernie AR (2004) Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant, Cell and Environment* 27: 655-673.

Gelvin SB (1990) Crown gall disease and hairy root disease: A sledgehammer and a tackhammer. *Plant Physiology* 92: 281-285.

Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16-37.

Gepstein S, Horwitz BA (1995) The impact of *Arabidopsis* research on plant biotechnology. *Biotechnology Advances* 13: 403-414.

Goldstein DA, Tinland B, Gilbertson LA, Staub JM, Bannon GA, Goodman RE, McCoy RL, Silvanovich A (2005) Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. *Journal of Applied Microbiology* 99: 7-23.

Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18: 277-284.

González-Schain ND, Díaz-Mendoza M, Żurczak M, Suárez-López P (2012) Potato CONSTANS is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner. *The Plant Journal* 70: 678-690.

Gopal J, Iwama K, Jitsuyama Y (2008) Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 44: 221-228.

Grafius EJ, Douches DS (2008) The present and future role of insect-resistant genetically modified potato cultivars in IPM. In: Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG (eds): *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs*. Springer Science + Business Media B.V, Heidelberg, Nemačka, pp. 195-221.

Grefen C, Harter K (2004) Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* 219: 733-742.

Grüneberg W, Mwanga R, Andrade M, Espinoza J (2009) Selection methods. Part 5: Breeding clonally propagated crops. In: Ceccarelli S, Guimarães EP, Weltzien E (eds): *Plant Breeding and Farmer Participation*. FAO, Rim, Italija, pp. 275-322.

Gu R, Fu J, Guo S, Duan F, Wang Z, Mi G, Yuan L (2010) Comparative expression and phylogenetic analysis of maize cytokinin dehydrogenase/oxidase (CKX) gene family. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 428-440.

Guivarc'h A, Rembur J, Goetz M, Roitsch T, Noin M, Schmülling T, Chriqui D (2002) Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *Journal of Experimental Botany* 53: 621-629.

Guo JL, Yu CL, Fan CY, Lu QN, Yin JM, Zhang YF, Yang Q (2010) Cloning and characterization of a potato *TFL1* gene involved in tuberization regulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 103-109.

Gururani MA, Park SW (2012) Engineered resistance against filamentous pathogens in *Solanum tuberosum*. *Journal of General Plant Pathology* 78: 377-388.

Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ (2006) Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to Cells* 11: 1381-1392.

Hartmann A, Senning M, Hedden P, Sonnewald U, Sonnewald S (2011) Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin. *Plant Physiology* 155: 776-796.

Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schäfer E, Kudla J, Harter K (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 23: 3290-3302.

Hawkes JG (1990) *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.

Hawkes JG, Francisco-Ortega J (1993) The early history of the potato in Europe. *Euphytica* 70: 1-7.

Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal* 2: 987-995.

Hirose N, Makita N, Yamaya T, Sakakibara H (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* 138: 196-206.

Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59: 75-83.

Hollingworth RM, Bjeldanes LF, Bolger M, Kimber I, Meade BJ, Taylor SL, Wallace KB (2003) The safety of genetically modified foods produced through biotechnology. *Toxicological Sciences* 71: 2-8.

Houba-Hérin N, Pethe C, d'Alayer J, Laloue M (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal* 17: 615-626.

Huamán Z, Ortiz R, Zhang D, Rodríguez F (2000) Isozyme analysis of entire and core collections of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* potato cultivars. *Crop Science* 40: 273-276.

Hussey G, Stacey NJ (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany* 53: 565-578.

Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389.

Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke M, Matzke AJM (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *The Plant Cell* 9: 1251-1264.

Jackson SD (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* 119: 1-8.

Jackson SD (2009) Plant responses to photoperiod. *New Phytologist* 181: 517-531.

Jackson SD, James P, Prat S, Thomas B (1998) Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization. *Plant Physiology* 117: 29-32.

Jackson SD, Prat S (1996) Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiologia plantarum* 98: 407-412.

Jacobs JME, Van Eck HJ, Arens P, Verkerk-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastiaanssen HJM, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ (1995) A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 289-300.

Jacyn Baker C, Mock NM, Whitaker BD, Roberts DP, Rice CP, Deahl KL, Aver'yanov AA (2005) Involvement of acetosyringone in plant-pathogen recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328: 130-136.

James C (2012) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44*. ISAAA, Ithaca, NY, SAD.

Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology* 15: 1560-1565.

