

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Savić

**EKSPRESIJA GENA ZA INHIBITOR  
SERINSKIH PROTEINAZA (*BvSTI*)  
ŠEĆERNE REPE (*Beta vulgaris* L.)  
I ULOGA U OTPORNOSTI NA INSEKTE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena M. Savić

**EXPRESSION OF SUGAR BEET  
(*Beta vulgaris* L.) SERINE PROTEINASE  
INHIBITOR GENE (*BvSTI*) AND THE  
ROLE IN INSECT RESISTANCE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentori:

**Naučni savetnik dr Slavica Ninković**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

---

**Vanredni profesor dr Svetlana Radović**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

---

Član komisije:

**dr Ann Smigocki**

United States Department of Agriculture

Agricultural Research Service

Beltsville Agricultural Research Center

Molecular Plant Pathology Laboratory

---

Datum odbrane:

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za molekularnu patologiju biljaka, Ministarstva za poljoprivredu Sjedinjenih Američkih Država u Beltsville-u, Maryland.*

*Zahvaljujem svom mentoru dr Slavici Ninković na poverenju i ukazanoj prilici da učestvujem u ovim izuzetnim istraživanjima. Njena stručna pomoć i korisni saveti bili su mi od neprocenjive vrednosti tokom svih faza izrade disertacije.*

*Srdačno hvala i prof. Svetlani Radović na izuzetno korisnim savetima i sugestijama kojima mi je pomogla da na pravi način uobličim ovu disertaciju.*

*\* Želela bih da izrazim posebnu zahvalnost dr Ann Smigocki na izuzetnoj inspiraciji koju mi je podarila. Njene ideje tokom planiranja, kao i konstruktivne sugestije tokom izvođenja eksperimenata, neprocenljivo su iskustvo. Posebno sam joj zahvalna na prenesenom znanju, ali i srdačnoj gostoljubivosti i vremenu koje mi je nesebično posvetila tokom mog boravka u njenoj laboratoriji.*

*Svom šefu, dr Branki Vinterhalter, dugujem veliku zahvalnost na svim korisnim sugestijama i pomoći pri pisanju ove disertacije. Izuzetno joj hvala i na strpljenju i nesebičnoj podršci tokom svih godina zajedničke saradnje.*

*\*\* Posebno sam zahvalna studentima Elizabeth Mongeon i Anna Nemchinova, na izuzetnoj pomoći koju su mi pružile prilikom izvođenja eksperimenata u laboratorijama ARS-USDA, ali i na vedrini kojom su zračile i optimizmu kojim su me zasipale.*

*mr Aleksandru Cingelu dugujem zahvalnosti na nesebičnoj pomoći pri pisanju i uvek zanimljivim diskusijama koje su na činjenice ponekad bacale potpuno drugačiju svetlost.*

*Kolegama Tatjani Ćosić i Martinu Rasporu zahvaljujem na pomoći pri uobličavanju rezultata RT-PCR analiza.*

*Hvala i svim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka na izuzetnoj kolegijalnosti, srdačnosti i uvek rado pruženoj pomoći u svakodnevnom radu.*

*Večno sam zahvalna i porodici Haymes, Ceci, Kenu i Lari, našim dragim prijateljima, koji su sa nama bili i u dobrim, ali i u teškim trenucima kada smo bili daleko od kuće.*

*Mojim roditeljima, Milanu i Mileni, kao i sestri Slađani i njenoj porodici, beskrajno hvala na bezuslovnoj podršci i bezgraničnom poverenju koje su mi tokom čitavog života pružali.*

*Ovu disertaciju posvećujem svojoj ćerki Dunji i mužu Marku, kao izraz najdublje zahvalnosti za svu ljubav i razumevanje koje mi pružate u svakom trenutku. Vi ste moja inspiracija i neiscrpan izvor snage.*

*\* I would like to express my great appreciation to dr Ann Smigocki for the extraordinary inspiration she gave to me. Her ideas during the planning, and constructive suggestions during the conducting of this research were an inestimable experience. I am particularly grateful for all knowledge I got from her, but also for the warm hospitality and time she was always ready to share with me so generously during my stay in her lab.*

*\*\* I wish to particularly acknowledge to students Elizabeth Mongeon and Anna Nemchinova for all the given help, as well as for the overwhelming cheerfulness and optimism.*

## **Ekspresija gena za inhibitor serinskih proteinaza (*BvSTI*) šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) i uloga u otpornosti na insekte**

### **REZIME**

Biljni inhibitori proteinaza aktivno učestvuju u odbrani biljaka od insekata štetočina inhibirajući insekatske digestivne proteinaze. *In planta* analiza ekspresije *BvSTI* gena koji kodira inhibitora serinskih proteinaza urađena je sa ciljem otkrivanja uloge ovog inhibitora u otpornosti biljaka šećerne repe na insekte, kao i radi utvrđivanja potencijala ovog gena kao pogodnog kandidat-gena koji bi se biotehnoškim metodama mogao uvesti u osetljive biljne genome, čime bi se povećala njihova otpornost prema insektima štetočinama. Ekspresija *BvSTI* gena praćena je kod tri genotipa šećerne repe koji se odlikuju umerenom otpornošću prema larvama štetočine korena *Tetanops myopaeformis* Roder, F1016, F1015 i UT-8, kao i kod jednog osetljivog genotipa, F1010. Kod svih otpornih genotipova mehaničko povređivanje indukovalo je ekspresiju ovog gena, a nivo transkripcije bio je povišen u poređenju sa nivoom kod osetljivog genotipa. Najintenzivniji odgovor na povređivanje zabeležen je kod otpornih genotipova F1016 i UT-8. U listovima osetljivog F1010, ali i trećeg otpornog genotipa F1015, registrovan je samo neznatni porast u intenzitetu *BvSTI* transkripcije, dok je u korenovima ova dva genotipa mehaničko povređivanje dovelo do blage početne supresije u aktivnosti *BvSTI* gena. Akumulacija *BvSTI* transkripata u listovima i korenovima otpornog F1016 i osetljivog F1010 kojima su se hranile larve *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith pokazala je sličan obrazac ekspresije kod oba genotipa. U poređenju sa transkripcionim obrascima dobijenim nakon mehanilčkog povređivanja, ishrana insekata dovela je do znatno sporije indukcije i slabijeg intenziteta transkripcije. Analize na proteinskom nivou pokazale su da nakon povređivanja listova dolazi do akumulacije proteina veličine 30 kDa za koji su se vezala poliklonalna *BvSTI* specifična antitela kako kod otpornog F1016, tako i kod osetljivog F1010 genotipa. Aktivnost *BvSTI* inhibitora protiv tripsina pokazana je kod F1016 korenova i listova, kao i kod F1010 listova. U F1010 korenovima aktivnost *BvSTI* inhibitora nije detektovana.

U biotestu u kome je ispitivana otpornost pojedinačnih genotipova na larve *S. frugiperda* korišćena su sva četiri genotipa šećerne repe kod kojih je pokazano da povređivanje utiče na ekspresiju *BvSTI* gena. Larve koje su se hranile listovima sva tri otporna genotipa bile su statistički značajno lakše od larvi koje su hranile osetljivim F1010 listovima. Prelaskom

larvi u stadijum lutke statistički značajne razlike u masi mađu larvama koje su se hranile listovima različitih genotipova su se izgubile i sve lutke su bile sličnih masa. Larve koje su se hranile korenovima šećerne repe bile su u proseku dvostruko lakše od larvi sa listova, a lutke koje su se razvile iz njih osim što su bile značajno lakše bile su i obavijene hitinskim omotačem znatno svetlije boje. U nekoliko slučajeva zabeležene su i morfološke abnormalnosti kod lutki razvijenih iz larvi koje su se hranile rezistentnim sa F1016 i F1015 listovima.

Obrazac indukcije promotorskog regiona *BvSTI* gena praćen je u transgenim biljkama duvana kod kojih se pod kontrolom ovog promotora nalazio reporter GUS gen. Kod mladih *in vitro* gajenih biljaka nezavisno razvijenih T2 linija duvana ekspresija GUS gena bila je više konstitutivna. S druge strane, kod starijih biljaka gajenih u staklari mehaničko povređivanje, kao i povređivanje nastalo ishranom *S. frugiperda* larvi, indukovali su lokalizovanu ekspresiju GUS gena samo na mestu povređivanja u listovima i korenovima.

Pokazana korelacija između stepena otpornosti genotipova šećerne repe i nivoa ekspesije *BvSTI* gena upućuje na zaključak da je ovaj gen učestvuje u mehanizmima odbrane protiv herbivornih insekata, te se smatra da može biti korišćen u biotehnološkim procesima unapređivanja otpornosti na insekte kod biljaka. Takođe, promotorski region *BvSTI* gena pokazao je inducibilnu prirodu ekspresije i može biti pogodan za kontrolisanu ekspresiju transgena u listovima i korenovima biljaka kao prva linija odbrane od insekata štetočina.

**Ključne reči:** Otpornost prema insektima; Inhibitor serinskih proteinaza; *BvSTI* gen; Šećerna repa; Inducibilni genski promotori; transgeni duvan; *Spodoptera frugiperda*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK brojevi :** 577.21:633.63(043.3)

632.7:633.63(043.3)

## **Expression of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) serine proteinase inhibitor gene (*BvSTI*) and the role in insect resistance**

### **ABSTRACT**

Plant proteinase inhibitor genes are among the prime candidates suitable for insect resistance improvement in plants. Expression pattern of a sugar beet serine proteinase inhibitor gene, *BvSTI*, was characterized in response to mechanical and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) induced wounding. *BvSTI* expression was analyzed in three breeding lines moderately resistant to sugar beet root maggot (*Tetanops myopaeformis* Roder.) and in a susceptible line, F1010. Increased mechanical wounding induced levels of *BvSTI* expression were observed in all resistant lines as compared to F1010. The most intensive response to wounding was observed in resistant lines, F1016 and UT-8, with a maximum up to 4- and 2,5-fold increase of *BvSTI* transcript levels over non-wounded roots and leaves, respectively. In contrast, slight increase of *BvSTI* transcript levels in leaves and even an initial decrease in roots were observed in sensitive F1010, but also in the third resistant line, F1015. *BvSTI* transcript accumulation in F1016 and F1010 tissues wounded by FAW showed a similar gene expression pattern, but it was delayed and less intense than the response incited by abiotic wounding. On the protein level, BvSTI-specific polyclonal antibodies confirmed increased accumulation of the 30 kDa BvSTI protein in wounded leaves but not in roots of F1016 and F1010. Using trypsin inhibition assays, the activity of BvSTI was confirmed in F1016 roots and leaves and F1010 leaves. In F1010 roots BvSTI activity was completely lacking.

To confirm the potential role of the *BvSTI* gene in defending mechanisms to insect pests in sugar beet the same analyzed germplasm were bioassayed for resistance to fall armyworm insects. Larvae fed sugar beet leaves from all three resistant germplasms (F1016, F1015 and UT-8) had significant reductions in larval weights as compared to larvae fed on sensitive F1010 leaves. The observed daily weight increase was also the highest in larvae from sensitive vs. resistant leaves. As the larvae entered the pupal stage, pupal sizes did not reflect the overall larval weights and all developed pupae were similar. Larvae fed on roots were almost double lighter than larvae from leaves for all analyzed gemplasms. Some developmental abnormalities of the pupae fed on F1016 and F1015 leaves were noted.

Since identification of gene promoters that are specifically activated in response to wounding or pest attack will facilitate regulated transgene expression in plants, we examined the induction pattern of a sugar beet promoter derived from the *BvSTI* proteinase inhibitor gene. *BvSTI* promoter was previously fused to the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene and transferred to *Nicotiana benthamiana* plants. GUS activity driven by *BvSTI* promoter was evaluated in independently derived *BvSTI* transgenic tobacco T2 homozygous progeny. Mechanical wounding and fall armyworm larval feeding induced GUS gene expression in tobacco leaves and roots that was localized at the wound site in mature tobacco tissues.

Based on our results we can conclude that *BvSTI* gene expression was wound induced in the insect resistant germplasm suggesting that this gene can be used in biotechnological approaches or in breeding programs for improving insect resistance. Observation of GUS gene activity at the wound site in transgenic tobacco indicates that the *BvSTI* promoter is inducible in these tissues and, therefore, should prove useful for expressing resistance transgenes in leaves and roots as a first line of defense against plant pests and pathogens.

**Keywords:** Insect resistance; Serine proteinase inhibitor; *BvSTI* gene; Sugar beet; Inducible gene promoters; transgenic tobacco; *Spodoptera frugiperda*

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC numbers:** 577.21:633.63(043.3)

632.7:633.63(043.3)



# SADRŽAJ

	strana
<b>SKRAĆENICE</b>	
<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Mehanizmi odbrane biljaka od herbivornih insekata	2
1.1.1. Konstitutivna odbrana biljaka	3
1.1.2. Indukovana odbrana biljaka	4
1.1.3. Biljni insekticidni agensi	5
1.2. Biljni inhibitori proteinaza	6
1.2.1. Osnovne karakteristike IP	7
1.2.2. Podela i klasifikacija biljnih IP	9
1.2.3. Fiziološka uloga i mehanizmi delovanja IP	11
1.3. Biotehnologija u funkciji borbe protiv insekata štetočina	17
1.3.1. IP kao bioinsekticidni transgeni	21
1.3.2. Uloga promotora u heterolognoj ekspresiji IP	25
1.4. Šećerna repa	30
1.4.1. Osnovne karakteristike šećerne repe	30
1.4.2. Insekti štetočine šećerne repe	33
1.5. Inhibitor serinskih proteinaza šećerne repe – <i>BvSTI</i>	34
<b>2. CILJEVI RADA</b>	40
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	41
3.1. Praćenje ekspresije <i>BvSTI</i> gena i akumulacije i aktivnosti <i>BvSTI</i> proteinaznog inhibitora u različitim genotipovima šećerne repe	41
3.1.1. Biljni materijal	41
3.1.2. Mehaničko povređivanje tkiva šećerne repe	42
3.1.3. Povređivanje tkiva šećerne repe insektima	43
3.1.4. Izolacija RNK	43

3.1.5. Reverzna transkripcija ukupnih RNK i reakcija lančanog umnožavanja transkripta (RT-PCR analiza)	44
3.1.6. Izolacija proteina	46
3.1.7. Analiza akumulacije BvSTI proteina imunoblot metodom	47
3.1.8. <i>In gel</i> analiza aktivnosti tripsinskih inhibitora šećerne repe	49
3.2. Biotest sa insektima <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith	50
3.2.1. Gajenje insekata	50
3.2.2. Biotest na biljkama šećerne repe	51
3.2.3. Statistička obrada rezultata biotesta	52
3.3. Ispitivanje aktivnosti promotorskog regiona <i>BvSTI</i> gena u transgenom duvanu	52
3.3.1. Biljni materijal korišćen za analizu ekspresije <i>BvSTI</i> promotora	52
3.3.2. Ispitivanje osetljivosti transgenih T2 semena prema higromicinu	54
3.3.3. Histohemijska analiza ekspresije GUS gena pod kontrolom <i>BvSTI</i> promotora tokom razvića duvana	55
3.3.4. Analiza ekspresije GUS gena u povređenim tkivima transgenog duvana	56
<b>4. REZULTATI</b>	<b>58</b>
4.1. Ekspresija <i>BvSTI</i> gena u genotipovima šećerne repe sa različitim stepenom otpornosti prema insektima	58
4.1.1. Ekspresija <i>BvSTI</i> gena u mehanički povređenim tkivima šećerne repe	58
4.1.2. Akumulacija BvSTI proteaznog inhibitora nakon mehaničkog povređivanja šećerne repe	64
4.1.3. <i>In gel</i> analiza aktivnosti tripsinskih inhibitora šećerne repe	67
4.1.4. Ekspresija <i>BvSTI</i> gena u tkivima šećerne repe indukovana ishranom larvi	68
4.2. Biotest sa larvama <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith	71
4.2.1. Parametri rastenja larvi	71
4.2.2. Razviće larvi	76

4.3. Ekspresija promotorskog regiona <i>BvSTI</i> gena u transgenom duvanu	79
4.3.1. Selekcija Hyg otpornih T2 linija transgenog duvana	79
4.3.2. Ekspresija <i>BvSTI</i> pro-GUS gena tokom razvića duvana	81
4.3.3. Ekspresija <i>BvSTI</i> pro-GUS gena u povređenim tkivima duvana	83
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>88</b>
5.1. Savremene mere borbe protiv insekata štetočina	88
5.2. Nivoi ekspresije <i>BvSTI</i> gena i stepen otpornosti genotipova šećerne repe na larve SBRM	91
5.3. Aktivnost <i>BvSTI</i> gena nakon ishrane FAW larvi	94
5.4. Mehaničko povređivanje i aktivnost <i>BvSTI</i> IP	98
5.5. Parametri rastjenja i razvića vrste <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith na šećernoj repi sa različitim nivoom ekspresije <i>BvSTI</i> gena	101
5.6. Indukcija promotorskog regiona <i>BvSTI</i> gena u povređenim biljkama transgenog duvana	106
5.7. Perspektive korišćenja <i>BvSTI</i> kao transgena u cilju povećanja otpornosti biljnih genotipova prema insektima štetočinama	112
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>119</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>122</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>157</b>
<b>Prilog 1</b> – Izjava o autorstvu	
<b>Prilog 2</b> – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	
<b>Prilog 3</b> – Izjava o korišćenju	

## SKRAĆENICE

ANOVA	analiza varijanse
AP	alkalna fosfataza
APNE	N-acetil-DL-fenilalanin $\beta$ -naftil estar
BCIP	5-bromo-4-hloro-3-indolilfosfat
BSA	goveđi serum albumin; eng. <i>bovine serum albumin</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>BvSTI</i>	eng. <i>Beta vulgaris serin-type proteinase inhibitor</i>
<i>BvSTI</i> pro	promotorski region <i>BvSTI</i> gena
CaMV 35S	35S promotor mozaičnog virusa karfiola; eng. <i>Cauliflower mosaic virus 35S</i>
cDNK	komplementarni lanac dezoksiribonukleinske kiseline
CDP kinaze	eng. <i>calcium-dependent protein kinase</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	dezoksiribonukleotid trifosfati
DTT	ditiotreitol
EST	eng. <i>expressed sequence tags</i>
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija
FAW	<i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith; eng. <i>fall armyworm</i>
GA <sub>3</sub>	giberelna kiselina
GUS	enzim $\beta$ -D-glukuronidaza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik peroksid
<i>hptII</i>	marker gen koji kodira enzim higromicin fosfotransferazu
Hyg	higromicin
IP	inhibitori proteinaza
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
JK	jasmonska kiselina
LSD	statistički test najmanje značajne razlike; eng. <i>least significant test</i>
MAP kinaze	eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>

MS	hranljiva podloga po Murashige i Skoog 1962
NBT	2-2'-Di- <i>p</i> -nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(dimetoksi-4,4'-difenilen) ditetrazolium hlorid
OD	oktadekanoidni put
PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnim gelovima
PCD	programirana ćelijska smrti; eng. <i>programmed cell death</i>
PCR	reakcija lančanog umnožavanja; eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVDF	difluoridne polivinilidene membrane
RNK	ribonukleinska kiselina
rRNK	ribozomalna ribonukleinska kiselina
RT	reverzna transkripcija
SBRM	<i>Tetanops myopaeformis</i> Roder; eng. <i>sugar beet root magott</i>
SDS	Na-dodecil sulfat
SE	standardna greška; eng. <i>standard error</i>
SSH	supresivna hibridizacija; eng. <i>suppression subtractive hybridization</i>
TAE	Tris-acetatni-EDTA pufer
TBE	Tris-boratni-EDTA pufer
TBS	Tris puferisani rastvor; eng. <i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	Tris puferisani rastvor sa Tween-om
T-DNK	deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom; eng. <i>transferred DNA</i>
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
<i>uidA</i>	reporter gen koji kodira enzim $\beta$ -D-glukuronidazu
X-Gluc	5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronid

## 1. UVOD

Pre 400 miliona godina biljke su se razvile u terestrijalne forme. Tokom narednih 40 miliona godina gusta vegetacija prepokrila je velike oblasti na Zemlji, a istovremeno je došlo i do intenzivne evolucije kopnenih artropoda među kojima se već od samog početka izdvajaju po brojnosti i raznovrsnosti insekti. Tokom ovako duge koevolucije ove dve grupe organizama razvile su čitav niz različitih interakcija koje s jedne strane mogu doneti korist obema stranama ili pak biti štetne za jednu od grupa. Ove interakcije intenzivirale su se naročito u doba kenozoika, kada su cvetnice počele da prevladavaju među vegetacijom na Zemlji i kada su se insekti izdvojili kao veoma značajni oprašivači (Bernays 1998).

Odnosi između biljaka i insekata često predstavljaju izuzetno složene dinamičke sisteme međusobnih interakcija promenljivih u odnosu na brojne faktore. Na primer, cvetove duvana *Nicotiana attenuata* oprašuju adulti duvanskog moljca *Manduca sexta*, dok larveni stadijumi ovog leptira predstavljaju vrlo proždrljive herbivore koji se između ostalog hrane i listovima duvana. Pokazano je da biljke duvana na veoma sofisticiran način regulišu emitovanje isparljivih atraktanata kojima privlače polinatore i akumulaciju nikotina u listovima, kojim se brane od herbivora. Tokom noći kada su moljci aktivni, a larve prelaze u fazu mirovanja, cvetovi ostaju otvoreni i pojačava se emisija isparljivih jedinjenja, dok se koncentracija nikotina drastično snižava (Euler i Baldwin 1996; van Dam i sar. 2000).

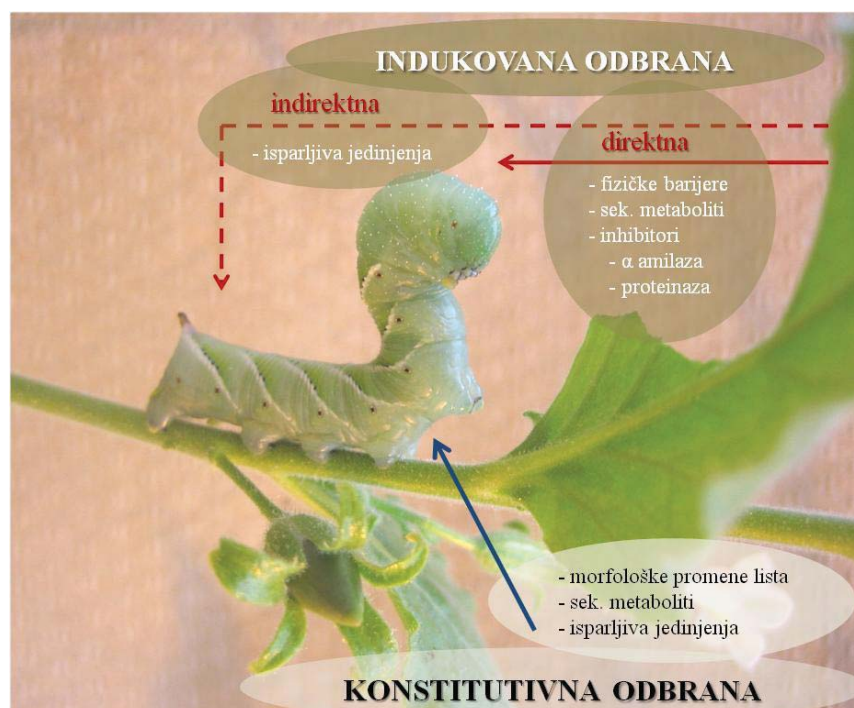
Kao primer pozitivnih, tzv. mutualističkih interakcija, svakako treba navesti oprašivanje, koje donosi benefit obema stranama - insektima biljke obezbeđuju hranu u vidu cvetnog nektara, a biljkama kroz raznošenje polena insekti omogućavaju efikasan način seksualnog razmnožavanja. Smatra se da se skoro 90% svih cvetnica oprašuje životinjama, među kojima su najbrojniji i najznačajniji oprašivači insekti (Ollerton i sar. 2011). Takođe, poznati su i slučajevi kada insekti aktivno brane biljku od drugih potencijalno štetnih insekata, a za uzvrat biljke im obezbeđuju hranu, sklonište i mesto za sigurno polaganje jaja (Leroy i sar. 2008).

S druge strane, među biljkama i insektima česte su i štetne - predatorske interakcije, kada se jedna grupa organizama hrani drugom, nanoseći velika, često i letalna oštećenja drugoj strani. Karnivorne biljke sebi obezbeđuju dodatne izvore azota i fosfora hvatajući insekte različitim zamkama u sredinama gde je prisustvo ovih elemenata limitirano sredinskim uslovima. Ipak mnogo češći vid predatorstva podrazumeva hranjenje insekata različitim biljnim delovima. Oko polovina svih do sada otkrivenih insekata primarno su herbivori i odgovorni su za defolijaciju oko 5-10% svih površina pod listovima godišnje (Schoonhoven i sar. 1998). Na ovaj način biljke trpe značajna oštećenja koja u mnogome mogu da ugroze rast i razviće, a ne retko mogu da dovedu i do smrti biljke.

Od trenutka kada je čovek počeo da kultiviše biljke, pre svega kao izvore hrane, problem insekata herbivora postaje veoma značajan. Danas se smatra da više od 10000 različitih vrsta insekata nanosi u izvesnoj meri štetu poljoprivrednim usevima. Od tog broja čak 10% se može smatrati ozbiljnim štetočinama, dok ostali ne nanose značajne štete svojom ishranom (Dhaliwal i sar. 2007).

### **1.1. MEHANIZMI ODBRANE BILJAKA OD HERBIVORNIH INSEKATA**

U pokušaju da se zaštite i odbrane od herbivornih insekata biljke su tokom evolucije razvile čitav niz adaptacija i mehanizama kojima se pasivno ili aktivno brane od oštećenja koja im insekti svojom ishranom nanose. Svi ovi mehanizmi u odnosu na tip reakcije mogu se svrstati u mehanizme konstitutivne ili indukovane odbrane (Slika 1).



**Slika 1.** Mehanizmi konstitutivne i indukovane odbrane biljaka od herbivornih insekata.

### 1.1.1. Konstitutivna odbrana biljaka

Konstitutivna odbrana odnosi se na postojanje različitih fizičkih i/ili hemijskih barijera koje su stalno prisutne nezavisno od napada insekta i predstavljaju prvu liniju odbrane. Različiti vidovi konstitutivne odbrane biljaka predstavljeni su brojnim morfološkim i fiziološkim adaptacijama, nastalih tokom duge koevolucije. Biljke se brane od insekata različitim strukturnim barijerama razvijenim na onim delovima biljke, koji se karakterišu visokom nutritivnom vrednošću i koji bi mogli predstavljati primamljive izvore hrane za insekta, ili pak dobro mesto za polaganje jaja. Tu se pre svega misli na zadebljale sekundarne ćelijske zidove, ali i na prisustvo čvrstih supstanci kao što su kutin, suberin i vosak, koji dodatno impregniraju ćelijske zidove povećavajući im čvrstinu (Freeman i Beattie 2008).



Na površini epidermisa često se mogu javiti i različite morfološke tvorevine, kao što je trnje, ali i sitne epidermalne strukture, trihome, čije su funkcije povećavanje refleksije svetlosti, smanjivanje gubitka vode, ali i otežavanje kretanja insektima (Wagner i sar. 2004). Među trihomama posebnu ulogu imaju glandularne u kojima se akumuliraju sekundarni metaboliti, koji između ostalog mogu služiti i u odbrambene svrhe. Različiti sekundarni metaboliti sintetisani u različitim biljnim organima mogu takođe predstavljati komponente konstitutivne odbrane, jer je pokazano da insekti često izbegavaju biljke sa povećanim sadržajem ovih jedinjenja. Kultivari pšenice sa visokim konstitutivnim koncentracijama fenola, kako solubilnih tako i onih vezanih za ćelijski zid, mnogo su manje bili atraktivni za afidu *Rhopalosiphum padi* od kultivara sa niskim koncentracijama ovih jedinjenja (Leszczynski i sar. 1985).

### 1.1.2. Indukovana odbrana biljaka

Indukovana odbrana biljaka predstavlja mnogo efikasniji, sofisticiraniji, ali i metabolički ekonomičniji vid odbrane i podrazumeva postojanje većeg broja mehanizama koji se aktiviraju tek nakon napada insekta (Chen 2008). Nakon napada biljke se mogu braniti emitujući u okolnu sredinu isparljiva jedinjenja kojima privlače predatore insekata štetočina i na taj način indirektno se braniti od njih. Pokazano je da koktel isparljivih jedinjenja oslobođen iz napadnutih biljaka duvana privlači insekte koji se hrane jajima i mladim larvama duvanskog moljca *M. sexta*, što je drastično smanjilo stepen oštećenja na biljkama izazvan ovim larvama (Kessler i Baldwin 2001).

S druge strane, većina biljaka neposredno nakon napada insekta uključuje mehanizme kojima se aktivno brani delujući direktno na napadača. Kod većine biljaka ćelije koje neposredno okružuju insektima oštećeni deo formiraju fizičke barijere ojačavajući ćelijske zidove izlučujući supstance koje će 'zalepiti' i na taj način izolovati oštećene ćelije (Goggin 2007). Takođe primećeno je i da se vrlo brzo uključuju mehanizmi koji podstiču brzo odumiranje napadnutih delova (Garza i

sar. 2001). Ipak najčešći vid indukovane direktne odbrane biljaka podrazumeva sintetisanje većeg broja jedinjenja koja mogu delovati na metaboličke procese insekata i uticati negativno na njihovo rastenje i razviće.

### **1.1.3. Biljni insekticidni agensi**

Tokom indukovane direktne odbrane od herbivornih insekata biljke aktivno sintetišu veliki broj različitih jedinjenja koja utiču na fitnes, ali i preživljavanje insekata.

Jedinjenja koja se u biljkama sintetišu u okviru sekundarnog metabolizma i nisu neophodna za rastenje i razviće samih biljaka, smatra se da imaju veoma važnu ulogu u indukovanoj odbrani biljaka od insekata. Iako je napred pomenuto da neka od ovih jedinjenja čine komponente konstitutivne odbrane, neki od sekundarnih metabolita akumuliraju se u tkivima tek nakon napada herbivora. Do danas je pokazano da veliki broj klasa sekundarnih metabolita može učestvovati u odbrani od insekata delujući kao repelenti za insekte, inhibitori digestivnog sistema i/ili toksini (Mello i Silva-Filho 2002). Među njima najznačajniji su različiti terpenoidi, steroidi, flavonoidi, fenoli, glukozinolati, saponini, cijanogenični glikozidi, kao i neke neproteinske aminokiseline (Gatehouse i Gatehouse 1998). U listovima duvana *N. attenuata* čak 6% od ukupnog azota se preusmeri i prevede u toksični alkaloid nikotin ubrzo nakon napada insekata (Baldwin i sar. 1998). Glukozinolati su, takođe, primer sekundarnih metabolita uključenih u interakcije biljaka i insekata. Ova jedinjenja mogu značajno da utiču na polaganje jaja, ali i ishranu izleglih larvi insekata (Bohinc i sar. 2012). Nakon povređivanja tkiva u kojima su ova jedinjenja prisutna dolazi do aktiviranja enzima mirozinaze koja ih hidrolitički prevodi do nitrila, ali i toksičnih tiocijanata i izotiocijanata koji pokazuju veoma negativan uticaj na preživljavanje herbivornih insekata (Kliebenstein i sar. 2001). Još jedan plastičan primer negativnog delovanja sekundarnih metabolita na herbivorne insekte sreće se kod biljaka limuna. Naime, terpenoid limonen deluje vrlo negativno na mrave *Atta cephalotes*, koji

predstavljaju velike štetočine jer dovode do velikih oštećenja presecajući lisne drške i uklanjajući listove sa biljaka (Cherrett 1972).

Pokazano je i da se nakon napada insekata u biljkama kao mehanizam direktne odbrane intenzivira sinteza i akumulacija različitih proteina. S obzirom da sinteza sekundarnih metabolita koji mogu učestvovati u odbrani uglavnom podrazumeva postojanje složenih enzimskih sistema, smatra se da je indukcija proteina koji su najčešće produkti aktivnosti pojedinačnih gena mnogo efikasniji, metabolički jeftiniji i brži vid odbrane (Gatehouse i Gatehouse 1998). Proteini kao što su inhibitori  $\alpha$ -amilaza, lektini i hitinaze, povećavaju otpornost biljaka ne samo prema insektima, već i prema različitim patogenima, ali i mehaničkom povređivanju (Gatehouse i Gatehouse 1998; Silva i sar. 2006). U radu Foissac i sar. (2000) nedvosmisleno je potvrđena insekticidna uloga lektina, proteina koji pokazuju veliki afinitet prema različitim ugljenim hidratima, i koji vezujući se za glikoproteine u digestivnom sistemu dovode do značajnih poremećaja u metabolizmu insekata. Lektin iz visibabe (*Galanthus nivalis*) eksprimiran u transgenom pirinču povećao je otpornost ovih biljaka protiv skakavaca *Nilaparvata lugens* i *Nephotettix virescens*. Na sličan način Shade i sar. (1994) su ukazali na ulogu inhibitora  $\alpha$ -amilaze iz pasulja u transgenom grašku u otpornosti na žižak *Callosobruchus maculatus*.

Ipak među najrasprostranjenijim i najbolje proučenim odbrambenim proteinima biljaka jesu inhibitori proteinaza (IP).

## **1.2. BILJNI INHIBITORI PROTEINAZA**

Biljni inhibitori proteinaza (IP) predstavljaju grupu široko rasprostranjenih polipeptida i proteina sa potvrđenom ulogom u odbrani od herbivornih insekata ili drugih patogena. Njihova odbrambena uloga po prvi put je opisana 1972. godine kada je uočena povezanost između akumulacije ovih proteina i mehaničkog povređivanja i ishrane herbivornih insekata kod nekih biljaka iz familije *Solanaceae* (Green i Ryan 1972). Nakon toga, Gatehouse i sar. (1979) uočili su

otpornost nekih varijeteta kravljeg graška, *Vigna sinensis*, prema adultima žiška *C. maculatus*, a nešto kasnije su potvrdili da ta otpornost nastaje usled povišenog sadržaja inhibitora tripsina u semenima (Gatehouse i Boulter 1983). U sličnom eksperimentu Broadway i Duffey (1986) uočili su da aktivnost IP, indukovana povređivanjem, u listovima paradajza može biti odgovorna za redukciju rasta larvi repine sovice, *Spodoptera exigua*, kada se porede sa larvama koje su se hranile nepovređenim listovima.

### **1.2.1. Osnovne karakteristike IP**

IP su vrlo česti, ne samo u biljkama, već i u životinjama i mikroorganizmima (Supuran i sar. 2002; Haq i sar. 2004; Mosolov i Valueva 2005; Christeller 2005). Kod biljaka predstavljaju jednu od najzastupljenijih grupa proteina, a rasprostranjeni su među različitim biljnim taksonima. Najintenzivnije proučavani biljni IP poreklom su iz predstavnika familija *Solanaceae*, *Graminaceae* i *Fabaceae*.

Kod biljaka ovi proteini se akumuliraju prevashodno u organima za skladištenje rezervnih materija, ali ih ima i u listovima kao odgovor na napad insekata ili patogena (De Leo i sar. 2002). U tuberima krompira i semenima leguminoza mogu se akumulirati u visokim koncentracijama i činiti čak 10% od ukupnih proteina (Richardson 1977), dok u listovima paradajza i krompira mogu se nakupiti do nivoa od 2% od svih solubilnih proteina 48 sati nakon napada insekata ili druge vrste povređivanja (Brown i Ryan 1984; Graham i sar. 1986). Jedan od najbolje proučenih IP gena poreklom iz krompira, *PIN2*, eksprimira se u cvetovima (Peña-Cortés i sar. 1991; Pearce i sar. 1993; Sin i Chye 2004), plodovima (Pearce i sar. 1988), izdancima (Xu i sar. 2001), tuberima (Sánchez-Serrano i sar. 1986), korenovima (Taylor i sar. 1994), ali i u listovima tokom napada insekata ili mehaničkog povređivanja (Peña-Cortés i sar. 1988; Ryan 1990) implicirajući njegovu ulogu u odbrani.

Histohemijske studije sprovedene radi dokazivanja unutarćelijske lokalizacije pokazuju da se molekuli IP mogu akumulirati u različitim ćelijskim

departmanima i da je njihova lokalizacija uglavnom vezana za primarnu ulogu koju imaju u biljnim ćelijama i organima. Molekuli inhibitora tripsinskih proteinaza iz soje SBTI, smešteni su uglavnom u ćelijskim zidovima, a nešto manje i u citoplazmi i jedrima kotiledonarnih i embrionalnih ćelija (Horisberger i Tacchini-Vonlanthen 1983a). Za razliku od njega Bowman-Birk inhibitor takođe iz soje, SBBI, nalazi se uglavnom u međućelijskom prostoru, ali ne i u ćelijskim zidovima (Horisberger i Tacchini-Vonlanthen 1983b). Nakon imbibicije semena leguminoza, tripsinski i himotripsinski inhibitori brzo difunduju u okolni rastvor (Valdebouze i sar. 1980). Pokazano je i da cisteinski inhibitor iz ćelijske kulture šargarepe takođe može biti izlučen u spoljašnju sredinu (Ojima i sar. 1997). Novija istraživanja u kojima su korišćene transgene biljke paradajza, pokazuju da se proteinazni inhibitori I i II deponuju u ćelijskim zidovima endosperma, kao i sekretornim ćelijama korenove kape i da se delimično mogu izlučivati i u okolnu spoljašnju sredinu. Ove činjenice potvrđuju hipotezu da IP mogu imati i zaštitnu ulogu protiv zemljišnih mikroorganizama braneći meristemsku zonu korena od penetracije patogena (Narwaez-Vasquez i sar. 1993).

Biljni IP su uglavnom mali molekuli, čija se molekulska masa kreće od 4 do 85 kDa, sa pretežnim prisustvom proteina od svega 8-20 kDa (Ryan 1990). U aminokiselinskom sastavu preovladavaju rezidue bogate cisteinima koji učestvuju u formiranju brojnih disulfidnih mostova povećavajući stabilnost molekula i čineći ih otpornijima prema visokim temperaturama, promenama pH i proteolizi (Greenblatt i sar. 1989).

Iako se IP u biljkama sintetišu obično kao molekuli sa jednim domenom, aktivni bez bilo kakvih dodatnih modifikacija, postoje i neki izuzeci. Pojedini IP se sintetišu kao pre-proteini (Graham i sar. 1985), koji se zatim post-translaciono obrađuju u samim biljkama i prevode u aktivne oblike. Jedan od najpoznatijih primera malih IP koji nastaju obradom multidomenskog prekursora jeste inhibitor serinskih proteinaza izolovan iz cvetova i povređenih listova ornamentalnog duvana *N. alata*, *NaPI*. Čak pet malih IP nastaje post-translacionom obradom prekursora koji ima pet domena međusobno odvojenih aminokiselinskom sekvencom EEKKND. Ova sekvenca se nakon translacije proteolitički uklanja, čime

se oslobađa pet malih molekula veličine po 6 kDa obeleženih kao C1, T1, T2, T3 i T4. C jedinica predstavlja inhibitor himotripsinskih proteinaza, dok T jedinice predstavljaju inhibitore tripsina (Heath i sar. 1995). Ovi proteini mogu činiti čak do 30% od ukupnog sadržaja solubilnih proteina u stigmama *N. alata* biljaka i imaju dokazanu ulogu u borbi protiv insekata (Heath i sar. 1997). Takođe, pojedini IP opstaju kao multidomenski molekuli i aktivni su bez razdvajanja pojedinačnih domena, na način opisan prethodno. Kod ovih nešto složenijih molekula čak svaki od prisutnih domena sa svojim aktivnim centrom može pokazivati specifičnost prema drugom tipu proteina. Pa tako, neki od serinskih inhibitora osim što učestvuju u inhibiciji tripsina, pokazuju i aktivnost prema  $\alpha$ -amilazama (Gourinath i sar. 2000).

### 1.2.2. Podela i klasifikacija biljnih IP

Svi do sada otkriveni IP učestvuju u inhibiciji proteolitičkih enzima klasifikovanih u mehanističke klase: serinskih, cisteičnih, aspartičnih i metalo-proteinaza, grupisanih na osnovu aminokiselinskih rezidua ili jona metala koji učestvuju u raskidanju peptidnih veza (Ryan 1990; Haq i sar. 2004). Na osnovu njihove specifičnosti prema određenoj klasi proteinaza većina inhibitora je takođe svrstana u četiri odgovarajuće klase (Tabela 1).

***Inhibitori serinskih proteinaza*** predstavljaju najzastupljeniju i ujedno najbolje proučenu grupu biljnih IP. Ogroman broj serinskih inhibitora okarakterisan je i izolovan iz velikog broja biljnih vrsta. U okviru ove grupe postoji nekoliko familija inhibitora, odvojenih na osnovu sličnosti u primarnom aminokiselinskom sastavu (Tabela 1). Najpoznatiji su inhibitori iz familije Kunitz u okviru koje su grupisani nešto veći proteini sa molekulskim masama od 18-22 kDa i veoma niskim sadržajem cisteina, kao i Bowman-Birk inhibitori veličine od 8-10 kDa sa visokim sadržajem cisteina i dva aktivna centra (Kunitz 1945; Birk 1994). Svi oni aktivni su protiv proteinaza serinskog tipa čiji su glavni predstavnici tripsin, himotripsin i elastaze. Najveći broj insekata štetočina kao osnovnu

komponentu digestivnih enzima poseduje upravo ove enzime. Inhibiranjem ovih proteinaza aktivnost digestivnog sistema se drastično smanjuje te je i negativan efekat ovih inhibitora na parametre rasta i razvića insekata veoma veliki. Svi serinski inhibitori deluju kao potencijalni supstrati za enzime i kompetitivnom inhibicijom se vezuju ireverzibilno za aktivno mesto specifičnih proteinaza, gradeći komplekse i utičući na katalitičku aktivnost enzima (Radisky i sar. 2004). Činjenica da se ova grupa inhibitora veoma intenzivno eksprimira nakon napada insekata ili patogena ukazuje na to da je uloga ove grupe IP pre svega u odbrani.