Jones B, Andresson-Gunnerås S, Petersson SV, Tarkowski P, Graham N, May S, Dolezal K, Sandberg G, Ljung K (2010) Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *The Plant Cell* 22: 2956-2969.

Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *The Plant Cell* 11: 2291-2301.

Joyce SM, Cassells AC (2002) Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 125-137.

Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* 42: 677-685.

Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11086-11091.

Kamínek M, Motyka V, Vaňková R (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia plantarum* 101: 689-700.

Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 14049-14054.

Kefi S, Pavlista AD, Meagher MM, Read PE (2000) Invertase activity as affected by cytokinin-like compounds during potato tuberization *in vitro*. *American Journal of Potato Research* 77: 57-61.

Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM (2004) Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics* 5: 285-291.

Koda Y (1997) Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia plantarum* 100: 639-646.

Koda Y, Kikuta Y, Tazaki H, Tsujino Y, Sakamura S, Yoshihara T (1991) Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* 30: 1435-1438.

Konstantinova TN, Aksenova NP, Golyanovskaya SA, Sergeeva LI (1999) Photoperiodic control of tuber formation in potato *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* *in vivo* and *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 763-766.

Kopečný D, Tarkowski P, Majira A, Bouchez-Mahiout I, Nogué F, Laurière M, Sandberg G, Laloue M, Houba-Hérin N (2006) Probing cytokinin homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by constitutively overexpressing two forms of the maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 gene. *Plant Science* 171: 114-122.

Kopertekh L, v. Saint Paul V, Krebs E, Schiemann J (2012) Utilization of PVX-Cre expression vector in potato. *Transgenic Research* 21: 645-654.

Kowalska M, Galuszka P, Frébortová J, Šebela M, Béres T, Hluska T, Šmehilová M, Bilyeu KD, Frébort I (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: Heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* 71: 1970-1978.

Kumar D, Wareing PF (1972) Factors controlling stolon development in the potato plant. *New Phytologist* 71: 639-648.

Kusnetsov V, Landsberger M, Meurer J, Oelmüller R (1999) The assembly of the CAAT-box binding complex at a photosynthesis gene promoter is regulated by light, cytokinin, and the stage of the plastids. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 36009-36014.

Kuta DD, Tripathi L (2005) *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology* 4: 752-757.

Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, Citovsky V (2006) A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *TRENDS in Genetics* 22: 29-37.

Lacroix B, Vaidya M, Tzfira T, Citovsky V (2005) The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation. *The EMBO Journal* 24: 428-437.

Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T, Bennett M (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell* 19: 3889-3900.

Lau OS, Deng XW (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 571-577.

Lawson EC, Weiss JD, Thomas PE, Kaniewski WK (2001) New Leaf Plus® Russet Burbank potatoes: replicase-mediated resistance to potato leafroll virus. *Molecular Breeding* 7: 1-12.

Lee DJ, Park JY, Ku SJ, Ha YM, Kim S, Kim MD, Oh MH, Kim J (2007) Genome-wide expression profiling of *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7* (*ARR7*) overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 115-137.

Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng XW (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *The Plant Cell* 19: 731-749.

Letham DS (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* 8: 569-573.

Letham DS (1994) Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: Mok DWS, Mok MC (eds): *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, FL, SAD, pp. 57-80.

Letham DS, Zhang R (1989) Cytokinin translocation and metabolism in lupin species II. New nucleotide metabolites of cytokinin. *Plant Science* 64: 161-165.

Li G, Liu K, Baldwin SA, Wang D (2003) Equilibrated nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 35732-35742.

Li Z, Jayasankar S, Gray DJ (2001) Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science* 160: 877-887.

Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *The Plant Cell* 5: 1749-1759.

Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 18: 100-127.

Liu J, Mehdi S, Topping J, Tarkowski P, Lindsey K (2010) Modelling and experimental analysis of hormonal crosstalk in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* 6: Article number 373.

Lizarraga R, Huaman Z, Dodds JH (1989) *In vitro* conservation of potato germplasm at the International Potato Center. *American Potato Journal* 66: 253-269.

Lozoya-Saldaña H, Abelló JF, de la R. García G (1996) Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *American Potato Journal* 73: 149-154.

Lozoya-Saldaña H, Madrigal-Vargas A (1985) Kinetin, thermotherapy, and tissue culture to eliminate potato virus (PVX) in potato. *American Potato Journal* 62: 339-345.