**Tabela 1:** Podela biljnih inhibitora proteinaza na osnovu specifičnosti prema mehanističkim klasama proteinaza u čijoj inhibiciji učestvuju

<i>Grupe biljnih IP</i>	<i>Ciljane proteinaze</i>	<i>Ciljani insekti</i>
<b><i>Inhibitori serinskih proteinaza</i></b> - Kunitz familija iz soje - Bowman-Birk familija - krompirovi inhibitori I - krompirovi inhibitori II - tikvini - serpini	tripsin, himotripsin, elastaze	Lepidoptera Diptera
<b><i>Inhibitori cisteinskih proteinaza (cistatini)</i></b>	papain, katepsin B, H, L	Colleoptera Homoptera
<b><i>Inhibitori aspartičnih proteinaza</i></b>	pepsin, katepsin D	Hemiptera
<b><i>Inhibitori metalo-proteinaza</i></b>	karboksi-peptidaze A, B	

***Inhibitori cisteinskih proteinaza*** nešto su manje zastupljeni od serinskih inhibitora, ali su takođe intenzivno proučavani. Nazivaju se još i cistatini ili fitocistatini, a izolovani su iz krompira (Waldron i sar. 1993), ambrozije (Rogers i sar. 1993), ploda jabuke (Ryan i sar. 1998) i mnogih drugih biljaka. Najpoznatiji i najčešće eksploatisani kao transgeni su cistatini iz pirinča, orizacistatini I i II (OC-I i OC-II; Abe i sar. 1987). Smatra se da je uloga cistatina više vezana za regulaciju endogenih proteinaza biljaka nego za obranu od herbivora, s obzirom da su u

procesima proteinske razgradnje i mobilizacije u biljkama dominantne upravo cisteinske proteinaze, kao što su papain ili katepsin.

**Inhibitori aspartičnih proteinaza** predstavljaju grupu inhibitora koji nisu tako česti u prirodi. Do sada je izolovano i okarakterisano svega nekoliko IP iz ove klase, i to iz cvetova suncokreta i ječma (Kervinen i sar. 1999; Park i sar. 2000). Jedan od prvih bio je inhibitor katepsina D iz tubera krompira (Marres i sar. 1989). Ovaj 27 kDa veliki protein predstavljen je složenim molekulom sa više katalitičkih centara u kojima se inhibiraju pored aspartičnih i serinske proteinaze, tripsin i himotripsin.

**Inhibitore metalo-proteinaza** čine do sada opisane samo dve familije inhibitora sa po nekoliko članova. To su inhibitori metalo-karboksiptidaza iz paradajza (Rancour i sar. 1968) i krompira (Graham i Ryan 1997), veličine od 38-39 aminokiselina i molekulske mase od svega 4,2 kDa (Hass i sar. 1975; Hass i Hermodson 1981).

U digestivnim sistemima insekata sreću se sve četiri mehanističke klase proteinaza, a zajednička im je uloga u razlaganju proteina iz hrane na pojedinačne amino kiseline, čime se obezbeđuju sastojci neophodni za normalan rast i razviće (Wolfson i Murdock 1990). U različitim insektima, dominantne su različite grupe proteinaza, pa su tako serinske proteinaze dominantne kod larvi Lepidoptera (Srinivasan i sar. 2006) i Diptera kod kojih su osim serinskih aktivne i aspartične proteinaze (Pendola i Greenberg 1975; Wilhite i sar. 2000). Kod Coleoptera i Homoptera prisutne uglavnom cisteinske proteinaze, ali ima i proteinaza iz drugih grupa (Wolfson i Murdock 1990), dok su kod Hemiptera prisutne dominantno cisteinske, ali su aktivne i aspartične proteinaze (Knop Wright i sar. 2006).

### **1.2.3. Fiziološka uloga i mehanizmi delovanja IP**

Osnovna uloga inhibitora proteinaza kod biljaka jeste regulacija aktivnosti endogenih proteinaza, enzima koji vrše hidrolitičko razlaganje proteina.



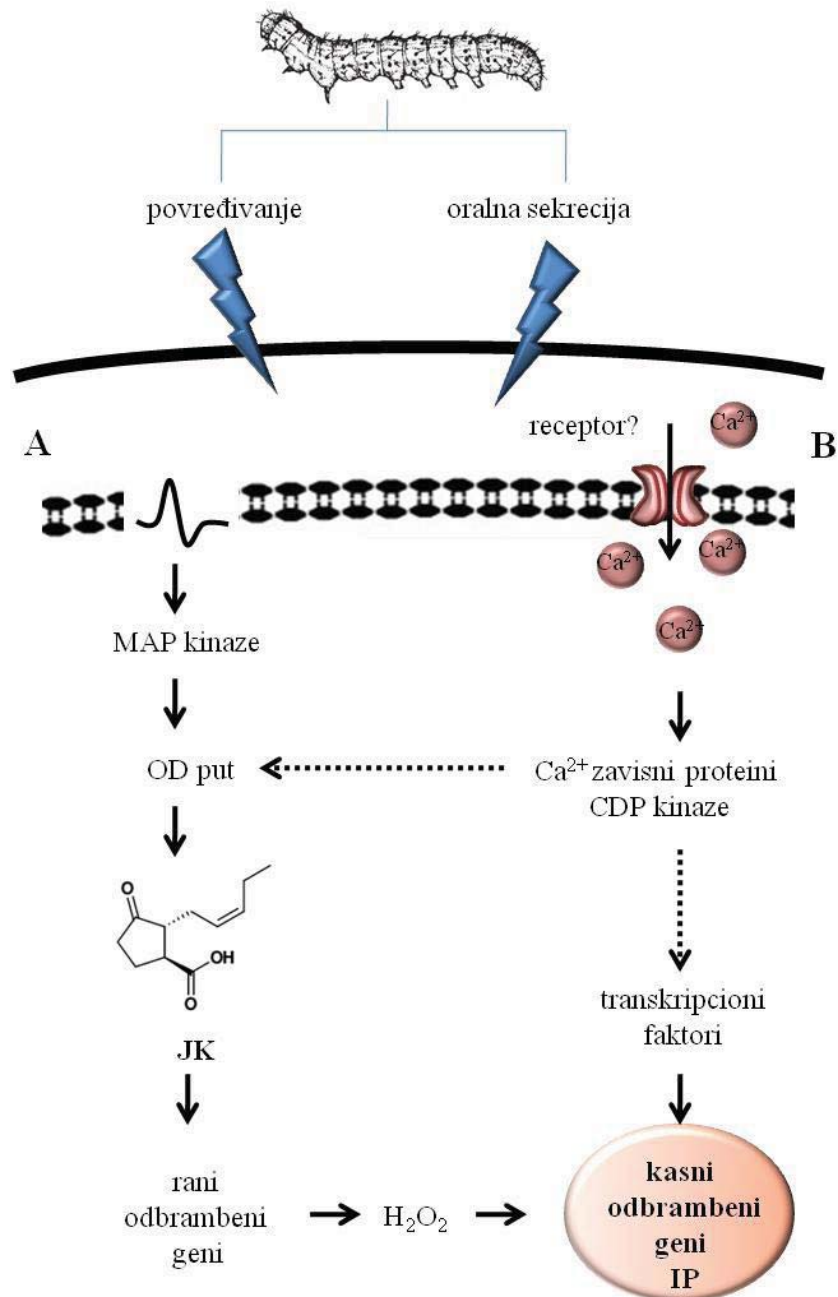
Ireverzibilnim vezivanjem inhibitora za aktivno, katalitičko mesto enzima vrši se inaktivacija proteinaza i to u slučajevima kada proteinaze predstavljaju pretnju za samu biljnu ćeliju, bilo zbog previsoke koncentracije ili zbog nedostatka nekih drugih mehanizama kojima se njihovo prisustvo i aktivnost regulišu (Habib i Fazili 2007). Vezivanjem za aktivni centar proteinaze stvara se stabilni kompleks sa zaustavljenom ili krajnje usporenom proteolitičkom aktivnošću. Aktivnost IP posebno je intenzivna i značajna u semenima, jer se smatra da upravo formiranjem kompleksa i sprečavanjem aktivnosti proteinaza IP kontrolišu proces dormancije semena (Richardson 1977). U trenutku kada giberelini indukuju klijanje semena dolazi do aktivacije gena za sintezu proteinaza i porasta proteolitičke aktivnosti kojom se deponovani proteini razlažu i oslobađa azot neophodan za procese biosinteze tokom klijanja. Istovremeno dolazi i do supresije aktivnosti gena koji kodiraju IP, te značajnog pada u njihovoj koncentraciji, a samim tim i do slabljenja inhibitornog dejstva na prisutne proteinaze (Jacobsen i Olszewski 1996). Postoje i spekulacije da prisustvo visokih koncentracija, pre svega serinskih inhibitora u semenima ili organima koji imaju ulogu u vegetativnom razmnožavanju ima takođe odbrambenu ulogu, s obzirom na značaj ovih organa za očuvanje vrste (Koiwa i sar. 1997).

Osim toga, u organima za skladištenje IP služe i kao rezervni depoi proteina, koji se zatim mobilizuju tokom klijanja (Haq i sar. 2004). Takođe, pokazano je da IP imaju ulogu i u modulaciji programirane ćelijske smrti (eng. *programmed cell death*, PCD). Solomon i sar. (1999) su pokazali ekotopičnu ekspresiju cistatinskih gena i inhibiciju cisteinskih proteinaza uključenih u PCD koje su bile indukovane avirulentnim sojem *Pseudomonas syringe* pv *glycinea* ili oksidativnim stresom.

Ipak, jedna od najznačajnijih uloga IP kod biljaka jeste odbrana od herbivornih insekata. IP se za vrlo kratko vreme akumuliraju u visokim koncentracijama na mestu oštećenja nastalog usled napada insekta (Maffei i sar. 2007). Još uvek nije u potpunosti razjašnjen signalni put kojim se kreće informacija o povređivanju i koji dovodi do aktivacije odbrambenih snaga, uključujući i IP. Zna se da tokom ishrane herbivori povređuju biljna tkiva pre svega mehanički, nanoseći direktna oštećenja ćelijskim zidovima i plazma membranama, ali i

sekretorne mešavine koje insekti izlučuju tokom ishrane deluju kao inducibilni agensi sposobni da pokrenu čitav niz događaja (Slika 2). Po jednom od predloženih modela Koiwa i sar. (1997), nakon povređivanja dolazi do lokalne depolarizacije membrana i promene membranskog potencijala, što povlači za sobom značajne promene u strukturi i aktivnosti brojnih receptornih molekula smeštenih u samim membranama (Slika 2A). Neki od do sada još uvek nepoznatih receptora, nakon ovog signala o napadu pokreću aktivnost proteinskih kinaza poznatih kao MAP kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase*), koje aktiviraju tzv. oktadekanoidni (OD) put. Kao produkti niza reakcija u kojima dolazi do katalitičkog razlaganja linoleinske kiseline, nastaju molekuli jasmonske kiseline (JK), signalnog molekula koji neposredno indukuje odbrambene gene. Najpre se direktno aktiviraju tzv. rani odbrambeni geni, a zatim preko sekundarnih signalnih molekula, poput H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dolazi i do indukcije kasnih odbrambenih gena, među koje spadaju i IP geni. Royo i sar. (1999) pokazali su da se inhibiranjem sinteze lipoksigenaze, ključnog enzima u procesu biosinteze JK, smanjuje indukciju IP, a to je za posledicu imalo povećanje mase larvi koje su se hranile ovim biljkama krompira sa smanjenom količinom JK.

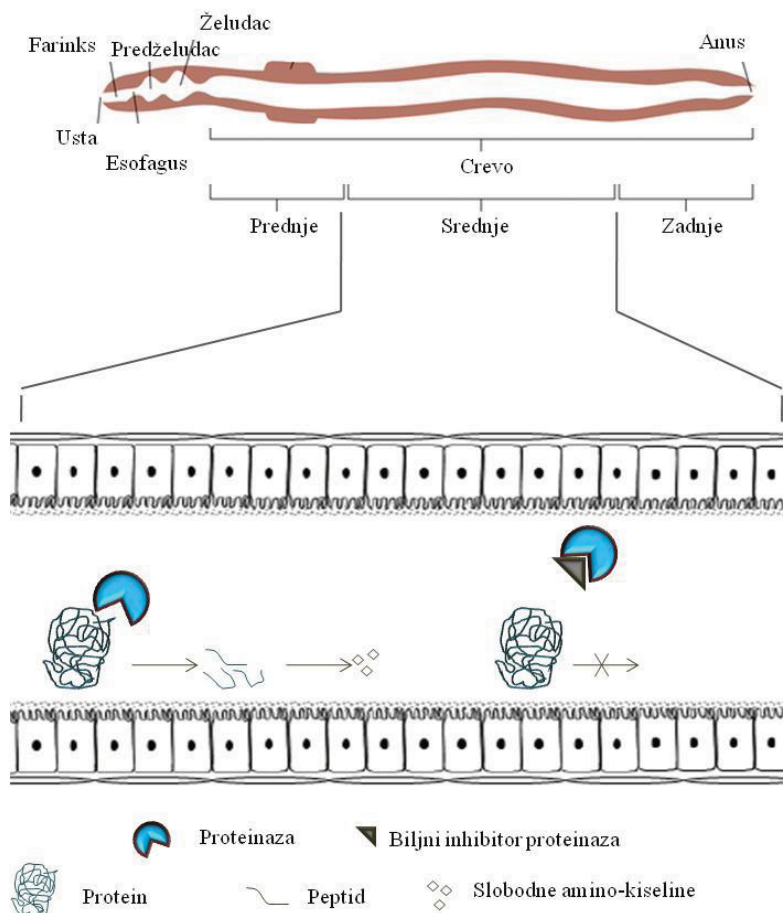
Izgleda ipak da je ovo samo jedan od signalnih puteva, a da u zavisnosti od specifične reakcije između biljke i insekta i neki drugi mehanizmi mogu biti uključeni. Arimura i sar. (2011) veruju da se nezavisno od napred pomenutog transdukcijskog puta signal o povređivanju često prenosi i jonima Ca<sup>2+</sup>, za koje se takođe zna da su vrlo česti sekundarni prenosioci signala. Kada signal bude primljen na samoj oštećenoj membrani od strane nepoznatog receptora, dolazi do otvaranja Ca<sup>2+</sup> jonskih kanala i akumulacije ovih jona na unutrašnjosti membrane (Slika 2B). Ca-vezujuće proteinske kinaze, kao što su CDP kinaze (eng. *calcium-dependent protein kinase*), direktno utiču na transkripcione faktore koji aktiviraju ekspresiju odbrambenih gena, uključujući IP. Alternativno, CDP kinaze mogu aktivirati OD put i sintezu JK, pa se indukcija IP gena vrši na već opisan način preko ranih odbrambenih gena i sekundarnih signalnih molekula.



**Slika 2.** Put prenosa signala i indukcija IP nakon napada herbivora. (A) Nakon promene membranskog potencijala i aktivacije MAP kinaza pokreće se oktadekanoidni put (OD) sinteze jasmonske kiseline (JK), koja indukuje ekspresiju odbrambenih gena direktno ili preko sekundarnih signalnih molekula. B) Alternativno, signal o povređivanju menja fluks jona  $\text{Ca}^{2+}$ , u čijem se prisustvu aktiviraju  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisne proteinske kinaze (CDP kinaze), koje zatim direktno indukuju ekspresiju odbrambenih gena preko aktiviranja transkripcionih faktora ili indukuju sintezu JK kroz OD put.

Međutim, primećeno je i da se geni koji kodiraju ove proteine aktiviraju u udaljenim, nepovređenim delovima biljke, sugerišući postojanje nekakvih sistemskih mobilnih signalnih molekula kojima se informacija o napadu i potrebi za reakcijom prenosi. Potvrda za ovakve pretpostavke pronađena je u eksperimentima u kojima je indukovana aktivnost IP gena kada su na preseke izdanaka mladih biljaka paradajza naneti ekstrakti dobijeni iz povređenih listova (Pearce i sar. 1991). Pretpostavka da informaciju iz povređenih ćelija do ostatka biljke prenosi signalni faktor ubrzo je potvrđena izolacijom i identifikacijom malog polipeptida od svega 18 amino kiselina koji je nazvan sistemin i za koga je kasnije jasno potvrđeno da predstavlja sistemski signalni molekul. Potvrda je dobijena u eksperimentima u kojima je radioaktivno obeleženi <sup>14</sup>C-sistemin nanet na povređene delove. Za veoma kratko vreme bio je detektovan u višim nepovređenim delovima biljke, ukazujući na njegovu intenzivnu mobilnost (Pearce i sar. 1991). Eksperimenti sa genetički modifikovanim biljkama kod kojih je redukovana ili potpuno sprečena sinteza signalnih molekula dodatno potvrđuju njihov značaj. Orozco-Cárdenas i sar. (1993) su pokazali da su biljke paradajza kod kojih je bila sprečena sinteza odbrambenih PIN1 i PIN2 molekula tako što su doveli do utišavanja gena koji kodira sistemin konstitutivnom ekspresijom antisens varijante ovog gena, bile znatno osetljivije na larve *M. sexta*, nego kontrolne biljke kod kojih je došlo do neometane sinteze sistemina i odbrambenih IP.

Odbrambeni kapacitet IP indukovanih povređivanjem leži u inhibiciji proteinaza prisutnih u digestivnim sistemima insekata. Usporavanje ili potpun izostanak proteolitičke razgradnje hranom unetih proteina kod insekata dovodi do redukcije u dostupnosti amino kiselina i izaziva fiziološki stres, rezultujući u retardaciji rasta i promenama kursa razvića kod insekata. Nakon što dospeju u digestivni trak insekata, ireverzibilno se vezuju za aktivno mesto digestivnih proteinaza, čime ih imobilišu i značajno smanjuju efikasnost digestije (Slika 3).



**Slika 3.** Shematski prikaz interakcije inibitora sa digestivnim proteinazama u srednjem crevu insekata. *Preuzeto i modificovano: Drake i Horn (2007) i Chougule i Bonning (2012)*

Kao posledica onemogućene razgradnje proteina, smanjuje se koncentracija slobodnih aminokiselina neophodnih za *de novo* sintezu insekatskih proteina, te se vrlo brzo mogu primetiti nepovoljni uticaji na rast (Jongsma i Bolter 1997), kao i na fertilitet i fekunditet insekata (Broadway i Duffey 1986). S obzirom da je pokazano da tripsin ima određene važne uloge tokom razvića insekata i u procesima kao što su presvlačenje ili sinteza neuropeptida, inhibicija ovog enzima dovodi do potpunog poremećaja u razviću insekata (Steffens i sar. 1978; Shukle i sar. 1985). Tokom kovolucije i stalne borbe za unapređenjem odbrambenih mehanizama biljke su razvile IP koji su postali izuzetno otporni na delovanje

proteolitičkih enzima insekata koji teže da ih razgrade nakon što dospeju u digestivni trak. Većina biljnih IP zadržava svoju aktivnost pod veoma ekstremnim pH uslovima koji vladaju u digestivnim sistemima insekata (Christeller i sar. 1994).

Osim što IP predstavljaju dobre odbrambene agense zbog relativno brzog odgovora nakon napada insekata, oni mogu imati ulogu i u prevenciji nekih sledećih napada. Naime, kod napadnutih listova topole *Populus tremuloides* indukovani inhibitor tripsina akumulirao se kontinuirano tokom 2 dana, zadržavajući nivo dovoljan da ugrozi sledeći napad herbivora (Haruta i sar. 2001).

Novija istraživanja otkrila su još jednu značajnu ulogu IP u odgovoru biljaka i na neke abiotičke stresove. Pokazano je da se cistatini indukuju prilikom delovanja niskih temperatura ili kod biljaka izloženih slanom stresu (Pernas i sar. 2000). Kod transgenih biljaka duvana u kojima je konstitutivno eksprimiran cistatinski *OC-I* gen uočena je povećana tolerantnost na hlađenje u poređenju sa kontrolnim netransformisanim biljkama (Van der Vyver i sar. 2003).

### **1.3. BIOIOTEHNOLOGIJA U FUNKCIJI BORBE PROTIV INSEKATA ŠTETOČINA**

Iako biljke poseduju složen spektar odbrambenih mehanizama protiv insekata štetočina, tokom koevolucije i insekti su odgovarali različitim adaptacijama i kontra-merama. Intenziviranjem poljoprivredne proizvodnje stvarili su se uslovi koji dodatno favorizuju insekte u odnosu na selekcijom oslabljene biljne genotipove, te su štete koje trpi većina useva zabrinjavajuće velike. Paralelno sa tim, poslednjih decenija javila se i potreba za efikasnijom poljoprivrednom proizvodnjom koja će obezbediti dovoljno hrane usled intenzivnog porasta populacije ljudi na Zemlji. Takođe, biljke su značajne čoveku i kao izvori nekih drugih resursa, pre svega drveta kao energetske goriva, ali i kao izvor različitih industrijskih i farmaceutskih sirovina (Freeman i Beattie 2008). Zbog svega ovoga, poslednjih decenija intenzivirana je borba protiv insekata štetočina, koja se uglavnom i danas bazira na aplikaciji hemijskih pesticida. Međutim, zbog velikog broja problema koje ovi hemijski agensi mogu doneti

usevima, ali i životinjama i ljudima u daljim karikama lanaca ishrane, kao i samoj okolini, potraga za alternativnim pristupima i tehnologijama koje bi se primenile u cilju povećanja otpornosti biljnih genotipova i zaštite od insekata štetočina je intenzivirana.

Istovremeno, unapređivanje biljnih genotipova kroz konvencionalne metode oplemenjivanja, iako i dalje intenzivno korišćen pristup, nailazi na niz poteškoća. Pre svega, proces selekcije zahteva značajan utrošak vremena, rada i sredstava, a podrazumeva eksperimente na velikim uzorcima. Otporni varijeteti često mogu pokazivati slabe performanse poželjnih karakteristika za tu kulturu, što je naročito nepoželjno.

Sa razvojem metoda genetičkog inženjeringa baziranih na tehnologiji dobijanja rekombinantnih dezoksiribonukleinskih kiselina (DNK), otvorio se novi pristup rešavanju problema sa insektima štetočinama. Ove metode podrazumevaju manipulacije genomima prirodnih organizama ili njihovim metabolitima koji doprinose razvijanju otpornosti prema insektima (Hilder i Boulter 1999). Borba protiv insekata štetočina bazira se na ciljanim modifikacijama u ekspresiji gena uključenih u odbrambene mehanizme ili u introdukciji heterolognih transgena koji kodiraju insekticidne agense u genom biljke domaćina. U radu Di Maro i sar. (2010) objavljeno je da je eksprimiranjem transgena koji kodira hitinazu A poreklom iz virusa *Autographa californica* u biljkama duvana značajno povećana otpornost ovih biljaka na insekte.

Prvi gen koji je metodama genetičkog inženjeringa ubačen u biljni genom u cilju borbe protiv insekata štetočina bio je iz zemljišne gram-pozitivne bakterije *Bacillus thuringiensis* (Bt). Ova bakterija tokom sporulacije sintetisuje kristalne proteine za koje je pokazano da u vrlo niskim koncentracijama pokazuju visoku insekticidnu aktivnost, pri čemu nemaju toksično dejstvo na druge organizme. Gen koji u bakteriji kodira ove proteine tokom sporulacije, nazvane  $\delta$ -endotoksini, kloniran je 1981. godine (Schnepf i Whitley 1981), a već sredinom 1980-tih dobijene su prve transgene biljke duvana (Barton i sar. 1987) i paradajza (Vaeck i sar. 1987) sa ubačenim i eksprimiranim Bt genom. Gen i protein su dobili oznaku

*cry* zbog kristalne forme u kojoj se javljaju ovi proteini. Danas se zna da Bt  $\delta$ -endotoksini sačinjavaju familiju od oko 410 srodnih proteina kodiranih od strane više od 140 gena (Crickmore i sar. 2007). Ovi proteini pokazuju različite specifičnosti prema vrstama insekata iz redova Lepidoptera, Coleoptera i Diptera, ali su kod svih mesto i mehanizam delovanja isti (Knowels 1994). Kristalni protoksini koji se nađu u digestivnom sistemu larvi neaktivni su sve dok ih digestivni sokovi ne rastvore i prevedu u aktivan oblik. Tada se vezuju za specifične receptore na membranama crevnih epitelnih ćelija pri čemu dovode do nastajanja pora, jonskih kanala, kroz koje dolazi do ubrzanog pasivnog kretanja jona (Knowels i Dow 1993). Otvaranje ovih kanala narušava membranski potencijal (English i Slatin 1992) uzrokujući nekrozu crevnog sistema, degeneraciju membrana i prodor različitih toksina, što dovodi konačno do smrti insekta (Sneh i Schuster 1981; Salama i Sharaby 1985).

Iako je ekspresija *cry* gena u prvodobijenim transgenim biljkama duvana bila dosta niska i dovođila do smrtnosti kod svega 20% larvi *M. sexta* (Barton i sar. 1987), na razvoju ovog pristupa radilo se decenijama i veliki broj transgenih biljnih vrsta je dobijen ubacivanjem ovog gena radi povećanja otpornosti na insekte. Jedan od primera vrlo efikasne primene ovog pristupa je dobijanje transgenog kultivara pamuka, označenog kao Coker 312 (Benedict i sar. 1996). Ovaj kultivar je dobijen transformacijom modifikovanim *PMCry1A(c)* genom pod kontrolom CaMV 35S promotora koji je sadržavao dupliran region pojačivača ekspresije. Transformisane biljke pamuka koje su sadržavale čak 0,1% Bt toksina u ukupnim solubilnim proteinima, pokazivale su potpunu otpornost prema larvama tri izuzetno rasprostranjene štetočine: zelenu kupusovu gusenicu (*Trichoplusia ni*), repinu sovicu (*S. exigua*) i kukuruzovu sovicu (*Helicoverpa zea*).

Od 1995. godine u Sjedinjenim Američkim Državama zakonom je dozvoljeno gajenje Bt transgenih biljaka, a pamuk 'Bollgard' bio je prva komercijalno dostupna transgena kultura otporna na pamukovu sovicu (*Helicoverpa armigera*). Tokom 2010. godine ukupna površina pod komercijalnim genetički modifikovanim biljnim vrstama iznosila je 148 miliona hektara (James 2010), od čega čak jedna trećina čini upravo Bt transgene useve (Perry i sar. 2012).



Iako Bt endotoksini eksprimirani u transgenim biljkama danas čine 98% svih dostupnih biopesticida i predstavljaju vodeći pravac u primeni novih biotehnoloških rešenja u cilju razvoja otpornosti na insekte, postoje ograničenja u primeni ovog pristupa. Razviće rezistentnosti kod insekata štetočina na Bt endotoksine predstavlja glavnu bojazan. Iako je do danas potvrđena rezistencija na insekticidni sprej koji sadrži Bt protoksine samo kod kupusovog moljca (*Plutella xylostella*), kao i kod populacija zelene kupusove gusenice (*Trichoplusia ni*) izolovanih iz staklenika (Janmaat i Myers 2003), postoje sumnje da će se uskoro razviti otpornost na Bt endotoksine iz transgenih biljaka i kod insekata u polju (Tabashnik i sar. 2003). Utvrđeno je da redukovano vezivanje Bt toksina za membrane epitelnih ćelija u crevima predstavlja primarni mehanizam rezistencije kod većine insekata. Studije sa radioaktivno obeleženim CryIA(b) proteinom pokazuju da kod rezistentnog soja *P. interpunctella* kod koga je vezivanje ovog proteina za membrane ćelija creva smanjeno 50 puta u odnosu na osetljivi soj, dolazi do pada u toksičnosti datog proteina od čak 100 puta (Van Rie i sar. 1990). Kod nekih drugih vrsta insekata kod kojih je došlo do pojave rezistentnosti u laboratorijskim uslovima, primećen je smanjeni stepen rastvorljivosti i aktivacije protoksina, a samim tim i smanjenog vezivanja endotoksina za membrane epitela (Gill 1992; McGaughey i Whalon, 1992). Osim potencijalnog razvoja rezistentnosti, vrlo složen proces proteolitičke aktivacije protoksina kodiranih od strane Bt *cry* gena može predstavljati slabost ovog pristupa.

Potruga za alternativom Bt pristupu u borbi protiv insekata štetočina zasniva se uglavnom na traženju gena sa insekticidnim dejstvom poreklom iz biljaka. Za brojne klase biljnih proteina i sekundarnih metabolita pokazano je da poseduju štetno ili čak toksično dejstvo na metabolizam insekata, te se s toga smatra da bi bili mogući kandidati u borbi protiv ovih štetočina. Osnovne prednosti ovih biljnih agenasa su da deluju pre svega hronično, a ne akutno na metabolizam insekata, kao i da je moguće štetno dejstvo na korisne insekte znatno manje nego što je to slučaj pri primeni hemijskih pesticida ili Bt endotoksina (Gatehouse 2011). Takođe, većina ovih potencijalnih bioinsekticida kao primarni podukti genske ekspresije aktivni su bez dodatnih modifikacija.

### 1.3.1. IP kao bioinsekticidni transgeni

Kao začetak novog pravca u potrazi za jedinjenjima biljnog porekla sa insekticidnim dejstvom smatraju se eksperimenti Mickel i Standish iz 1947. godine. Proučavajući ulogu različitih proteina soje u zaštiti od malog brašnara, *Tribolium confusum*, oni su uočili da protein iz semena sa ulogom u inhibiciji tripsina ima toksično dejstvo na razviće ovog štetnog insekta.

Od tog trenutka IP postaju atraktivno oruđe u unapređivanju otpornosti pre svega poljoprivrednih kultura prema raznim vrstama insekata štetočina. Prvi gen koji kodira neki od biljnih IP i koji je genetičkom transformacijom posredovanom bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* ubačen u heterologni biljni genom radi povećanja otpornosti na insekte bio je gen za CpTI tripsinski inhibitor iz kravljeg graška. Sekvenca ovog gena koja se nalazila pod kontrolom konstitutivno eksprimiranog CaMV 35S promotora ubačena je u duvan (Hilder i sar. 1987). Bioeseji u kojima su korišćene larve štetočine duvana *Helicoverpa virescens* pokazali su da su insekti, koji su se hranili linijama koje su pokazivale visok stepen ekspresije transgena, umirali ili zaustavljali se u nekoj od faza razvića mnogo češće nego što je to bio slučaj sa insektima koji su se hranili kontrolnim netransformisanim biljkama (Schuler i sar. 1998). Ovaj gen je do danas najviše proučen i ubačen je u veliki broj različitih biljnih vrsta (Tabela 2). Eksperimenti sa transgenim biljkama ili veštačkim podlogama koje su sadržavale ovaj inhibitor pokazali su da CpTI utiče na veliki broj različitih insekata. Transgeni duvan u kome je eksprimiran *CpTI* testiran na poljima Kalifornije, uzrokovao je značajan porast u smrtnosi larvi *Helicoverpa zea*, ali je stepen zaštite i dalje bio nešto niži u poređenju sa duvanom koji je ekspimirao skraćeni Bt toksin (Hoffmann i sar. 1992).

Do danas veliki broj različitih IP gena je identifikovan i ubačen u različite biljne genome, pre svega useve (Tabela 2). Najviše je inhibitora serinskih proteinaza izolovanih iz biljaka familija *Fabaceae*, *Solanaceae* i *Poaceae*. U velikom broju dokumentovanih slučajeva pokazano je da konstitutivna ekspresija IP gena u transgenim biljkama može da poveća stepen otpornosti na insekte.

**Tabela 2:** Primeri gena za biljne inhibitore proteinaza korišćenih kao transgeni u borbi protiv insekata štetočina

<b>IP</b>	<b>Biljka iz koje je gen izolovan</b>	<b>Transgena biljka</b>	<b>Ciljani insekt</b>	<b>Referenca</b>
<b>PIN2</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	duvan	<i>Manduca sexta</i>	Johnson i sar. 1989
		duvan	<i>Chrysodeixis eriosoma</i>	McManus i sar. 1999
		pirinač	<i>Chilo suppressalis</i>	Bu i sar. 2006
		topola	<i>Plagiodera versicolora</i>	Klopfenstein i sar.1997
		pirinač	<i>Sesamia inferens</i>	Duan i sar. 1996
<b>NaPI</b>	<i>Nicotiana glauca</i>	grašak	<i>Plutella xylostella</i>	Charity i sar. 1999
		jabuka	<i>Epiphyas postvittana</i>	Maheswaran i sar.2007
<b>KTI3</b>	<i>Glycine max</i>	krompir	<i>Spodoptera litoralis</i>	Marchetti i sar. 2000
<b>BTI</b>	<i>Hordeum sativum</i>	pirinač	<i>Sitophilus oryzae</i>	Alfonso-Rubi 2003
		duvan	<i>Spodoptera exyguata</i>	Lara i sar. 2000
		pšenica	<i>Sitotroga cerealella</i>	Alpeter i sar. 1999
			<i>Spodoptera lituralis</i>	
<b>CpTI</b>	<i>Vigna unguiculata</i>	duvan	<i>Helicoverpa virescens</i>	Hilder i sar. 1987
		duvan	<i>Spodoptera litura</i>	Sane i sar. 1997
		pamuk	<i>Helicoverpa armigera</i>	Li i sar. 1998
		jabuka	više insekata	James i sar. 1993
		jagoda	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Graham i sar. 1997
		karfiol	<i>Pieris rapae</i>	Lu i sar. 2005
		pirinač	<i>Chilo suppressalis</i>	Xu i sar. 1996
			<i>Sesamia inferens</i>	
		pšenica	<i>Sitotroga cerealella</i>	Bi i sar. 2006
<b>SKTI</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	duvan	<i>Spodoptera litura</i>	McManus i sar. 1999
			<i>Helicoverpa armigera</i>	Nandi i sar. 1999
		krompir	<i>Spodoptera littoralis</i>	Marchetti i sar. 2000
		topola	<i>Lymantria dispar</i>	Confalonieri 1998
<b>TI</b>	<i>Ipomea batata</i>	duvan	<i>Spodoptera litura</i>	Yeh i sar. 1997
		karfiol	<i>Plutella xylostella</i>	Ding i sar. 1998

Tabela 2: nastavak

IP	Biljka iz koje je gen izolovan	Transgena biljka	Ciljani insekt	Referenca
MTI-2	<i>Brassica nigra</i>	duvan	<i>Spodoptera littoralis</i>	De Leo i sar. 1998
		Arabidopsis	<i>Spodoptera littoralis</i>	De Leo i sar. 1998
			<i>Mamestra brassicae</i>	De Leo i sar. 2001
			<i>Plutella xylostella</i>	
OC-I	<i>Oryza sativa</i>	topola	<i>Chrysomela tremulae</i>	Leple i sar. 1995
		krompir	<i>Myzus persicae</i>	Gatehouse i sar. 1996
			<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Cloutier i sar. 2000
OC-II	<i>Oryza sativa</i>	lucerka	<i>Phytodecta fornicata</i>	Ninković i sar. 2007
cisPI	<i>Arabidopsis thaliana</i>	topola	<i>Chrysomela populi</i>	Delledone i sar. 2001
CC-I	<i>Zea mays</i>	pirinač	<i>Sitophilus zeamais</i>	Irie i sar. 1996
PCPI	<i>Solanum tuberosum</i>	pirinač	<i>Chilo suppressalis</i>	Quilis i sar. 2007
TCDI	<i>Lycopersicon esculentum</i>	paradajz	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Brunelle i sar. 2004

Inhibitori serinskih proteinaza: PIN2, NaPI, KTi3, BTI, CpTI, SKTI, TI, MTI-2

Inhibitori cisteinskih proteinaza: OC-I, OC-II, cisPI, CC-I

Inhibitori ostalih proteinaza: PCPI, TCDI

Inhibitori proteinaza takođe pokazuju i veoma širok spektar aktivnosti protiv nekih drugih štetočina, kao što su nematode, patogene gljive, bakterije, pa čak i virusi. Do danas je u više slučajeva potvrđeno ovo dejstvo. Na primer, pokazano je da CpTI veoma negativno deluje na intenzivno rasprostranjene vrste nematoda *Globodera pallida*, *G. tabaccum* i *Meloidogyne incognita* (Williamson i Hussey 1996), kao i inhibitorno dejstvo BBWI tripsinskog inhibitora iz heljde na klijanje spora i rast micelija gljiva *Alternaria alternata* (Dunaevskii i sar. 1997). Elektroforetskom analizom potvrđeno je da proteinaze nematoda roda *Meloidogyne* formiraju veoma čvrst kompleks sa orizacistatinima I i II, cisteinskim inhibitorima poreklom iz pirinča (Michaud i sar. 1996). Još 1976. uočeno je da tripsinski i himotripsinski inhibitori izolovani iz nekoliko vrsta biljaka mogu da umanje aktivnost egzogenih proteinaza oslobođenih u filtrate tečnih kultura fitopatogene gljive *Fusarium solani* (Mosolov i sar. 1976). U radu Pautot i sar. (1991) pokazano je da inokulacija listova paradajza patogenom bakterijom

*Pseudomonas syringe* dovodi do akumulacije informacionih ribonukleinskih kiselina (iRNK) inhibitora serinskih proteinaza I i II. Uočena je razlika između systemske indukcije ovih gena nakon mehaničkog povređivanja i znatno slabijeg odgovora nakon bakterijske infekcije. Kod transgenih biljaka duvana u kojima je eksprimiran inhibitor cisteinskih proteinaza pokazana je čak i povećana otpornost prema veoma rasprostranjenim biljnim virusima iz roda *Potyvirus* (Gutierrez-Campos i sar. 1999).

Poređenjem insekticidnog dejstva IP u različitim redovima insekata sa drugim insekticidnim proteinima, uočava se njihov široki spektar delovanja. Dok su različiti Bt toksini, ali i enzimi poput hitinaza ili inhibitora  $\alpha$ -amilaza, delotvorni samo prema pojedinačnim redovima insekata, inhibitori serinskih proteinaza, na primer, deluju na digestivne sisteme skoro svih redova insekata iz kojih najznačajnije štetočine dolaze (Tabela 3).

**Tabela 3:** Aktivnost biljnih insekticidnih proteina u različitim redovima insekata štetočina

	<i>Lepidoptera</i>	<i>Coleoptera</i>	<i>Hemiptera</i>	<i>Orthoptera</i>
<b><i>Inhibitori serinskih proteinaza</i></b>	+	+	-	+
<b><i>Inhibitori cisteinskih proteinaza</i></b>	-	+	-	
<i>Lektini</i>	+	+	+	
<i>Inhibitori <math>\alpha</math>-amilaza</i>	+	+	-	
<i>Hitinaze</i>	+		-	
<i>Bt toksini</i>				
<i>cry 1</i>	+	-	-	
<i>cry 3</i>	-	+	-	

\*Preuzeto i modifikovano iz: Hilder i Boulter (1999).

### 1.3.2. Uloga promotora u heterolognoj ekspresiji IP

Nedugo pošto su prvi IP transgeni eksprimirani u heterologim biljnim genomima i pošto je nedvosmisleno potvrđen negativan uticaj njihovih produkata na insekte ili patogene biljaka, postalo je jasno da konstitutivna ekspresija insekticidnih agenasa ipak može imati nekoliko nepovoljnih efekata koji mogu ugroziti efikasnost ovog pristupa. Kontinuirana ekspresija gena i sinteza rekombinantnih proteina, čak i u trenucima kada biljka nije napadnuta insektima, pre svega je metabolički i energetska vrlo skupa. Zbog velikog utroška gradivnih elemenata i energije na sintezu heterolognih produkata, primarni metabolizam trpi i nije retka pojava izmenjene morfologije i fiziologije ovih transgenih biljaka u odnosu na netransformisane, kao i smanjivanja prinosa kod poljoprivrednih kultura. Takođe, stalnim prisustvom visokih koncentracija insekticidnih agenasa postiže se trenutno željeni efekat na ciljane insekte, ali je i selektivni pritisak na populacije štetočina veliki te je pojava otpornosti kod insekata veoma česta. Ova bojazan posebno se odnosi na konstitutivnu akumulaciju Bt toksina u transgenim biljkama (Huang i sar. 1999). Istovremeno na ovaj način povećava se i verovatnoća negativnog uticaja na druge insekte, korisne za samu biljku, kao što su oprašivači ili insekti predatori štetočina (Babendreier i sar. 2008; Gatehouse 2011). Istraživanja Hilbeck i sar. (1998) pokazala su da je parazitni insekt *Chrysoperla rufilabris*, nakon ishrane na larvama *Ostrinia nubilalis* i *Spodoptera littoralis* koje su se hranile Bt kukuruzom ili veštačkom hranom u koju je Cry1Ab toksin bio uključen u visokim koncentracijama, pokazavao povećan stepen smrtnosti i odlaganje razvića.

Da bi se prevazišli ovi i slični problemi vezani za konstitutivnu ekspresiju, naučnici su shvatili da je najpoželjnije da se insekticidni agensi eksprimiraju i akumuliraju u biljkama u odgovarajućim koncentracijama, na mestima i u trenutku kada dođe do napada herbivora, tj. onda kada je neophodno da se aktivira odbrambeni sistem. Regulaciju ekspresije gena moguće je vršiti u toku samog procesa transkripcije, preko promotora. Promotori su regulatorne sekvence gena, koji se nalaze uzvodno (ka 5' regionu) od kodirajućih regiona, a omogućavaju

inicijalno vezivanje proteina uključenih u inicijaciju transkripcije, pre svega RNK polimeraze, ali i transkripcionih faktora koji regulišu aktivnost same polimeraze. Oni su stoga odgovorni kako za pokretanje, tako i za sprečavanje transkripcije (Potenza i sar. 2004).