Lozoya-Saldaña H, Merlin-Lara O (1984) Thermotherapy and tissue culture for elimination of potato virus X (PVX) in Mexican potato cultivars resistant to late blight. *American Potato Journal* 61: 735-739.

Macháčková I, Sergeeva L, Ondřej M, Zaltsman O, Konstantinova T, Eder J, Ovesná J, Golyanovskaya S, Rakitin Y, Aksenova N (1997) Growth pattern, tuber formation and hormonal balance in *in vitro* potato plants carrying *ipt* gene. *Plant Growth Regulation* 21: 27-36.

Mahajan A, Bhogale S, Kang IH, Hannapel DJ, Banerjee AK (2012) The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Molecular Biology* 79: 595-608.

Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* 311: 94-98.

Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development* 14: 2938-2943.

Malito E, Coda A, Bilyeu KD, Fraaije MW, Mattevi A (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* 341: 1237-1249.

Malkawi A, Jensen BL, Langille AR (2007) Plant hormones isolated from "Katahdin" potato plant tissues and the influence of photoperiod and temperature on their levels in relation to tuber induction. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 308-317.

Martin A, Adam H, Díaz-Mendoza M, Żurczak M, González-Schain ND, Suárez-López P (2009) Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*. *Development* 136: 2873-2881.

Martínez-García JF, García-Martínez JL, Bou J, Prat S (2001) The interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 377-386.

Martínez-García JF, Virgós-Soler A, Prat S (2002) Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene *CONSTANS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 15211-15216.

Matzke MA, Matzke AJM (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiology* 107: 679-685.

Matzke MA, Matzke AJM (1998) Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 94-103.

Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Crameri A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO Journal* 10: 697-704.

McClung CR (2006) Plant circadian rhythms. *The Plant Cell* 18: 792-803.

McCullen CA, Binns AN (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 101-127.

McGrady JJ, Struik PC, Ewing EE (1986) Effects of exogenous application of cytokinin on the development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings. *Potato Research* 29: 191-205.

Mette MF, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM (1999) Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters *in trans*. *The EMBO Journal* 18: 241-248.

Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62: 3713-3725.

Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107: 193-232.

Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society* 78: 1375-1380.

Mira-Rodado V, Sweere U, Grefen C, Kunkel T, Fejes E, Nagy F, Schäfer E, Harter K (2007) Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58: 2595-2607.

Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 37: 128-138.

Mlynárová L, Loonen A, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ, Nap JP (1994) Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *The Plant Cell* 6: 417-426.

Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118.

Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255: 328-333.

Morris WL, Ducreux LJM, Hedden P, Millam S, Taylor MA (2006) Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *Journal of Experimental Botany* 57: 3007-3018.

Motyka V, Vaňková R, Čapková V, Petrášek J, Kamínek M, Schmülling T (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia plantarum* 117: 11-21.

Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *The EMBO Journal* 11: 1229-1238.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4326.

Muthoni J, Shimelis H, Melis R, Kabira J (2012) Reproductive biology and early generation's selection in conventional potato breeding. *Australian Journal of Crop Science* 6: 488-497.

Navarro C, Abelenda JA, Cruz-Oró E, Cuéllar CA, Tamaki S, Silva J, Shimamoto K, Prat S (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* 478: 119-122.

Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports* 31: 597-620.

Neuhuber F, Park YD, Matzke AJM, Matzke MA (1994) Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Molecular Genetics and Genomics* 244: 230-241.

Newell CA (2000) Plant transformation technology: Developments and applications. *Molecular Biotechnology* 16: 53-65.

Nieminen K, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, Bhalerao R, Keinonen K, Albert VA, Helariutta Y (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20032-20037.

Ninković S, Miljuš-Djukić J, Vinterhalter B, Vinterhalter D (1999) Effect of *ipt* gene on the growth pattern of potato shoot cultures. *Archives of Biological Sciences* 51: 3P-4P.

Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmülling T, Tran LSP (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell* 23: 2169-2183.

Nooden LD, Letham DS (1993) Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 639-653.

Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Dolezal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8039-8044.

Obata-Sasamoto H, Suzuki H (1979) Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiologia plantarum* 45: 320-324.

Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G (2009) Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 403-419.

Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal* 16: 4738-4745.

Parkinson JS (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73: 857-871.

Pelacho AM, Mingo-Castel AM (1991) Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiology* 97: 1253-1255.

Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, Fischhoff DA (1993) Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology* 22: 313-321.