Tokom godina brojni promotori izolovani su iz različitih organizama i primenjeni u genetičkim transformacijama biljaka. Međutim, najveći broj promotora koji se i danas koristi u pokušajima unapređivanja biljnih genotipova jesu konstitutivni. Takođe, često eksploatisani promotori kao što su CaMV 35S ili CsVMV, poreklom su iz nebiljnih genoma, pre svega virusnih. Korišćenje promotora iz filogenetski udaljenih organizama koji vode ka izuzetno snažnoj ekspresiji često može da povećava verovatnoću gubitka aktivnosti transgena, usled pojave koja se zove 'utišavanje' gena (eng. *gene silencing*; van der Krol i sar. 1990).

Da bi se izbegla konstitutivna ekspresija insekticidnih transgena zbog gore navedenih potencijalnih problema, često su korišćeni promotori koji nisu aktivni u svim ćelijama organizma, već se aktiviraju samo na određenim mestima, specifičnim tkivima ili organima. Jedan od primera tzv. tkivno-specifičnih promotora jeste floem-specifični RSs1 promotor, kojim je uspešno regulisana ekspresija insekticidnih proteina na mestu napada insekata koji se hrane floemskim sokovima (Rao i sar. 1998). Stavljanjem gena koji kodira lektine pod kontrolu ovog promotora dovelo je do smrtnosti kod čak 40% afida koje su se hranile sokovima transgenih linija duvana u kojima je ovaj gen ekspimiran (Kato i sar. 2010). Ipak i ovi promotori ne pružaju u potpunosti kontrolu nad ekspresijom kakva je poželjna. Iako se geni ekspimiraju na odgovarajućem mestu, ova ekspresija je i dalje konstitutivna, te se rekombinantni protein sintetiše bez obzira da li je došlo do napada insekta ili nekog drugog patogena. Takođe postoje i sumnje da većina ovih promotora kada se ubace u heterologni organizam mogu promeniti obrazac ekspimiranja (Potenza i sar. 2004).

Stoga se smatra da bi ipak najpogodniji promotori za kontrolu ekspresije transgena pri napadu herbivornih šetočina bili inducibilni promotori. Veliki je broj stimulusa koji mogu da indukuju regulatorne sekvence i aktiviraju ekspresiju gena

biljaka. To su pre svega stimuli koji dolaze iz spoljašnje sredine, kao što su niska ili visoka temperatura, UV zračenje, visok salinitet podloge, teški metali, vodni deficit ili pak plavljenje, ali i povrede koje biljkama nanose herbivorni insekti ili drugi patogeni. Dokazano je da kada se biljka povredi mehanički ili to urade herbivori, dolazi do indukcije velikog broja gena koji učestvuju u različitim procesima odbrane. Od 8200 analiziranih gena iz genoma *Arabidopsis*-a kod čak 8% njih došlo je do promena u nivou akumuliranih iRNK molekula nakon povređivanja (Cheong i sar. 2002). Upravo u regulaciji ovih gena učestvuju promotori koji se aktiviraju povređivanjem (eng. *wound-inducible promoters*) i za koje se smatra da su najpogodniji za kontrolu ekspresije insekticidnih transgena kod biljaka.

Do sada najbolje proučeni promotori koji se aktiviraju povređivanjem jestu *wun1*, *win1* i *pin2* iz krompira, kao i *win3.12* iz topole, koji se odlikuju zanemarljivo malom konstitutivnom ekspresijom, ali brzom i snažnom reakcijom na povređivanje (Logemann i sar. 1989; Keil i sar. 1989; Xu i sar. 1993). U okviru tzv. *cis*-regulatornih elemenata, za koje se smatra da kod promotora predstavljaju mesta uspostavljanja specifičnih regulacija, kod *wun1* i *win1* promotora uočene su dve visoko homologne sekvence sa čak 85% i 71% identičnih nukleotida (Siebertz i sar. 1989). Za ove sekvence veruje se da predstavljaju mesta indukcije povređivanjem.

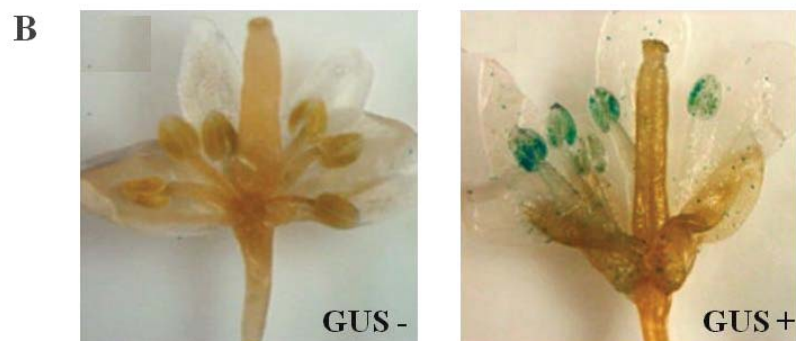
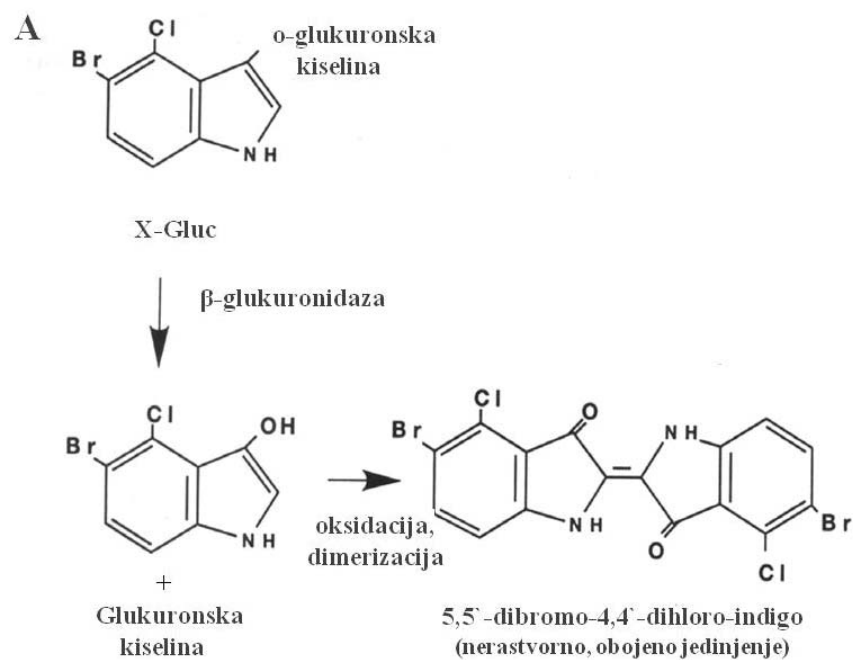
U Tabeli 4 dat je pregled nekih od najčešće korišćenih inducibilnih promotora, koji su sa dosta uspeha ubačeni u različite biljne genotipove u cilju povećanja otpornosti prema štetočinama.



**Tabela 4:** Biljni promotori koji se aktiviraju povređivanjem i koji su korišćeni u genetičkim transformacijama

	<i>Inducibilni stimulus</i>	<i>Transgena biljka</i>	<i>Referenca</i>
<i>win3.12T</i>	mehaničko povređivanje, elicitor, patogena gljiva	krompir	Yevtushenko i sar. 2004
<i>osm</i>	mehaničko povređivanje	šećerna repa	Snyder i sar. 1999
<i>pinII</i>	mehaničko povređivanje	pirinač	Duan i sar. 1996
<i>rd29A</i>	suša, visok salinitet, hladnoća	kupina	Checker i sar. 2012
<i>sporamin</i>	mehaničko povređivanje, MeJA	slatki krompir	Wang i sar. 2002
<i>OsABA2</i>	ABA, visok salinitet, suša	pirinač	Rai i sar. 2009

GUS reporter sistem jedan je od najčešće korišćenih u analizama aktivnosti promotorskih sekvenci (Jefferson i sar. 1987; Kumar i sar. 2009; Bazzini i sar. 2009). Ovaj sistem podrazumeva praćenje ekspresije GUS (*uidA*) reporter gena koji se nalazi pod kontrolom ispitivanog promotora. Ovaj gen poreklom iz bakterije *Escherichia coli* kodira enzim  $\beta$ -glukoronidazu, koji je uključen u proces razlaganja molekula glukuronida. Jedan od najčešće korišćenih supstrata za ovaj enzim koji se koristi u histohemijskim analizama je X-Gluc (5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronid). Ovaj supstrat se nakon delovanja  $\beta$ -D-glukoronidaze razlaže na molekul glukuronske kiseline i molekul hloro-bromoindiga, koji se zatim oksidacijom dimerizuje i formira nerastvorni plavi precipitat dihloro-dibromoindigo (Slika 4A). Pojava plave boje ukazuje na aktivnu ekspresiju GUS gena, odnosno na aktivnost promotora pod čijom se kontrolom ovaj gen nalazi, s obzirom da se smatra da kod viših biljaka ovaj enzim nije prisutan (Jefferson 1987), te sva aktivnost potiče iz transgena ubačenog metodama genetičkog inženjeringa (Slika 4B).



**Slika 4.** GUS bojena reakcija. A) Kao dokaz ekspresije GUS reporter gena prati se pojava plavog nerastvornog precipitata, proizvoda enzimske razgradnje X-Gluc supstrata od strane enzima  $\beta$ -glukuronidaze. B) Histoemijsko potvrđivanje ekspresije GUS gena kod netransformisanih GUS- i transgenih GUS+ biljaka. *Slike transgenih biljaka preuzete iz: Wang i sar. (2009)*

## 1.4. ŠEĆERNA REPA

### Klasifikacija:

Carstvo	Plantae
Razdeo	Magnoliophyta
Klasa	Magnoliopsida
Podklasa	Caryophyllidae
Red	Caryophyllales
Familija	<i>Chenopodiaceae</i>
Rod	<i>Beta</i>
Vrsta	<i>Beta vulgaris</i> L.

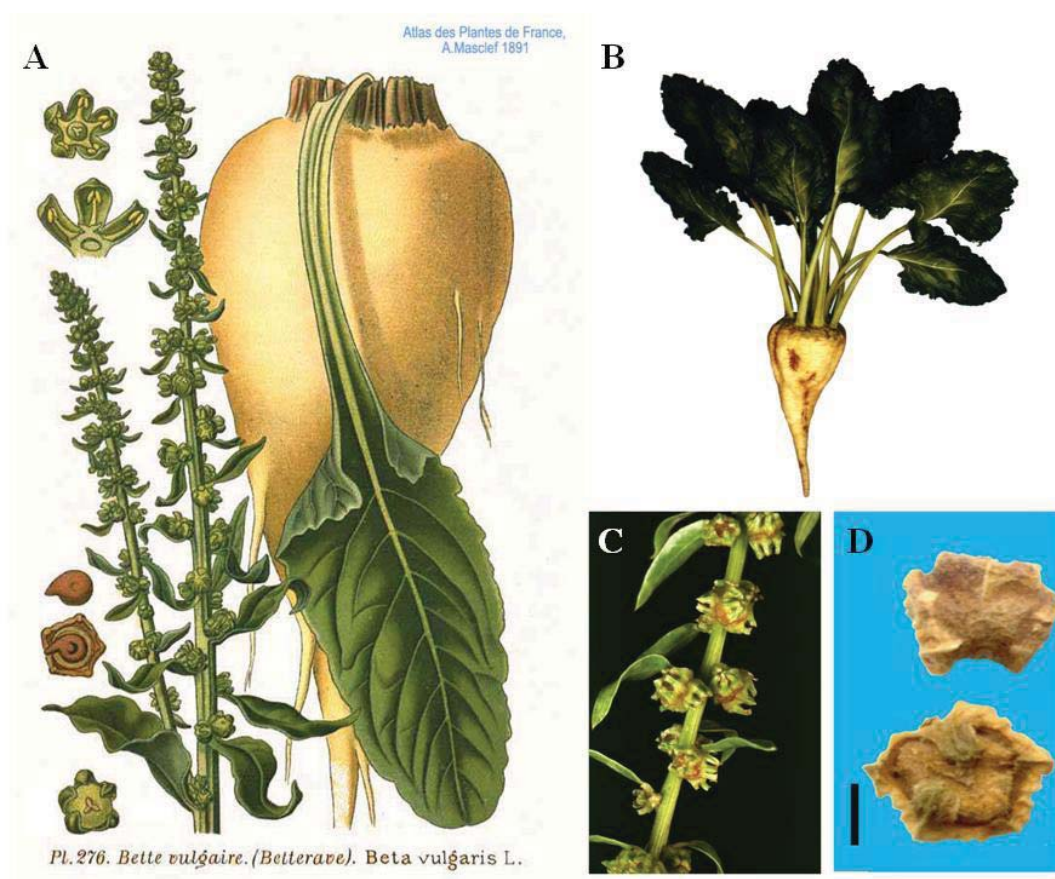
Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.) predstavlja veoma važnu poljoprivrednu i industrijsku kulturu koja se gaji u umerenim regionima, uglavnom severne hemisfere. Ovo je jedna od dve biljne vrste iz kojih se industrijskim procesima dobija kristalni ugljeni-hidrat saharoza, koji se kao konzumni šećer koristi u ljudskoj ishrani. Dok se kod većine drugih biljnih vrsta ugljenik skladišti u formi skroba, samo kod šećerne repe i šećerne trske glavnu rezervu predstavlja saharoza. Godišnje se iz korenova šećerne repe dobije oko 35% od ukupne količine proizvedenog šećera. Najznačajniji proizvođači su Francuska, SAD i Nemačka, sa po više od 25 miliona tona godišnje.

### 1.4.1. Osnovne karakteristike šećerne repe

Šećerna repa pripada familiji *Chenopodiaceae*, u okviru koje se nalazi 105 rodova sa 1400 vrsta (Watson i Dallwitz 1992). To su dikotiledone, najčešće zeljaste biljke. Rod *Beta* sadrži 15 uglavnom ekonomski važnih poljoprivrednih i industrijskih kultura, kao što su šećerna repa, cvekla, stočna repa i blitva.

Kao dvogodišnja vrsta, šećerna repa tokom prve godine razvija sočan koren u kome se skladište velike količine šećera (Slika 5). Ovaj šećer namenjen je potrebama same biljke tokom zime, ali se rezerve prilično isprazne tokom druge

godine u kojoj biljka razvija polne organe u kojima se nakon oprašivanja vetrom i oplodjenja stvara seme. Kada se gaji kao poljoprivredna kultura, šećerna repa se vadi iz zemlje tokom jeseni iste godine (Duke 1983). Sadi se uglavnom u rano proleće i tokom te prve vegetacijske sezone razvija ovalne listove koji formiraju guste zelene do tamno zelene rozete koje polaze sa kratkog podzemnog izdanka. Neposredno ispod izdanka razvija se sočan koren ovalnog do okruglog oblika (Slika 5B). Tokom druge sezone razvijaju se stabljike dužine 1,2-1,8 m, na kojima se razvijaju guste racemozne cvasti (Forster i sar. 1997; Slika 5C). Za razvijanje semena (Slika 5D) u drugoj godini neophodan je period vernalizacije na temperaturama 4-7°C da bi se početkom proleća reproduktivna faza inicirala.



**Slika 5.** Biljke šećerne repe. A) Botanički prikaz vegetativnih i reproduktivnih organa šećerne repe; B) jednogodišnja biljka; C) racemozna cvast sa cvetovima; D) seme. *Slike preuzete iz : A) Atlas des Plantes de France, A. Masclaf 1891; B) <http://www.intlawgrrls.com/2010/08/beets-banned.html>; C) <http://www.biologie.uni-hamburg.de>; D) <http://www.css.msu.edu/cor/CropSeeds>; bar predstavlja 2 mm*

Biljke šećerne repe se razvijaju veoma brzo i već pet dana nakon sejanja iz semena se pojavljuju klijanci. Koren raste izuzetno brzo i može dostići i do 30 cm pre nego što se pojavi prvi pravi list. Maksimalnu veličinu i prinos koren šećerne repe dostiže 20 do 24 nedelje nakon sejanja. Tokom ovog perioda vrši se konstantna translokacija ugljenih hidrata iz listova u kojima nastaju u procesu fotosinteze, do korena. Saharoza se skladišti primarno u koncentričnim krugovima vaskularnih tkiva koja se razvijaju iz sekundarnog kambijuma tokom rane faze razvića korena i u parehnimskim ćelijama koje se tokom daljeg rasta uvećavaju.

Šećerna repa predstavlja jednu od najmlađih poljoprivrednih kultura, jer je intenzivno gajenje i korišćenje repe počelo pre svega 250 godina (Kovačev i sar. 2008). Prvi savremeni kultivari šećerne repe nastali su procesom selekcije i oplemenjivanja stočne repe polovinom 18. veka u Nemačkoj. Ipak, smatra se da su još u drevnom Egiptu biljke preteče savremene šećerne repe korišćene u ishrani (Smigocki i sar. 2008a). Značaj šećerne repe kao izvora saharoze nagovestio je još 1747. godine nemački hemičar Andreas Marggraf, koji je pokazao da se karakteristike kristala dobijenih iz samlevenih korenova ne razlikuju po svojim karakteristikama od kristala iz šećerne trske. Njegov student Karl Achard, razvio je proces ekstrakcije šećera iz korena repe. Blokade uvoza šećerne trske u Evropu tokom Napoleonovih ratova stimulisali su, pre svega, proizvodnju i selekciju šećerne repe, ali i podizanje fabrika za proizvodnju šećera. Iz Evrope šećerna repa je vrlo uspešno preneti i na severnoamerički kontinent, gde su prve fabrike počele da se grade krajem 19. veka.

U tehnološkom procesu prerade korena šećerne repe osim belog konzumnog šećera dobija se i melasa (nekristalizovani šećer) koja se koristi u proizvodnji stočne hrane, kvasca i alkohola, kao i celuloza koja se koristi kao repin rezanac i predstavlja dodatak stočnoj hrani.

U poslednje vreme sve više se govori o šećernoj repi kao 'bioreктору' čiji se korenovi mogu koristiti za intenzivnu sintezu i akumulaciju nekih novih metabolita. Menzel i sar. (2003) pokazali su da se u transgenim 'hairy roots'

šećerne repe može sintetisati bakterijski poliestar poli(3-hidro kibutirat), PHB i to do čak 55 mg PHB/g suve mase korenova.

#### 1.4.2. Insekti štetočine šećerne repe

Tokom intenzivnog razvoja vegetativnih organa u prvoj godini, biljke šećerne repe često su napadnute od strane velikog broja različitih štetočina koji mogu drastično da umanje prinos. Osim brojnih virusa i patogenih gljiva, herbivorni insekti hrane se zelenom masom šećerne repe i time smanjuju fotosintetski potencijal i količinu sintetisanih šećera, ali i sočnim korenovima čime direktno nanose ogromne štete.

Spisak insekata štetočina sadrži po nekoliko predstavnika redova Lepidoptera – *S. exigua*, *Loxostege sticticalis*, *Euxoa* sp., Coleoptera – *Psylliodes punctulata*, *Silpha bituberosa*, veći broj buba iz familije *Elateridae*, i Diptera – *Pegomya hyosctami*, *Tetanops myopaeformis*. Osim njih još čitav niz generalnih herbivora štetočina može se hraniti šećernom repom i u nekim situacijama mogu dovesti do značajnih gubitaka *S. frugiperda*, *Autographa gamma*, *Mamestra brassicae*. U Srbiji na poljima pod šećernom repom još se sreću i *Bothynoderes punctiventris*, *Tanymecus dilaticollis*, i razne vrste sovica: *Lacanobia oleracea*, *Agrotis exclamationis* (Lange 1987).

Osnovna mera zaštite protiv insekata štetočina i kod šećerne repe jeste aplikacija hemijskih pesticida uglavnom neposredno posle sejanja ili u periodima najveće aktivnosti herbivora. Takođe, i procesi selekcije genotipova šećerne repe koji se odlikuju povećanom otpornošću prema insektima zauzimaju veoma značajno mesto u pokušajima rešavanja problema izazvanih ovim štetočinama. Međutim, kao i kod velikog broja drugih kultura metode klasičnog oplemenjivanja i ovde su suočene sa nizom problema koji ovaj pristup ugrožavaju. Pre svega, zbog svog dvogodišnjeg životnog ciklusa potrebno je dosta vremena za svaki selekcionarni ciklus. I vernalizacija, koja je neophodna da bi se reproduktivna faza inicirala može predstavljati značajan problem, jer se obično procesi selekcionisanja odvijaju na

otvorenom gde je nemoguće kontrolisati temperaturne uslove i sprečiti preterano ili pak nedovoljno hlađenje (Smigocki i sar. 2008a).