Pernisová M, Klíma P, Horák J, Válková M, Malbeck J, Souček P, Reichman P, Hoyerová K, Dubová J, Friml J, Zažímalová E, Hejátko J (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 3609-3614.

Perrot-Rechenmann C (2010) Cellular responses to auxin: Division versus expansion. *Cold Springs Harbor Perspectives in Biology* 2010;2:a001446.

Pitzschke A, Hirt H (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* 29: 1021-1032.

Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 421-426.

Plasterk RHA, Ketting RF (2000) The silence of the genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 562-567.

Popelková H, Fraaije MW, Novák O, Frébortová J, Bilyeu KD, Frébort I (2006) Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochemical Journal* 398: 113-124.

Popelková H, Galuszka P, Frébortová J, Bilyeu KD, Frébort I (2004) Cytokinin dehydrogenase: Characterization and structure homology modeling of the flavoprotein catabolizing plant hormones cytokinins. In: Pandalai SG (ed): *Recent Research Developments in Proteins*, vol. 2. Transworld Research Network, Kerala, Indija, pp. 63-81.

Potato Genome Sequencing Consortium (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189-195.

Potter R, Jones MGK (1991) An assessment of genetic stability of potato *in vitro* by molecular and phenotypic analysis. *Plant Science* 76: 239-248.

Prat S (2010) Hormonal and daylength control of potato tuberization. In: Davies PJ (ed): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer Science + Business Media B.V, Heidelberg, Nemačka, pp. 574-596.

Pribylova R, Pavlik I, Bartos M (2006) Genetically modified potato plants in nutrition and prevention of diseases in humans and animals: a review. *Veterinarni medicina* 51: 212-223.

Proels RK, Roitsch T (2009) Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60: 1555-1567.

Pruski K (2007) The canon of potato science: 22. *In vitro* multiplication through nodal cuttings. *Potato Research* 50: 293-296.

Raíces M, Chico JM, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM (2001) Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Molecular Biology* 46: 591-601.

Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T, Riazuddin S (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* 27: 753-763.

Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132: 1998-2011.

Rashotte AM, Chae HS, Maxwell BB, Kieber JJ (2005) The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia plantarum* 123: 184-194.

Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11081-11085.

Rayle DL, Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.

Redman JC, Haas BJ, Tanimoto G, Town CD (2004) Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *The Plant Journal* 38: 545-561.

Reeve RM, Hautala E, Weaver ML (1969) Anatomy and compositional variation within potatoes. *American Potato Journal* 46: 361-373.

Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqumard A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544.

Rodríguez F, Ghislain M, Clausen AM, Jansky SH, Spooner DM (2010) Hybrid origins of cultivated potatoes. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1187-1198.

Rodríguez-Falcón M, Bou J, Prat S (2006) Seasonal control of tuberization in potato: Conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology* 57: 151-180.

Roitsch T, Ehneß R (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359-367.

Romanov GA, Aksenova NP, Konstantinova TN, Golyanovskaya SA, Kossmann J, Willmitzer L (2000) Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 32: 245-251.

Romanov GA, Konstantinova TN, Sergeeva LI, Golyanovskaya SA, Kossmann J, Willmitzer L, Schmülling T, Aksenova NP (1998) Morphology and tuber formation of *in-vitro*-grown potato plants harboring the yeast invertase gene and/or the *rolC* gene. *Plant Cell Reports* 18: 318-324.

Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *The Plant Journal* 18: 557-563.

Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449.

Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamiya Y, Yamaya T, Yamaguchi T (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9972-9977.

Salanoubat M, Belliard G (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene* 84: 181-185.

Salomé PA, To JPC, Kieber JJ, Robertson McClung C (2006) *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *The Plant Cell* 18: 55-69.

Sarkar D (2008) The signal transduction pathways controlling *in planta* tuberization in potato: an emerging synthesis. *Plant Cell Reports* 27: 1-8.

Sarkar D (2010) Photoperiodic inhibition of potato tuberization: an update. *Plant Growth Regulation* 62: 117-125.

Sarkar D, Pandey SK, Sharma S (2006) Cytokinins antagonize the jasmonates action on the regulation of potato (*Solanum tuberosum*) tuber formation *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 285-295.

Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 116: 241-252.

Schrammeijer B, Beijersbergen A, Idler KB, Melchers LS, Thompson DV, Hooykaas PJJ (2000) Sequence analysis of the *vir*-region from *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Journal of Experimental Botany* 51: 1167-1169.