Iako se smatra da divlji rođaci mogu predstavljati dobru osnovu u procesima selekcionisanja i oplemenjivanja jer su dobar izvor gena koji nose rezistentnost prema bolestima ili štetočinama (Lewellen 1992; Panella i Lewellen 2006), ipak većina divljih srodnika šećerne repe su ili nekultivisane korovske biljke ili imaju vrlo izraženu egzotičnu germplazmu, te se ne mogu direktno koristiti u komercijalnom oplemenjivanju. Divlji srodnici se uglavnom koriste kao donori poželjnih gena u pre-bridging programima. Međutim, većina vrsta u okviru roda *Beta* iako su po poreklu, a pojedine vrste i broju hromozoma bliske, imaju vrlo izražene genetičke barijere koje onemogućavaju lako ukrštanje i dobijanje hibridnog potomstva (Kovačev i sar. 2008).

Da bi se prevazišle napred navedene poteškoće vezane za rešavanje problema sa insektima štetočinama, insekticidima ili oplemenjivanjem, naučnici se sve više okreću savremenijim biotehnološkim pristupima. Intenzivirana je potraga za pogodnim kandidat-genima čijom se ekspresijom može povećati otpornost komercijalnih genotipova šećerne repe prema insektima štetočinama i time smanjiti gubici značajni za industrijsku proizvodnju šećera.

### **1.5. INHIBITOR SERINSKIH PROTEINAZA ŠEĆERNE REPE - *BvSTI***

Pokušaji pronalaženja pogodnih kandidat-gena uglavnom podrazumevaju formiranje tzv. model sistema koji uključuju biljku domaćina i insekta štetočinu. Različitim metodama molekularne biologije najčešće se prate transkripcioni profili kod oba organizma, koji mogu pokazati promene u ekspresiji gena kao odgovor na ovu interakciju. Profilisanje gena čija je aktivnost modulirana ishranom moljca *M. sexta* kod duvana *N. attenuata* pokazalo je da je čak 63% od svih ispitivanih gena imalo modifikovanu ekspresiju nakon napada larvi (Hui i sar. 2003). Detaljnim analizama pokazano je da je ekspresija većine ovih gena, uključenih u različite mehanizme odbrane, bila značajno povišena.

Za formiranje sličnog modela kod šećerne repe, kojim bi se otkrili potencijalni odbrambeni geni i utvrdili mehanizmi odbrane, Puthoff i Smigocki (2005, 2007) su odabrali jednog od najznačajnijih insekata štetočina na teritoriji Severne Amerike, Dipteru *Tetanops myopaeformis* Roder (eng. *sugar beet root magott*, SBRM; Slika 6).

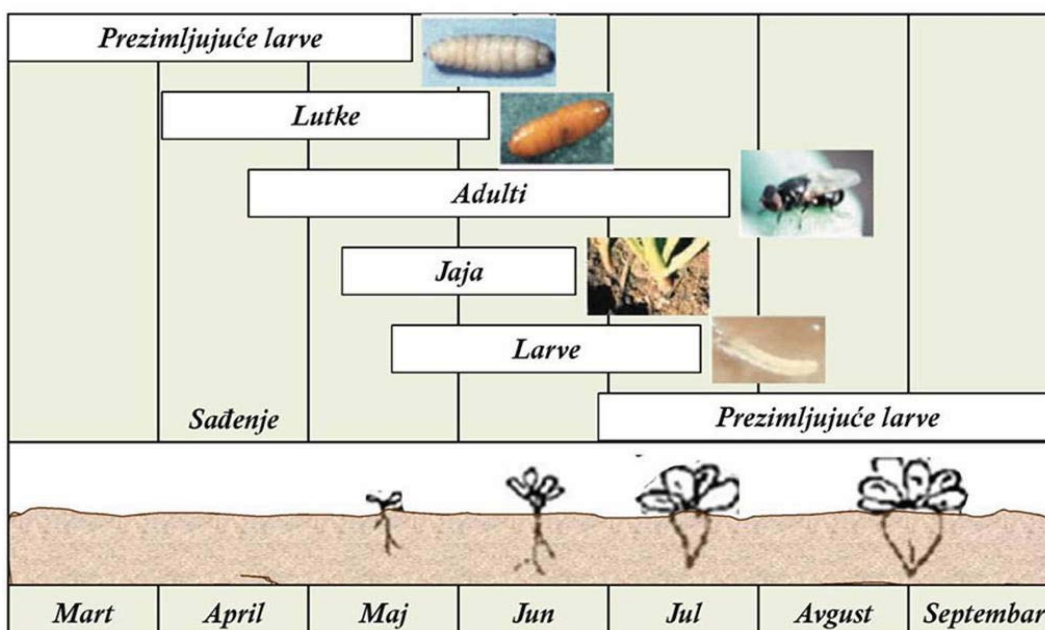


**Slika 6.** Stupnjevi razvika insekta *Tetanops myopaeformis* Roder, značajne štetočine na usevima šećerne repe. S leva na desno: tek izlegla larva, prezimljujuća larva u trećem larvenom stadijumu, pupa i adult. Bar predstavlja 1 cm. Preuzeto iz: Gianessi (2009)

Larve ovog insekta pronađene su na više od polovine površina zasađenih šećernom repom na teritoriji SAD i Kanade. Smatra se ozbiljnom štetočinom još od 20-tih godina XX veka, a danas je zaslužan za gubitke od 10% do čak 100% na inficiranim poljima (Campbell i sar. 1998). Razviće ovog insekta odvija se u potpunosti na poljima šećerne repe i prati rast vegetativnih organa šećerne repe (Slika 7). Insekt prezimljuje u stupnju larvi 3. stadijuma iz kojih se u rano proleće formiraju pupe. Posle par nedelja izlegu se adulti koji polažu jaja u površinskim slojevima zemlje neposredno pored mladih izdanaka šećerne repe. Već nakon 5-7 dana iz jaja se ispile nove larve koje počinju sa intenzivnom ishranom na mladim korenovima praveći značajna oštećenja tkiva obično u vidu kanala (Chirumamilla i sar. 2008) i uzrokujući delimično do potpuno oštećenje korenova, koje se manifestuje uvenulošću lisne rozete, ali i rastom sekundarnih korenova. Na oštećenim korenovima vrlo su česte invazije sekundarnih patogena, kao što su *Erwinia betavasculorum*, *Aphanomyces cochlioides* i *Rhizoctonia solani* (Campbell i sar. 2008; Smigocki i sar. 2008a; Campbell i sar. 1998). Sama infekcija bakterijama



roda *Erwinia* može da smanji prinos šećera za 10–15% (Smigocki i sar. 2008a). Kod nešto starijih biljaka ishranom prave tunele na već oformljenim korenovima, što takođe dovodi do značajnog smanjenja prinosa.



**Slika 7.** Uporedni razvoj insekata SBRM sa rastom biljaka šećerne repe tokom prve vegetativne sezone.

Prvi eksperimenti izvedeni u cilju odabira genotipova šećerne repe otpornih na SBRM larve započeti su još 1974. godine (Theurer i sar. 1982). Do danas su registrovana tri genotipa sa umerenim nivoom otpornosti: F1016, F1015 i F1024 (Campbell i sar. 2000; 2010). Međutim, potpuna otpornost na SBRM još uvek nije dobijena i kod najotpornijeg genotipa F1016 gubici nastali ishranom larvi SBRM za svega 40% su manji nego kod komercijalnih osetljivih genotipova (Smigocki i sar. 2008a). Istovremeno ove dostupne linije se odlikuju nešto lošijim agronomskim karakteristikama, jer tokom ovako usmerene selekcije može doći do gubitka nekih od agronomski poželjnih osobina zajedno sa osobinama koje se selekcijom favorizuju. Prinos jednog od SBRM otpornih genotipova, F1015, je

smanjen za čak 25% u odnosu na druge komercijalne hibride (Campbell i sar. 2000).

Upotreba pesticida, uglavnom u trenutku sadnje kao i u trenutku najintenzivnije aktivnosti adulta, osnovna je mera kontrole. Ipak, smatra se da efikasne mere zaštite i dalje ne postoje s obzirom da i pored upotrebe pesticida ovaj insekt i dalje dovodi do velikih problema (Campbell i sar. 2000).

Za eksperimente u kojima je praćena interakcija sa larvama SBRM odabrani su F1016, kao umereno otporan genotip i F1010, genotip koji se pokazao kao prilično osetljiv prema ovim larvama u eksperimentima Campbell i sar. (2000; 2010).

Već u prvim eksperimentima Smigocki i sar. (2006) u kojima je praćena ishrana larvi SBRM na 17 dana starim korenovima ova dva genotipa, primećeno je da larve pokazuju drugačije obrasce 'ponašanja' tokom ishrane. Larve su se grupisale oko osetljivih F1010 korenova, formirajući guste agregacije na samim korenovima, dok su one kojima su bili ponuđeni rezistentni F1016 korenovi bile više rasute po petri kutiji u kojoj se nalazio koren, a samo neke od njih bile su na samim korenovima.

Potragu za genima čija je ekspresija modulirana ishranom SBRM larvi i koji mogu biti odgovorni za povišen stepen rezistentnosti F1016 genotipa, Puthoff i Smigocki (2007) sprovedli su evaluacijom genske ekspresije metodom supresivne hibridizacije (eng. *suppression subtractive hybridization*, SSH). Ova hibridizacija podrazumeva poređenje komplementarnih DNK (cDNK) fragmenata koji su grupisani u tzv. biblioteke gena (eng. *gene library*) između različitih uzoraka (Diatchenko i sar. 1996). Ovaj metod često je korišćen u mnogim sistemima za identifikaciju gena čija se ekspresija menja (Guilleroux i Osbourn 2004; Wang i sar. 2005). U slučaju potrage za genima čija se ekspresija menja nakon napada larvi SBRM, cDNK biblioteka dobijena iz korenova genotipa F1016 na kojima su se hranile larve SBRM upoređena je sa cDNK bibliotekom iz takođe povređenih osetljivih F1010 korenova.

Nakon hibridizacije cDNK biblioteka iz ova dva uzorka uočeno je da ishrana larvi menja ekspresiju kod čak 150 EST sekvenci (eng. *expressed sequence tags*, EST). Većina aktivnih gena bila je sa povišenim nivoom ekspresije, ukazujući na moguću umešanost u neki od mehanizama odbrane biljaka šećerne repe. Nakon identifikacije ovih gena jasno se izdvojila grupa tzv. odbrambenih gena, čiji produkti učestvuju u različitim mehanizmima odbrane biljaka, koji su se eksprimirali samo u F1016 genotipu nakon napada SBRM larvi. Za gene koji kodiraju polifenol oksidazu,  $\beta$ -glukozidazu i glutation S transferazu već je bilo pokazano da im ekspresija može biti regulisana različitim patogenima ili insektima herbivorima (van de Ven i sar. 2000; Reymond i sar. 2000; Voelckel i Baldwin 2004). Među odbrambenim genima bila je i jedna novoidentifikovana sekvenca koja je pokazivala veliku sličnost sa nekim od gena koji kodiraju IP. Ova sekvenca koja se u bazi GenBank (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, SAD) nalazi pod brojem DV501688, pokazivala je strukturnu sličnost sa inhibitorima serinskih proteinaza Kunitz tipa, i to posebno *LeMir* genom iz paradajza čiju je ekspresiju moguće indukovati napadom nematoda (Brenner i sar. 1998). Ovo otkriće privuklo je posebnu pažnju s obzirom da je od ranije bilo poznato da se u digestivnom sistemu larvi SBRM nalaze upravo serinske proteinaze koje bi mogle biti inhibirane produktom ovog gena. Naime, analizom sastava digestivnih enzima larvi SBRM sakupljenih sa inficiranih polja, utvrđeno je prisustvo tri klase proteinaza: serinskih, cisteinskih i aspartičnih, od kojih su serinske i aspartične bile dominantne u odnosu na slabo zastupljene cisteinske (Wilhite i sar. 2000). Serinske proteinaze pokazivale su najintenzivniju aktivnost u baznoj sredini na pH vrednostima od 8,5 dok su druge dve klase bile najaktivnije u kiseljoj sredini na pH 2,5. Ove proteinaze bile su uspešno blokirane sintetičkim, ali i nekim biljnim IP kao što su tripsin-himotripsin inhibitor iz soje i inhibitor aspartičnih proteinaza iz tikve.

Novo-otkrivena sekvenca je nazvana *BvSTI* (eng. *Beta vulgaris* serin-type proteinase inhibitor). Inicijalna karakterizacija ekspresije *BvSTI* gena u transgenim 'hairy roots' šećerne repe, kao i u transgenom duvanu već je urađena (Smigocki i sar. 2008b, 2009). Pokazano je da u oba sistema ekspresija *BvSTI* gena i

akumulacija ovog IP povećava otpornost prema larvama *S. frugiperda*, *S. exigua* i *M. sexta*. Kod ovih larvi uočen je povećan stepen smrtnosti ili izmenjen kurs rastenja i razvića nakon ishrane transgenim listovima duvana ili korenovima šećerne repe.

Sve ove činjenice ukazuju da bi *BvSTI* gen, izolovan iz mladih korenova F1016 linije šećerne repe umereno otporne na larve SBRM, mogao biti korišćen u procesima unapređenja biljnih genotipova u cilju povećanja otpornosti na herbivorne insekte štetočine. Bolje razumevanje *in planta* ekspresije *BvSTI* gena u genotipovima šećerne repe otpornim na insekte dovešće do stvaranja efikasne strategije za korišćenje ovog gena u programima oplemenjivanja i biotehnološkog unapređivanja otpornosti.

## **2. CILJEVI RADA**

Osnovni cilj istraživanja bila je analiza ekspresija gena za inhibitor serinskih proteinaza *BvSTI* kod nekoliko genotipova šećerne repe, koji se međusobno razlikuju po stepenu otpornosti na larve SBRM. Upoređivanjem obrazaca i nivoa ekspresije sa stepenom otpornosti utvrdila bi se uloga ovoga gena u mehanizmima otpornosti i sagledale mogućnost korišćenja ovog gena u cilju borbe protiv insekata štetočina kod biljaka.

Realizacija ovog cilja izvršena je kroz nekoliko zadataka:

1. Analizirati obrazac i intenzitet ekspresije *BvSTI* gena nakon mehaničkog povređivanja kod četiri genotipa šećerne repe koji se međusobno razlikuju po stepenu otpornosti na larve štetočine korena *Tetanops myopaeformis* Roder.
2. Utvrditi nivo akumuliranih *BvSTI* proteina kao i njihovu inhibitornu aktivnost prema tripsinu u mehanički povređenim tkivima dva genotipa koji se međusobno najviše razlikuju po nivou ekspresije *BvSTI* gena.
3. Analizirati obrazac i intenzitet ekspresije *BvSTI* gena kod ova dva genotipa nakon povređivanja izazvanog ishranom larvi *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith.
4. Uporediti otpornost genotipova šećerne repe sa različitim stepenom ekspresije *BvSTI* gena na rast i razviće polifagnog insekta *S. frugiperda* J.E. Smith u *in vivo* biotestu.
5. Pratiti ekspresiju himeričnog reporter *BvSTI*pro-GUS gena u transgenim biljkama duvana tokom starenja, radi utvrđivanja obrasca i dinamike aktivnosti promotorskog regiona *BvSTI* gena.
6. Analizirati ekspresiju ovog himeričnog gena nakon mehaničkog povređivanja i povređivanja izazvanog ishranom larvi *S. frugiperda* J.E. Smith.

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

#### **3.1. PRAĆENJE EKSPRESIJE *BvSTI* GENA I AKUMULACIJE I AKTIVNOSTI *BvSTI* PROTEINAZNOG INHIBITORA U RAZLIČITIM GENOTIPOVIMA ŠEĆERNE REPE**

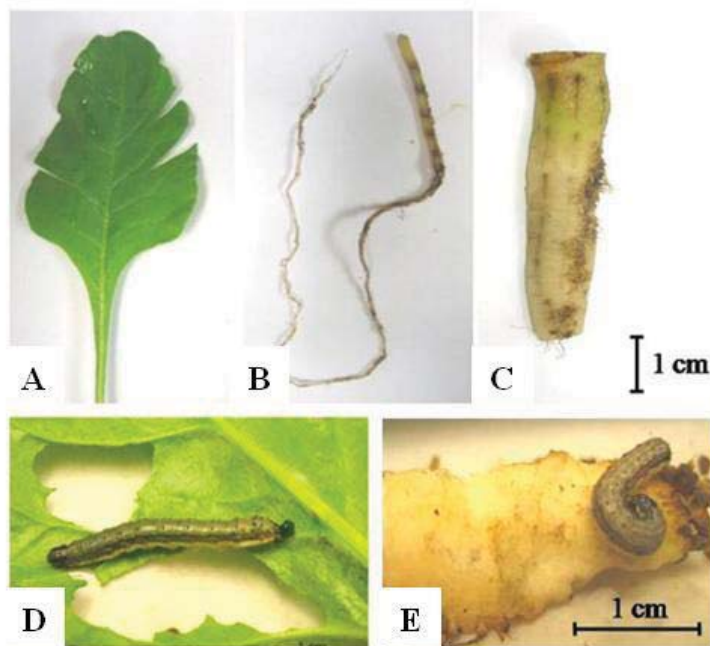
U cilju ispitivanja ekspresije *BvSTI* gena korišćena su četiri genotipa šećerne repe koji se međusobno razlikuju po stepenu osetljivosti na larve SBRM. Genotipovi F1016, F1015 i UT-8 su u eksperimentima oplemenjivanja i selekcije označen kao umereno otporni, dok F1010 predstavlja genotip osetljiv na SBRM (Campbell 1990; Campbell i sar. 2000).

##### **3.1.1. Biljni materijal**

Semena sva četiri genotipa dobijena su iz Sugarbeet and Potato Research Unit, USDA-ARS, Fargo, ND, SAD. Do trenutka upotrebe čuvana su u papirnim kesama, na temperaturi od +4°C. Pre sejanja semena su imbibovana u vodi tokom noći, na sobnoj temperaturi u mraku. Potom su posejana u mešavinu Pro-Mix supstrata (Premier Tech Horticulture, Quakertown, PA, SAD) i perlita u odnosu 3:1. Klijanci su gajeni u komori za gajenje biljaka (Environmental Growth Chambers, Chagrin Falls, OH, SAD) pod kontrolisanim uslovima sredine na temperaturi od 25 ± 2°C tokom dana i 20 ± 2°C tokom noći sa dužinom svetla od 16 sati. Nakon 4 nedelje, lepo razvijene biljčice su prebačene u staklaru i gajene na temperaturi od 25 ± 5°C tokom dana i 20 ± 3°C tokom noći sa prosečnom dužinom dnevne svetlosti od 15 sati. Biljke su đubrene mesečno fertilizatorom Osmocote (Scott's Miracle-Gro, Marysville, OH, SAD). Analiza ekspresije *BvSTI* gena urađena je na tkivima sakupljenim sa biljaka starih 6 nedelja i 3, 4 i 6 meseci. Analize proteina urađene su na biljkama starim 6 meseci.

**3.1.2. Mehaničko povređivanje tkiva šećerne repe**

Listovi sa biljaka šećerne repe u kojima je analizirana ekspresija *BvSTI* gena ili akumulacija i aktivnost *BvSTI* proteina mehanički su povređivani pravljenjem dva do četiri useka sa svake strane lista, izbegavajući provodne sudove. Svaki usek bio je dužine 1 cm (Slika 8A). Korenovi mladih, 6 nedelja starih biljaka, pritiskani su pincetom na svakih 5 mm čitavom dužinom (Slika 8B), dok su stariji korenovi povređivani pravljenjem 5 mm dugih i 2-3 mm dubokih useka po površini (Slika 8C). Sva povređivana tkiva su držana na navlaženom filter papiru. Uzorci su sakupljeni nakon 2, 6, 24, 48 i 72 h od trenutaka povređivanja, kao i neposredno pre povređivanja, i ovaj uzorak je obeležavan kao nulto vreme (0 h). Svi uzorci su odmah nakon sakupljanja potapani u tečni azot i čuvani na -80°C sve do trenutka analize. Za svaki uzorak načinjena su po dva biološka ponavljanja koja su predstavljala po jedan list uzet sa dve posebne biljke.



**Slika 8.** Povređivanje listova i korenova šećerne repe. Mehaničko povređivanje listova (A), mladih (B) i starijih korenova (C), kao i povređivanje listova (D) i korenova (E) izazvano ishranom larvi.

### **3.1.3. Povređivanje tkiva šećerne repe insektima**

U eksperimentima u kojima je praćena ekspresija *BvSTI* gena u listovima i korenovima šećerne repe nakon povređivanja insektima, korišćene su larve *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (eng. *fall armyworm*, FAW). Deset dana stare larve FAW, gajene na način opisan u odeljku 3.4.1, izgladnjivane su dva sata pre početka eksperimenata. Zatim je na svaki list ili koren, uzet sa 4 meseca starih biljaka i položen na vlažan filter papir u plastičnu petri kutiju, stavljena po jedna larva (Slike 8D i 8E). Uzorci povređenih biljnih tkiva su sakupljeni tokom 72 h od početka hranjenja larvi, u istim vremenskim tačkama u kojima su prikupljeni uzorci nakon mehaničkog povređivanja (2, 6, 24, 48 i 72 h). Uzorci su takođe trenutno zamrzavani i čuvani na -80°C. Po dva biološka ponavljanja su napravljena za svaki uzorak.