Schrammeijer B, Risseeuw E, Pansegrau W, Regensburg-Tuink TJG, Crosby WL, Hooykaas PJJ (2001) Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Current Biology* 11: 258-262.

Seabrook JEA (2005) Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review. *American Journal of Potato Research* 82: 353-367.

Seabrook JEA, Douglass LK, Arnold DA (2004) Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cuttings *in vitro*. *American Journal of Potato Research* 81: 1-5.

Sergeeva LI, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Navratil O, Vreugdenhil D (2000) Tuber morphology and starch accumulation are independent phenomena: evidence from *ipt*-transgenic potato lines. *Physiologia plantarum* 108: 435-443.

Sharma SK, Bryan GJ, Winfield MO, Millam S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226: 1449-1458.

Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology* 69: 429-435.

Singer SD, Liu Z, Cox KD (2012) Minimizing the unpredictability of transgene expression in plants: the role of genetic insulators. *Plant Cell Reports* 31: 13-25.

Skoog F, Miller CO (1965) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: Bell E (ed): *Molecular and Cellular Aspects of Development*. Harper and Row, New York, NY, SAD, pp. 481-494.

Sleper DA, Poehlman JM (2006) *Breeding Field Crops, 5th Edition*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, SAD.

Smulders MJM, de Klerk GJ (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 63: 137-146.

Sohn HB, Lee HY, Seo JS, Jung C, Jeon JH, Kim JH, Lee YW, Lee JS, Cheong JJ, Choi YD (2011) Overexpression of jasmonic acid carboxyl methyltransferase increases tuber yield and size in transgenic potato. *Plant Biotechnology Reports* 5: 27-34.

Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001) Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86: 17-35.

Spooner DM, Hijmans RJ (2001) Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research* 78: 237-268.

Spooner DM, McLean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ (2005) A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14694-14699.

Stachel SE, Nester EW (1986) The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* 5: 1445-1454.

Stam M, Mol JNM, Kooter JM (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany* 79: 3-12.

Stam M, Viterbo A, Mol JNM, Kooter JM (1998) Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. *Molecular and Cellular Biology* 18: 6165-6177.

Steward FC, Caplin SM (1951) A tissue culture from potato tuber: the synergistic action of 2,4-D and of coconut milk. *Science* 113: 518-520.

Stirk WA, Václavíková K, Novák O, Gajdošová S, Kotland O, Motyka V, Strnad M, van Staden J (2012) Involvement of *cis*-zeatin, dihydrozeatin, and aromatic cytokinins in germination and seedling establishment of maize, oats, and lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 392-405.

Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia plantarum* 101: 674-688.

Struik PC, Askew MF, Sonnino A, Mackerron DKL, Bång U, Ritter E, Statham OJH, Kirkman MA, Umaerus V (1997) Forty years of potato research: highlights, achievements and prospects. *Potato Research* 40: 5-18.

Struik PC, Geertsema J, Custers CHMG (1989) Effects of shoot, root and stolon temperature on the development of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant. III. Development of tubers. *Potato Research* 32: 151-158.

Struik PC, Vreugdenhil D, Haverkort AJ, Bus CB, Dankert R (1991) Possible mechanisms of size hierarchy among tubers on one stem of a potato (*Solanum tuberosum* L.) plant. *Potato Research* 34: 187-203.

Su W, Howell SH (1995) The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. *Plant Physiology* 108: 1423-1430.

Sunilkumar G, Mohr LA, Lopata-Finch E, Emani C, Rathore KS (2002) Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology* 50: 463-474.

Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schafer E, Harter K (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294: 1108-1111.

Šimko I (1994) Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. *Journal of Plant Growth Regulation* 13: 73-77.

Šmehilová M, Galuszka P, Bilyeu KD, Jaworek P, Kowalska M, Šebela M, Sedlářová M, English JT, Frébort I (2009) Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany* 60: 2701-2712.

Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T (2004) Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45: 28-39.

Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* 42: 85-93.

Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H (2004a) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 45: 1053-1062.

Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004b) *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 41866-41872.

Tanaka K, Fujiwara K, Kozai T (1992) Effects of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*. *Acta Horticulturae* 319: 59-64.

Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal* 45: 1028-1036.