### **3.1.4. Izolacija RNK**

Ukupne RNK iz uzoraka listova i korenova šećerne repe, sakupljenih nakon mehaničkog povređivanja ili ishrane insekata, izolovane su korišćenjem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka). Izolacija iz tkiva samlevenog u sterilnim avanima uz pomoć tečnog azota, urađena je po uputstvima i protokolu proizvođača, sa uključenim tretmanom DNazom (RNase-Free DNase; Qiagen, Hilden, Nemačka). U ependorf tubicu ubačeno je po 100 mg usitnjenog tkiva i dodato 450 µl RLT pufera za liziranje ćelija, u koji je prethodno dodato po 10 µl β-merkaptoetanol na svakih 1 ml pufera. Potom je na kratko pufer izmešan sa tkivom na vorteksu. Da bi se biljni sadržaj što bolje razgradio sadržaj tubice je inkubiran u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C tokom 3 minuta. Nakon inkubacije uzorak je prebačen u QIAshredder spin kolone i centrifugiran 3 minuta na 14000 xg. Supernatant iz koga su odstranjeni krupniji ćelijski delovi pipetiran je u novu ependorf tubicu, a zatim je dodato 250 µl apsolutnog (100%) etanola radi precipitacije RNK. Ova smeša je potom prebačena u RNase spin kolonu smeštenu u nove ependorf tubice od 2 ml. Centrifugiranjem u trajanju od 15 s na 10000 xg



obezbeđeno je razdvajanje i vezivanje RNK za membranu kolone, kao i uklanjanje većeg dela DNK koji se odbacuje zajedno sa supernatantom. RNase spin kolona je smeštena u novu ependorf tubicu i membrana je isprana preporučenim RW1 puferom centrifugiranjem na 10000 xg u trajanju od 15 s. Nakon ovog koraka uključen je i dodatni tretman DNazom, koja se nanosi direktno na membranu RNeasy spin kolone. Nakon 15 minuta inkubacije sa DNazom nastavljeno je ispiranje RPE puferom. RNase spin kolone sa RNK molekulima precipitiranim na membranama prebačene su u kolekcione tubice i izvršeno je spiranje i rastvaranje RNK u 60 µl RNase-free vode.

Kvalitet izolovanih molekula RNK proveren je elektroforetskim razdvajanjem molekula ukupnih RNK na 1,2% TBE (45 mM Tris-borat i 1 mM EDTA) agaroznom gelu (MultiSub™ MiniHorizontal Gel Systems, Denville Scientific, Metuchen, NJ, SAD), pri voltaži od 100 V. Kvantifikacija RNA molekula u izolatima određena je spektrofotometrijski, merenjem absorbance na 260 i 280 nm, direktnim nanošenjem 2 µl uzorka na aparat NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Nakon izvršenih provera kvaliteta i kvantiteta RNK izolati su čuvani na -80°C do trenutka daljeg korišćenja.

#### **3.1.5. Reverzna transkripcija ukupnih RNK i reakcija lančanog umnožavanja transkripta (RT-PCR analiza)**

Unošenjem 100 ng ukupnih RNK molekula u proces reverzne transkripcije (RT) sve iRNK prevedene su u komplementarne DNK (cDNK) lance. Zatim je u prisustvu specifičnih prajmera (Tabela 5) u reakciji lančanog umnožavanja (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) amplifikovan 0,6 kb veliki *BvSTI* transkript u vezanim reakcijama, korišćenjem TITANIUM One-Step RT-PCR Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, SAD; Smigocki i sar. 2008b).

Za svaku RT-PCR reakciju koja se odvijala u zapremini od 25 µl, dodato je 2,5 µl 10 x One-Step pufera (400 mM Tricin, 200 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 37,5 µg/ml BSA), 0,5 µl 50 x dNTP miksa u kome je finalna koncentracija svakog dNTP 0,2 mM,

### 3. Materijal i metode

0,25 µl rekombinantnog inhibitora RNaza, 12,5 µl termostabilizirajućeg reagensa, 5 µl GC-Melt™ reagensa, 0,5 µl oligo (dT) prajmera koncentracije 20 µM, po 0,5 µl Forward i Reverse prajmera (finalna koncentracija svakog je 45 µM), 0,5 µl 50 x TITANIUM Taq RT DNK polimeraznog miksa i 2,75 µl RNK razblaženja kojim se dodaje 100 ng ukupnih RNK.

**Tabela 5.** Sekvence prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju cDNK dobijenih nakon reverzne transkripcije ukupnih RNK izolovanih iz tkiva šećerne repe

<i>Gen</i>	<i>Prajmer</i>	<i>Sekvenca (5'-3')</i>
<i>BvSTI</i>	Forward	ACCATGGCTTCCATTTTCCTGAAATC
	Reverse	GGTCACCTAGACCATCGCTAAAACATCA
<i>Biljni aktin</i>	Forward	GTATTGTKAGCAACTGGGATGA
	Reverse	AACKYTCAGCCCRATGGTAAT'
<i>Mišji β-aktin</i>	Forward	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA
	Reverse	CTCTTTGATGTCACGCACGATTC

Uslovi primenjeni u RT-PCR reakcijama obavljenim u Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) aparatu bili su:

- 50°C, 1 sat,
  - 94°C, 2 minuta 40 sekundi,
  - 94°C, 20 sekundi,
  - 56°C, 40 sekundi,
  - 72°C, 1 minut 30 sekundi,
  - 72°C, 5 minuta,
  - 4°C, hold.
- 35 ciklusa
- 

Za sve uzorke urađena je i RT-PCR reakcija sa prajmerima za konstitutivno eksprimirani biljni *aktin* (Tabela 5). Ovaj gen sa visoko konzerviranim

nukleotidnim sekvencama identifikovanim kod velikog broja biljnih vrsta, korišćen je kao kontrola za ujednačen unos RNK molekula u RT-PCR reakciju. Fragmenti aktina veličine 0,54 kb umnožavani su pod istim uslovima kao i *BvSTI* transkripti. Negativne kontrole podrazumevale su reakcije bez unete RNK, a pozitivne kontrole, uključene u Titanium One-Step RT-PCR Kit, sadržavale su RNK iz jetre miša i aktin specifične prajmere (Tabela 5), kojima je bio umnožen fragment mišjeg  $\beta$ -aktina. Dodatne negativne kontrole kojima je proveravana čistoća izolovanih RNK molekula, tj. proveravano je prisustvo genomske DNK u izolatima, puštane su povremeno. U ovim reakcijama korišćen je PCR enzim bez RT funkcije (kao što je TITANIUM Taq DNA Polymerase) koja amplifikuje fragmente genomske DNK, a ne cDNK, koji nastaju transkripcijom RNK molekula. Ove reakcije zahtevale su poseban PCR Master Mix.

RT-PCR produkti su razdvojeni elektroforetski na 1,2% TAE (40 mM Tris-acetat i 1 mM EDTA) agaroznom gelu. Za određivanje veličine razdvojenih linearnih dvostrukih DNA molekula na gel je nanošena smeša  $\phi$ X174 RF DNA/*Hae III* fragmenata veličine 72 do 1353 bp i  $\lambda$  HindIII DNA fragmenata veličine od 564 do 23130 bp. Vizualizacija DNK traka je izvršena posmatranjem pod UV svetlom nakon bojenja etidijum-bromidom. Gelovi su zatim slikani na AlphaImager 3400 (AlphaInnotech, San Leandro, CA, SAD) radi dalje analize i kvantifikacije nivoa ekspresije gena. Kvantifikacija je urađena densitometrijski, korišćenjem programa ImageJ ver. 1.32j (NIH, SAD). Nivoi akumuliranih *BvSTI* transkriptata su normalizovani u odnosu na nivoe biljnog aktina kao kontrole sa istom RNK. Za svaki uzorak količina *BvSTI* transkripta određivana je kao relativni procenat u odnosu na količinu akumuliranog aktinskog transkripta za koju je bila zadata vrednost 100. RT-PCR analize su ponovljene dva puta sa uporedivim rezultatima.

#### **3.1.6. Izolacija proteina**

Analiza akumulacije i aktivnosti *BvSTI* proteina vršena je u mehanički povređenim listovima i korenovima sakupljenim sa 6 meseci starih biljaka šećerne

repe F1016 i F1010 genotipova. Ukupni proteini izolovani su u 50 mM Tris-HCl puferu pH 7,5 sa dodatkom 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% saharoze, 10 mM askorbinske kiseline, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), 2 mM ditionitrola (DTT) po protokolima korišćenim u radovima Smigocki i sar. 2009; Wang i sar. 2003; Chan i DeLumex 1982. Biljno tkivo je prvobitno samleveno u tečnom azotu, a zatim je ledeni ekstrakcioni pufer dodat u proporciji 10 ml na 1 g tkiva.

Proteinski ekstrakti su zatim centrifugirani na 10000 xg tokom 10 minuta na +4°C, a zatim je sakupljeni supernatant nekoliko sati koncentrovan do 1 ml u Amicon Ultra 15 (3 K) koncentratorima (Millipore, Billerica, MA, USA) daljim centrifugiranjem na +4°C. Koncentrovani ekstrakt je rasoljavan dodavanjem dva puta po 8,5 ml 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 pufera i ponovnim centrifugiranjem sve dok nije preostalo oko 200 µl proteinskog ekstrakta. Koncentracija ukupnih proteina određena je spektrofotometrijski metodom po Bradford-u (1976), korišćenjem BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) kao proteinskog standarda.

#### **3.1.7. Analiza akumulacije BvSTI proteina imunoblot metodom**

Ukupni proteini izolovani iz mehanički povređivanih listova i korenova F1016 i F1010 genotipova pomešani su sa 62 mM Tris-HCl pH 6,8 puferom za uzorke koji sadrži 2,5% boje brom-fenol-plavo, 2% Na-dodecil sulfata (SDS), 10% glicerola i 0,5% β-merkaptoetanol. Uzorci su kuvani 10 min na 90°C nakon čega su brzo ohlađeni na +4°C i centrifugirani 3 min na 10000 xg.

Separacija proteina je izvršena na 12% razdvajajućim poliakrilamidnim gelovima denaturišućom SDS-PAGE elektroforezom na 150 V tokom 1 sata i 40 min korišćenjem SE 250 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Unit (Hoefer Inc, San Francisco, CA, SAD). Na gelove je nanošeno 15-30 µg ukupnih proteina. Za određivanje molekulske mase proteina korišćeni su obojeni markeri Kaleidoscope Prestained Protein Standards (BioRad, Hercules, CA, SAD) molekulskih masa 6,5-200 kDa.

---

### ***3. Materijal i metode***

Nakon elektroforeze gelovi su ekvilibrisani u hladnom transfer puferu (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,025% SDS) tokom 1 sata. Razdvojeni proteini su zatim elektrotransferom prebacivani na difluoridne polivinilidene (PVDF) membrane (Immun-Blot 0,2  $\mu$ m, BioRad, Hercules, CA, SAD) tokom 1 sata i 20 minuta na 70 V (Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer cell, Bio-Rad, Richmond, CA, SAD). Nakon transfera membrane su isprane dejonizovanom vodom i inkubirane u 5% rastvoru za blokiranje (BLOT-QuickBlocker, Chemicon International, Temecula, CA, SAD) tokom 1 sata. Poliklonalna primarna anti-BvSTI antitela sintetisana u zecu od mešavine dva BvSTI peptida sa najjačim antigenim karakteristikama (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, SAD) dodavana su na blotovane membrane u razblaženjima 1:1000, 1:2000 ili 1:5000 (v/v) u 1 x TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7,4 sa 150 mM NaCl i 0,1 % Tween 20). Nakon 1 h i 30 min inkubacije membrane su ispirane u 1 x TBS-T dva puta po 10 minuta, a zatim inkubirane sa sekundarnim antitelima za koja je konjugovana alkalna fosfataza (AP Conjugated Goat anti-Rabbit IgG, Chemicon International, Temecula, CA, SAD) u razblaženju 1:5000 u 1 x TBS-T puferu.

Nakon 1 sata inkubacije membrane su ponovo isprane u 1 x TBS-T dva puta po 15 minuta i 1 minut u 1 x TBS da bi se uklonio Tween 20. Aktivnost alkalne fosfataze je detektovana korišćenjem BCIP/NBT boje (5-bromo-4-hloro-3-indolilfosfat i nitro-blue tetrazolium hlorid, Roche, Switzerland) rastvorene u 0,1 M Tris-HCl pH 9,5 sa dodatkom 0,1 M NaCl i 0,05 M MgCl<sub>2</sub>. Akumulirani BvSTI proteini uočeni su kao ljubičasto obojene trake na membranama. Membrane su zatim skenirane i sadržaj BvSTI proteina u svakom uzorku određivan je densitometrijski. Relativan nivo akumuliranih BvSTI proteina određivan je merenjem gustine traka korišćenjem programa ImageQuant (ver. 5.2, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, SAD). Nivo akumuliranih proteina prikazan je u odnosu na nivo u F1016 nepovređenim listovima (nulta tačka) čija je vrednost zadata kao 1. Eksperimenti su ponovljeni dva puta i slični rezultati su dobijeni.

#### 3.1.8. In gel analiza aktivnosti tripsinskih inhibitora šećerne repe

Ukupna aktivnost svih tripsinskih inhibitora šećerne repe analizirana je u mehanički povređenim listovima (6 sati nakon povređivanja), kao i nepovređenim, kontrolnim listovima i korenovima biljaka iz linija F1016 i F1010. Aktivnost je praćena na poliakrilamidnim gelovima na kojima su razdvojeni ukupni proteini, a zatim gelovi inkubirani sukcesivno u rastvorima tripsina i supstrata.

Po 15 ug ukupnih proteina razdvajeno je na 12% SDS-poliakrilamidnim gelovima. Nakon završene elektroforeze gelovi su inkubirani u 10 mM Tris-HCl pH 7,4 sa dodatkom 25% (v/v) 2-propanola tokom 30 minuta da bi se uklonio SDS, a zatim još 30 minuta u 10 mM Tris-HCl pH 8,0 da bi se renaturisali proteini (Smigocki i sar. 2008b; Cai i sar. 2003; Wang i sar. 2003). Gelovi su zatim uronjeni u rastvor tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) koncentracije 40 µg/ml i inkubirani 40 minuta. Tripsin poreklom iz goveda i rastvoren neposredno pre korišćenja u 50 mM Tris-HCl pH 8,0 sa dodatkom 50 mM CaCl<sub>2</sub>, difundovao je tokom inkubacije u gelove čitavom njihovom površinom. Aktivnost usvojenog tripsina praćena je dodavanjem tripsinskog substrata N-acetil-DL-fenilalanin β-naftil estra (APNE, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) rastvorenog u dimetilforaminu u koncentraciji 2,5 mg/ml zajedno sa bojom Fast Blue B salts (tetrazotized O-dianisidine; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) rastvorenoj u 50 mM Tris-HCl pH 8,0 sa 50 mM CaCl<sub>2</sub> u koncentraciji 0,5 mg/ml. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi gelovi su ispirani dejonizovanom vodom i dodat je 10% rastvor sirćetne kiseline da bi se zaustavila reakcija. Gelovi sa jasno razvijenim prosvetljenim zonama na mestima inhibicije tripsinske digestije supstrata skenirani su i korišćeni za dalju analizu. Proteini iz biljaka duvana (*Nicotiana benthamiana*) transformisanim 35S-BvSTI genskim konstruktom u kojima je potvrđena ekspresija BvSTI gena, kao i aktivnost BvSTI proteina (Smigocki i sar. 2008b), korišćeni su kao pozitivne kontrole za BvSTI kodiranu aktivnost proteinaznog inhibitora. Na gelove je nanošen i tripsinski inhibitor iz soje (eng. *soybean trypsin inhibitor*, SBTI; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) veličine oko 20 kDa, kao još jedna pozitivna kontrola za reakciju inhibicije tripsina. Analize su ponovljene dva puta sa uporedivim rezultatima.

**3.2. BIOTEST SA INSEKTIMA *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith**

Insekti vrste *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith iz reda Lepidoptera, familija *Noctuidae*, korišćeni su u biotestu sa genotipovima šećerne repe koji pokazuju različit stepen otpornosti prema larvama SBRM. U biotestu čiji je cilj bio upoređivanje stepena otpornosti genotipova šećerne repe prema larvama FAW sa nivoom ekspresije *BvSTI* gena, korišćene su biljke umereno otpornih genotipova: F1016, F1015 i UT-8, kao i biljke osetljivog F1010 genotipa.

**3.2.1. Gajenje insekata**

Jaja insekata nabavljena od kompanije Benzon Research (Carlisle, PA, SAD), položena su na hranljivu podlogu čiji je sastav dat u Tabeli 6. Podloga je pripremana dodavanjem agara i kazeina u 370 ml vrele vode uz neprestano mešanje tokom nekoliko minuta. Smeša je zatim rashlađena dodavanjem ostatka vode koja je prethodno ohlađena na +4°C, a nakon toga u smešu su dodati i vitaminski miks, kao i neomicin sulfat. Hranljiva podloga je potom sterilno razlivana u staklene posude ili plastične čaše i ostavljena da se stegne pre postavljanja jaja ili larvi na nju.

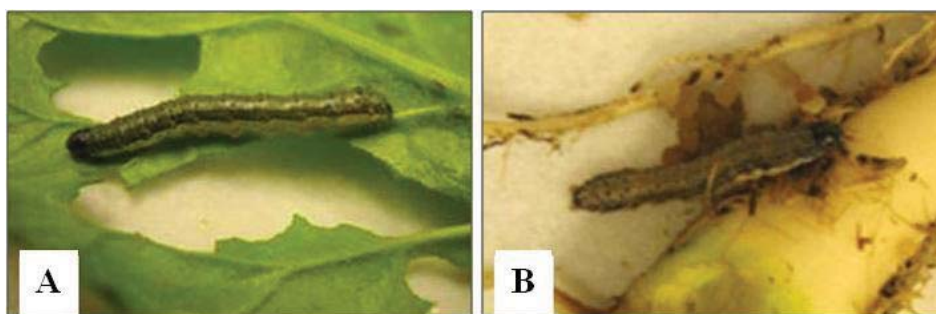
**Tabela 6.** Hranljiva podloga za gajenje FAW larvi

<b>Komponenta</b>	<b>Proizvođač i kat. broj</b>	<b>1 litar podloge</b>
<b>Kazein</b>	Benzon Research F0635	118 g
<b>Vitamini mix</b>	Benzon Research F0717	7,4 g
<b>Agar</b>	Sigma Aldrich A7921	21,7 g
<b>Neomicin sulfat</b>	Sigma Aldrich. N6386	0,5 g
<b>Voda</b>		do 1000 ml

Dva do tri dana nakon piljenja iz jaja, larve su prebacivane u pojedinačne plastične čaše sa svežom hranljivom podlogom i gajene na temperaturi od  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  pod svetlosnim režimom 16 h svetlo /8 h mrak.

#### **3.2.2. Biotest na biljkama šećerne repe**

U biotestu sa larvama FAW korišćeni su pojedinačni listovi ili korenovi 6 meseci starih biljaka sva četiri genotipa šećerne repe (F1016, F1015, UT-8 i F1010) gajenih u staklari na temperaturi od  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  tokom dana i  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  tokom noći sa prosečnom dužinom dnevne svetlosti od 15 sati. U eksperimentima su korišćene 10 dana stare larve ujednačenih masa. Po jedna larva smeštana je na list (Slika 9A) ili koren (Slika 9B) položen na vlažan filter papir u plastičnoj petri kutiji prečnika 12 cm. Svaki tretman sadržao je po 10 petri kutija. Sveža hrana je dodavana svakodnevno.



**Slika 9.** Larve FAW hrane se listovima (A) i korenovima (B) šećerne repe

Mase larvi ( $M$ ) beležene su u intervalima od 24 sata tokom 5 dana. Izmerena masa larvi na početku eksperimenta obeležena je kao  $M_{dan(0)}$ . Na osnovu izmerenih masa za svaku larvu je izračunato dnevno povećanje mase, kao i ukupno povećanje mase tokom tih pet dana, po formulama:

$$\text{Dnevno povećanje mase} = M_{dan(n)} - M_{dan(n-1)} \quad (n = 1-5) \quad [\text{mg}]$$

$$\text{Ukupno povećanje mase} = M_{dan(5)} - M_{dan(0)} \quad [\text{mg}]$$



Nakon 5 dana od početka eksperimenta larvama je i dalje dodavana hrana, ali više nije merena masa larvi, jer su neke od njih počele da gube na masi zbog prelaza u sledeći stadijum razvića, lutku. U trenutku kada su sve larve završile sa metamorfozom i prešle u stadijum lutke, izmerena im je masa i prebačene su u staklene teglice na kojima se nalazio povez od gaze na vrhu, radi bolje aeracije. Posmatranje i beleženje promena nastavljeno je svakodnevno sve do konačnog izleganja adulta.