Tao GQ, Letham DS, Yong JWH, Zhang K, John PCL, Schwartz O, Wong SC, Farquhar GD (2010) Promotion of shoot development and tuberisation in potato by expression of a chimaeric cytokinin synthesis gene at normal and elevated CO₂ levels. *Functional Plant Biology* 37: 43-54.

Tarkowská D, Doležal K, Tarkowski P, Ástot C, Holub J, Fuksová K, Schmülling T, Sandberg G, Strnad M (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia plantarum* 117: 579-590.

Taylor SL, Hefle SL (2001) Will genetically modified foods be allergenic? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 765-771.

Thiele A, Herold M, Lenk I, Quail PH, Gatz C (1999) Heterologous expression of *Arabidopsis* phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiology* 120: 73-81.

Tinland B, Schoumacher F, Gloeckler V, Bravo-Angel AM, Hohn B (1995) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *The EMBO Journal* 14: 3585-3595.

To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell* 19: 3901-3914.

To JPC, Kieber JJ (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *TRENDS in Plant Science* 13: 85-92.

van Enckevort LJG, Bergervoet JEM, Stiekema WJ, Pereira A, Jacobsen E (2000) Selection of independent *Ds* transposon insertions in somatic tissue of potato by protoplast regeneration. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 503-510.

van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens AWM, van der Plas LHW, van der Krol AR (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 949-959.

Vandenbussche F, Habricot Y, Condiff AS, Maldiney R, Van Der Straeten D, Ahmad M (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 49: 428-441.

Veitch YK, Martin RC, Mok DWS, Malbeck J, Vankova R, Mok MC (2003) O-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* 131: 1374-1380.

Vergunst AC, van Lier MCM, den Dulk-Ras A, Grosse Stüve TA, Ouwehand A, Hooykaas PJJ (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 832-837.

Verma C, Nanda S, Singh RK, Singh RB, Mishra S (2011) A review on impacts of genetically modified food on human health. *The Open Nutraceuticals Journal* 4: 3-11.

Vinterhalter D, Zdravković-Korać S, Mitić N, Dragičević I, Cingel A, Raspor M, Ninković S (2008) Protocols for *Agrobacterium*-mediated transformation of potato. In: Benkeblia N, Tennant P (eds): *Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, vol 2 (Special Issue 1)*. Global Science Books, Kagawa University, Japan, pp. 1-15.

Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *The Plant Cell* 13: 385-398.

Visser RGF, Jacobsen E, Hesselting-Meinders A, Schans MJ, Witholt B, Feenstra WJ (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology* 12: 329-337.

Visser RGF, Vreugdenhil D, Hendriks T, Jacobsen E (1994) Gene expression and carbohydrate content during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Physiologia plantarum* 90: 285-292.

Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-187.

von Schwartzberg K, Fernández-Núñez M, Blaschke H, Dobrev PI, Novák O, Motyka V, Strnad M (2007) Cytokinin in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology* 145: 786-800.

Vreugdenhil D, Struik PC (1989) An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia plantarum* 75: 525-531.

Vysotskaya LB, Aval'baev AM, Yuldashev RA, Shakirova FM, Veselov SY, Kudoyarova GR (2010) Regulation of cytokinin oxidase activity as a factor affecting the content of cytokinins. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 494-500.

Wang Y, Luo JP, Wei ZJ, Zhang JC (2009) Molecular cloning and expression analysis of a cytokinin oxidase (*DhCKX*) gene in *Dendrobium huoshanense*. *Molecular Biology Reports* 36: 1331-1338.

Webb KJ, Osifo EO, Henshaw GG (1983) Shoot regeneration from leaflet discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Plant Science Letters* 30: 1-8.

Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, SAD.

Werner T, Holst K, Pörs Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, Schmülling T (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* 59: 2659-2672.

Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* 8: 371-381.

Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* 15: 2532-2550.

Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10487-10492.

Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681-692.

Wolf S, Kalman-Rotem N, Yakir D, Ziv M (1998) Autotrophic and heterotrophic carbon assimilation of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Journal of Plant Physiology* 153: 574-580.

Xu X, van Lammeren AAM, Vermeer E, Vreugdenhil D (1998a) The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiology* 117: 575-584.

Xu X, Vreugdenhil D, van Lammeren AAM (1998b) Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany* 49: 573-582.

Yakovleva LA, Cheredova EP, Karavaiko NN (1997) Cytokinins and cytokinin-binding sites in transgenic potato plants. *Plant Growth Regulation* 21: 71-73.

Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N (2005) *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology* 15: 1566-1571.

Yang SH, Yu H, Goh CJ (2002) Isolation and characterization of the orchid cytokinin oxidase *DSCX1* promoter. *Journal of Experimental Botany* 53: 1899-1907.

Yang SH, Yu H, Goh CJ (2003) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Molecular Biology* 51: 237-248.

Yanovsky MJ, Izaguirre M, Wagmaister JA, Gatz C, Jackson SD, Thomas B, Casal JJ (2000) Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *The Plant Journal* 23: 223-232.

Yu F, Utsumi R (2009) Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 3043-3052.

Yuldashev R, Avalbaev A, Bezrukova M, Vysotskaya L, Khripach V, Shakirova F (2012) Cytokinin oxidase is involved in the regulation of cytokinin content by 24-epibrassinolide in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 55: 1-6.

Zalewski W, Galuszka P, Gasparis S, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2010) Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany* 61: 1839-1851.

Zhang L, Zhao YL, Gao LF, Zhao GY, Zhou RH, Zhang BS, Jia JZ (2012) *TaCKX6-D1*, the ortholog of rice *OsCKX2*, is associated with grain weight in hexaploid wheat. *New Phytologist* 195: 574-584.

Zheng B, Deng Y, Mu J, Ji Z, Xiang T, Niu QW, Chua NH, Zuo J (2006) Cytokinin affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and *Arabidopsis* response regulator 4-dependent manner. *Physiologia plantarum* 127: 277-292.

Zheng X, Deng W, Luo K, Duan H, Chen Y, McAvoy R, Song S, Pei Y, Li Y (2007) The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Reports* 26: 1195-1203.

Zhou X, Sun Y, Cao G, Li W, Lin R (1994) A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. In: Javornik B, Bohanec B, Kreft I (eds): *Proceedings of the international colloquim on impact of plant biotechnology on agriculture*. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenija, pp. 171-175.

Ziemienowicz A, Görlich D, Lanka E, Hohn B, Rossi L (1999) Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 3729-3733.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749-760.

Zupan JR, Citovsky V, Zambryski P (1996) *Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 2392-2397.

BIOGRAFIJA AUTORA

Martin Raspor je rođen 1. jula 1978. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je 1997. godine na studijskoj grupi *Molekularna biologija i fiziologija*, gde je diplomirao u julu 2005. godine. Doktorske studije upisao je 2006. godine na istom fakultetu u okviru studijskog programa *Fiziologija i molekularna biologija biljaka*. Od januara 2007. godine zaposlen je kao *istraživač pripravnik* u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", gde je u julu 2009. godine izabran u zvanje *istraživač saradnik*. U toku svog naučno-istraživačkog rada bio je zaposlen na projektima "Regulacija morfo-genetskih procesa i sekundarnog metabolizma i genetičke transformacije biljaka u kulturi *in vitro*" (br. 143026B, u periodu od 2007–2010) i "Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste" (br. ON173015, u periodu od 2011. do danas), finansiranim od strane ministarstva Republike Srbije nadležnog za nauku. Od naučnih udruženja, Martin Raspor je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани _____ Мартин Распор _____

број уписа _____ ЕА060008 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Физиолошки и морфолошки ефекти експресије *AtCKX* гена у трансформисаним биљкама кромпира (*Solanum tuberosum* L.) гајеним *in vitro*

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 19. 04. 2013. _____

Мартин Распор

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Мартин Распор _____

Број уписа _____ EA060008 _____

Студијски програм _____ Физиологија и молекуларна биологија биљака _____

Наслов рада _____ Физиолошки и морфолошки ефекти експресије *AtCKX* гена у трансформисаним биљкама кромпира (*Solanum tuberosum* L.) гајеним *in vitro*

Ментор _____ др Славица Нинковић _____

Потписани _____ Мартин Распор _____


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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 19. 04. 2013. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Физиолошки и морфолошки ефекти експресије *AtCKX* гена у трансформисаним биљкама кромпира (*Solanum tuberosum* L.) гајеним *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

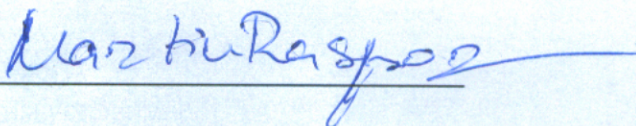
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

① Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, _____ 19. 04. 2013.



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

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

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

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

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

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