#### **3.2.3. Statistička obrada rezultata biotesta**

Statističke analize su urađene korišćenjem STATGRAPHICS Centurion XV programa ver. 15.1.02 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, SAD). Podaci su podvrgnuti jednofaktorijalnoj analizi varijanse (one-way ANOVA), a poređenja između srednjih vrednosti su urađena pomoću testa najmanje značajnih razlika (eng. *least significant difference test*, LSD) izračunatih sa nivoom značajnosti od 5%.

### **3.3. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI PROMOTORSKOG REGIONA *BvSTI* GENA U TRANSGENOM DUVANU**

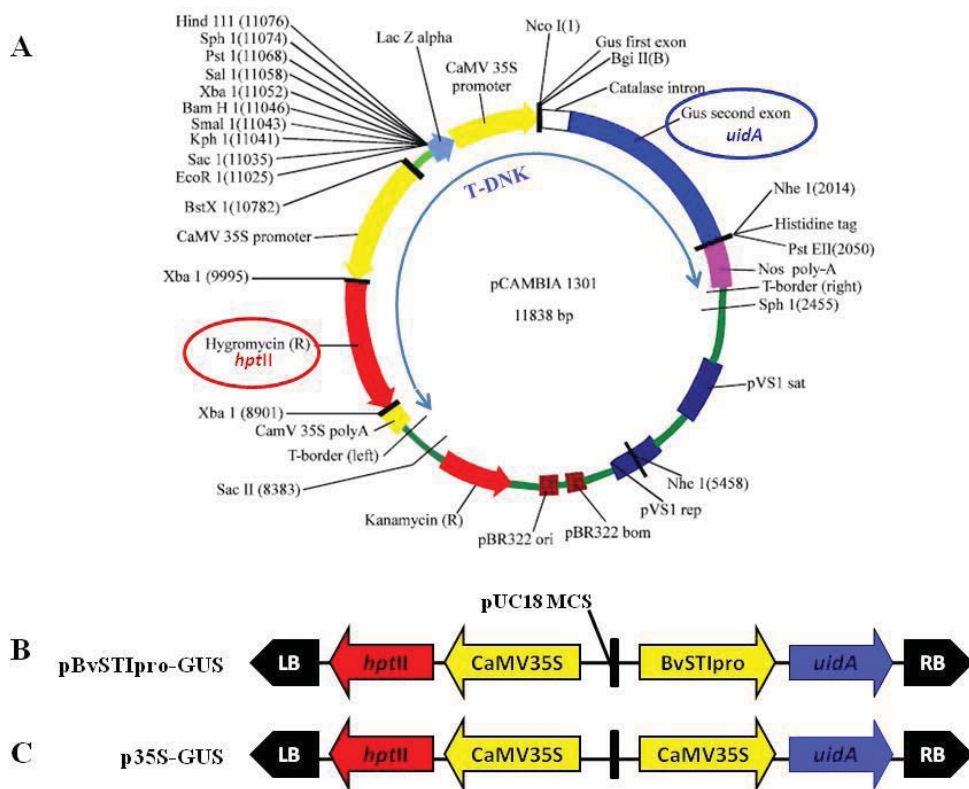
U ispitivanju aktivnosti promotorskog regiona *BvSTI* gena (*BvSTI*pro) i njegove uloge u kontroli ekspresije ovog gena korišćene su transgene biljke duvana (*Nicotiana benthamiana* Domin).

#### **3.3.1. Biljni materijal korišćen za analizu ekspresije *BvSTI* promotora**

Sekvenca promotora *BvSTI* gena prethodno je klonirana iz korena F1016 genotipa šećerne repe, umereno otpornog na larve SBRM korišćenjem GenomeWalker™ (Clontech, Mountain View, CA) procedure (Smigocki i sar. 2007). Potom je sekvenca reakcijom lančanog umnožavanja amplifikovana i ubačena u ekspresioni pCAMBIA 1301 vektor (Slika 10A; CAMBIA, Canberra, Australia). U

okviru prve ekspresione kasete T-DNA regiona ovog vektora, označenog kao pBvSTIpro-GUS, *BvSTI* promotor je vezan za *uidA* (GUS) reporter gen (Slika 10B). U drugoj ekspresionoj kaseti pod kontrolom konstitutivno eksprimiranog CaMV 35S promotora nalazi se *hptII* marker gen koji kodira higromicin fosfotransferazu. Ovaj enzim uključen je u proces selekcije transformisanih biljaka otpornih na antibiotik higromicin (Hyg), omogućavajući preživljavanje samo transgenim ćelijama u kojima procesom fosforilacije ovaj enzim inaktivira molekule Hyg.

Originalni pCAMBIA vektor u kome je *uidA* gen pod kontrolom konstitutivno eksprimiranog 35S promotora, označen je kao p35S-GUS i korišćen je u eksperimentima transformacije radi dobijanja biljaka koje su služile kao pozitivna kontrola za sam proces transformacije, ali i kao kontrola u reakcijama praćenja GUS aktivnosti u transgenim biljakama (Slika 10C).



**Slika 10.** Shematski prikaz ekspresionog vektora pCAMBIA 1301 (A) u kome je GUS reporter gen pod kontrolom inducibilnog promotora *BvSTI* gena šećerne repe – pBvSTIpro-GUS (B) ili konstitutivno eksprimiranog CaMV 35S promotora – p35S-GUS (C).

Ekspresija GUS gena pod kontrolom promotorske sekvence *BvSTI* gena praćena je kod transgenih biljaka duvana dobijenih transformacijom agrobakterijskim sojem EHA 105 koji je nosio pCAMBIA ekspresioni vektor sa himeričnim *BvSTI*pro-GUS genom. Naćin ekspresije GUS gena kod ovih biljaka poređen je sa ekspresijom u biljkama duvana transformisanim originalnim pCAMBIA vektorom kod koga je GUS gen pod kontrolom konstitutivno eksprimiranog 35S promotora (35S-GUS). U svim eksperimentima korišćene su i netransformisane, kontrolne biljke duvana iste starosti i gajene pod istim uslovima.

U eksperimentima su korišćene biljke T2 generacije koje su bile potomci primarnih transformanata kod kojih je PCR metodom potvrđeno prisustvo promotorske sekvence *BvSTI* gena i-ili *uidA* gena (Smigocki i sar. 2008b).

#### **3.3.2. Ispitivanje osetljivosti transgenih T2 semena prema higromicinu**

Semena sa T1 linija duvana koje nose himerični *BvSTI*pro-GUS gen sakupljena su sa biljaka gajenih u staklari i ćuvana nekoliko meseci na temperaturi od +4°C. Odabrana semena su nakon perioda stratifikacije imbibovana tokom noći u rastvoru giberelne kiseline ( $GA_3$ ) koncentracije 1 mg/l. Nakon uklanjanja rastvora giberelina semena su površinski sterilisana tokom 8 minuta u smeši 70% etanola i 10% rastvora komercijalnog natrijum-hipohlorita u kome je bilo 4% aktivnog hlora. Semena su zatim pet puta isprana sterilnom destilovanom vodom i u sterilnim uslovima postavljena su na 0,6% agaroznu podlogu za iskljivanje (6 g agara u 1 l sterilne dejonizovane vode). U cilju selekcije transgenih T1 linija u agarozni medijum je dodat selekциони antibiotik Hyg u koncentraciji od 40 mg/l. Zajedno sa transgenim semenima, iskljavana su i semena kontrolnih, netransformisanih biljaka duvana. Jedan deo ovih semena stavljen je na agaroznu podlogu sa Hyg, kao i transgena semena, dok je drugi deo semena ostavljen da isklja na podlozi bez antibiotika.

Nakon 5 dana inkubacije u mraku, klijanci su prebačeni na svetlost i dalje gajeni u režimu 16 h svetlo/8 h mrak. Klijanci sa normalnom morfologijom smatrani su Hyg otpornim. Za svaku liniju je prebrojavanjem izračunat odnos proklijalih prema neproklijalim semenima. Na ovaj način dobijeni odnos segregacije *hptII* gena upoređivan je sa očekivanim Mendelovim 3:1 odnosom (3 Hyg otporna : 1 Hyg osetljivom semenu) hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom (Greenwood i Nikulin 1996) za svaku transgenu T2 liniju.

Klijanci otporni na Hyg iz transgenih linija čiji segregacioni odnos nije statistički značajno odstupao od očekivanog odnosa prebačeni su u plastične sterilne posude na 100 ml MS hranljive podloge upola razblaženog sastava ( $\frac{1}{2}$ MS; Murashige i Skoog 1962), sa 3% saharoze i 0,6% agra. Pre sterilizacije pH podloge je podešen 1N rastvorom KOH na 5,7. U medijum je neposredno pre razlivanja u sterilne posude dodavan Hyg u koncentraciji od 40 mg/l. Podloge za gajenje kontrolnih netransformisanih biljaka nisu sadržavale higromicin. Klijanci su gajeni u komori za gajenje biljaka u uslovima dugog dana sa 16 h svetla /8 h mraka, na  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , do 6 nedelja.

Biljčice sa dobro razvijenim listovima i korenovim sistemom prebačene su zatim u mešavinu Pro-Mix i perlita, i ostavljene da ojačaju u komori pod istim temperaturnim i svetlosnim uslovima. Nakon dve nedelje, biljke su prenete u staklaru i gajene na temperaturi od  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  tokom dana i  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  tokom noći, sa prosečnom dužinom svetlosti od 15 sati. Biljke su mesečno đubrene dodavanjem Osmocote fertilizatora na površinu zemlje u saksijama.

#### **3.3.3. Histohemijska analiza ekspresije GUS gena pod kontrolom *BvSTI* promotora tokom razvića duvana**

Histohemijsko bojenje tkiva duvana u kojima je aktivan GUS (*uidA*) gen koji se nalazi pod kontrolom promotora *BvSTI* gena vršeno je po protokolu opisanom u radu Jefferson i sar. (1987). Aktivnost enzima  $\beta$ -D-glukuronidaze (GUS), produkta *uidA* gena, praćena je u tkivima duvana tokom njihovog razvića.

Analizirana tkiva su potapana u GUS inkubacioni pufer (Tabela 7) u kome je bio rastvoren supstrat X-Gluc (5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronska kiselina; Biolife Italiana, Milan, Italija) u koncentraciji od 0,5 mg/ml i inkubirana tokom noći na temperaturi od 37°C, u mraku. Prelaz bezbojnog supstrata u plavo obojeni produkt praćen je u listovima i korenovima *in vitro* gajenih transgenih biljaka starih 2 i 6 nedelja, kao i u organima biljaka iz staklare starih 14 nedelja. Svaka histohemijska analiza ekspresije GUS kodirajućeg gena rađena je u pet individualnih ponavljanja, i to po pet celih biljčica za najmlađu starosnu grupu, odnosno po 5 listova za starije biljke. Na slikama je prikazan najreprezentativniji od pet ponavljanja.

**Tabela 7.** Sastav GUS inkubacionog pufera

<b>Komponenta</b>	<b>Finalna koncentracija</b>
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7)</b>	0,1 M
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	0,01 M
<b>Askorbinska kiselina</b>	0,03 M
<b>Triton X-100</b>	0,5 %

#### 3.3.4. Analiza ekspresije GUS gena u povređenim tkivima transgenog duvana

Za analizu ekspresije BvSTIpro-GUS gena indukovanu povređivanjem korišćene su iste transgene linije duvana u kojima je praćena aktivnost himeričnog gena tokom razvića, kao i kontrolne netransformisane biljke.

Po jedna biljka iz svake transgene linije odabrana je kao najreprezentativnija na osnovu praćenja ekspresije GUS gena tokom razvića. Sa svake od ovih 14 nedelja starih biljaka gajenih u staklari uzeto je po 5 listova. Po tri lista su povređivana mehanički, pravljenjem 1 cm dugih zaseka duž ivica lista, dok su preostala dva lista ostajala kao nepovređene kontrole. Sa istih biljaka uzimani su i odsecci korenova. Jedan odsećak korena mehanički je povređivan stezanjem

pincete na svakih 5 mm duž čitavog odsečka, dok je drugi odsečak ostajao nepovređen. Svi listovi i korenovi, povređeni ili ne, su uranjani u GUS inkubacioni pufer 6 sati nakon mehaničkog povređivanja.

Analiza ekspresije BvSTIpro-GUS gena vršena je i u listovima kojima su se prethodno hranile larve FAW. U ovim eksperimentima korišćeno je takođe po pet listova sa svake analizirane biljke. Po tri larve, koje su bile u kasnom trećem stupnju razvića, postavljane su na pojedinačne listove položene u plastičnu Petri kutiji na vlažan filter papir, a zatim ostavljane da se hrane 6, 24, 48 ili 72 sata. Nakon ovog vremenskog perioda povređeni listovi su uranjani u GUS pufer i zatim inkubirani po napred navedenim uslovima. Za svaku liniju analiziran je po jedan preostali nepovređeni list i označen kao 0 h vremenska tačka. Na slikama koje pokazuju ekspresiju himeričnog BvSTIpro-GUS gena nakon mehaničkog ili povređivanja insektima, prikazan je najreprezentativniji od tri nezavisno ponovljena eksperimenta.

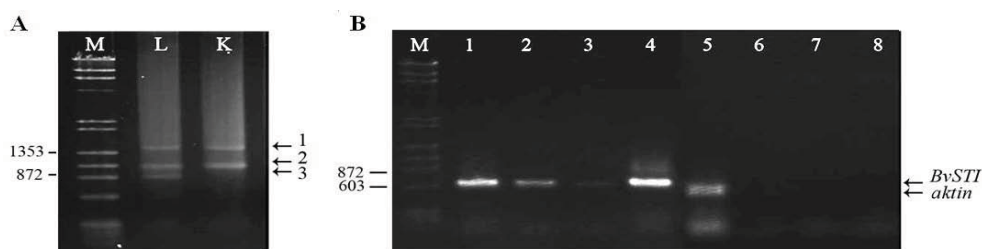
## 4. REZULTATI

### 4.1. EKSPRESIJA *BvSTI* GENA U GENOTIPOVIMA ŠEĆERNE REPE SA RAZLIČITIM STEPENOM OTPORNOSTI PREMA INSEKTIMA

Ekspresija *BvSTI* gena praćena je u korenovima i listovima šećerne repe RT-PCR metodom. Odgovor *BvSTI* gena na povređivanje praćen je na nivou RNK kod četiri genotipa koji se međusobno razlikuju po stepenu osetljivosti na ishranu larvi SBRM: F1016, F1015 i UT-8 kao umereno otporni i F1010 kao osetljiv genotip.

#### 4.1.1. Ekspresija *BvSTI* gena u mehanićki povređenim tkivima šećerne repe

Prilikom provere integriteta izolovanih RNK molekula razdvajanjem na agaroznom gelu, primećeno je da u svim uzorcima izolovanim iz listova šećerne repe osim 2 trake ribozomalne RNK (rRNK), koje odgovaraju molekulima 28S i 18S rRNK, postoji i treća traka koja odgovara molekulu RNK nešto manje velićine (Slika 11A). U uzorcima korenova uoćene su samo prve dve trake rRNA.



**Slika 11.** A) Provera kvaliteta i integriteta molekula RNK izolovanih iz listova (L) i korenova (K) šećerne repe. Strelice ukazuju na tri različita molekula rRNK izolovana iz tkiva šećerne repe. B) Razdvajanje transkripata *BvSTI* gena velićine 0,6 kb dobijenih RT-PCR metodom korišćenjem 100 (linija 1), 10 (linija 2) ili 1 ng (linija 3) ukupnih RNK. U RT-PCR reakcijama umnoćeni su i fragmenti korišćeni kao pozitivne kontrole, *BvSTI* gen iz listova transgenog duvana transformisanog ovim genom (linija 4), kao i fragmenta mišjeg  $\beta$ -aktina (linija 5). Za kontrolu ispravnosti korišćene metode kao negativne kontrole korišćene su RT-PCR reakcije u kojima je umesto RNK uneta voda (linija 6) ili one u kojima je korišćen PCR enzim bez RT funkcije koji amplifikuje fragmente genomske DNK, a ne cDNK (linije 7 i 8).

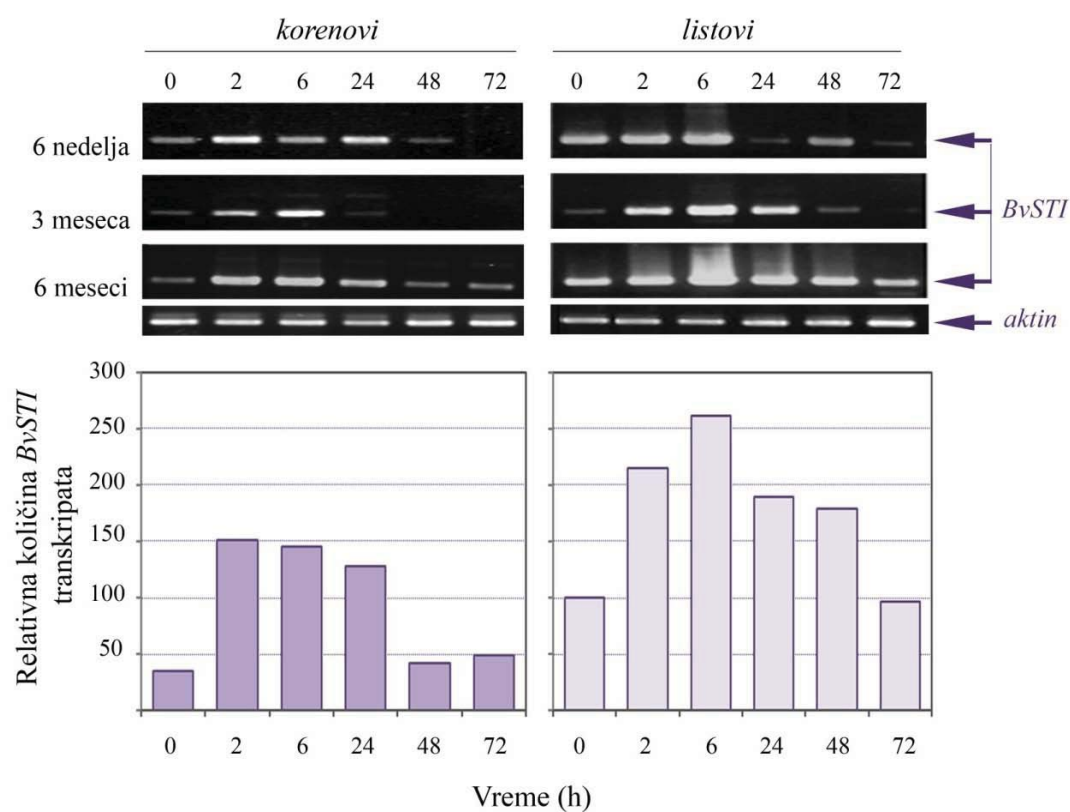
Korišćenjem ukupnih RNK i oligo (dT) prajmera u procesu reverzne transkripcije dobijeni su molekuli cDNK. Nakon PCR amplifikacije, u kojoj su korišćeni *BvSTI* specifični prajmeri, produkti su razdvojeni elektroforezom na 1,2% agaroznom gelu i vizuelizovani pomoću etidijum bromida (Slika 11B). Veličina dobijenih produkata odgovarala je očekivanim vrednostima od 0,6 kb za *BvSTI* gen.

Na osnovu rezultata RT-PCR analize uočeno je da mehaničko povređivanje listova i korenova značajno utiče na ekspresiju *BvSTI* gena u SBRM rezistentnim genotipovima F1016, F1015, UT-8, ali i u osteljivom F1010 (Slike 12, 13, 14 i 15).

Praćenje ekspresije *BvSTI* gena tokom razvića biljaka šećerne repe pokazalo je da se obrazac ekspresije ovog gena nakon mehaničkog povređivanja uočen kod najmlađih analiziranih biljaka (6 nedelja), zadržava skoro u potpunosti i kod starijih biljaka (3 i 6 meseci). Najintenzivnija akumulacija *BvSTI* transkripata zabeležena je u najstarijim tkivima, 6 meseci starim listovima i korenovima, osim kod UT-8 listova gde je visok sadržaj *BvSTI* transkripata zabeležen već kod 6 nedelja starih biljaka (Slike 12, 13, 14 i 15). Kvantifikacija nivoa akumuliranih *BvSTI* iRNK urađena je kod najstarijih biljaka upoređivanjem sa nivoom konstitutivno eksprimiranog aktina, radi lakšeg poređenja nivoa ekspresije *BvSTI* gena.

Rezultati kvantifikacije pokazuju da je u F1016 listovima i korenovima transkripcija *BvSTI* gena višestruko intenzivirana nakon mehaničkog povređivanja (Slika 12). Značajno više transkripata akumuliralo se u listovima nego u korenovima ovog genotipa, tokom čitavog analiziranog perioda. Čak i pre povređivanja, u tački 0, relativna količina akumuliranih *BvSTI* transkripata bila je više od 2 puta veća u listovima nego u korenovima. Veoma intenzivna ekspresija uočena je tokom 24 sata u korenovima i 48 sati u listovima. Nakon ovog perioda ekspresija je vraćena na nivo sličan bazalnom, uočenom pre indukcije povređivanjem.



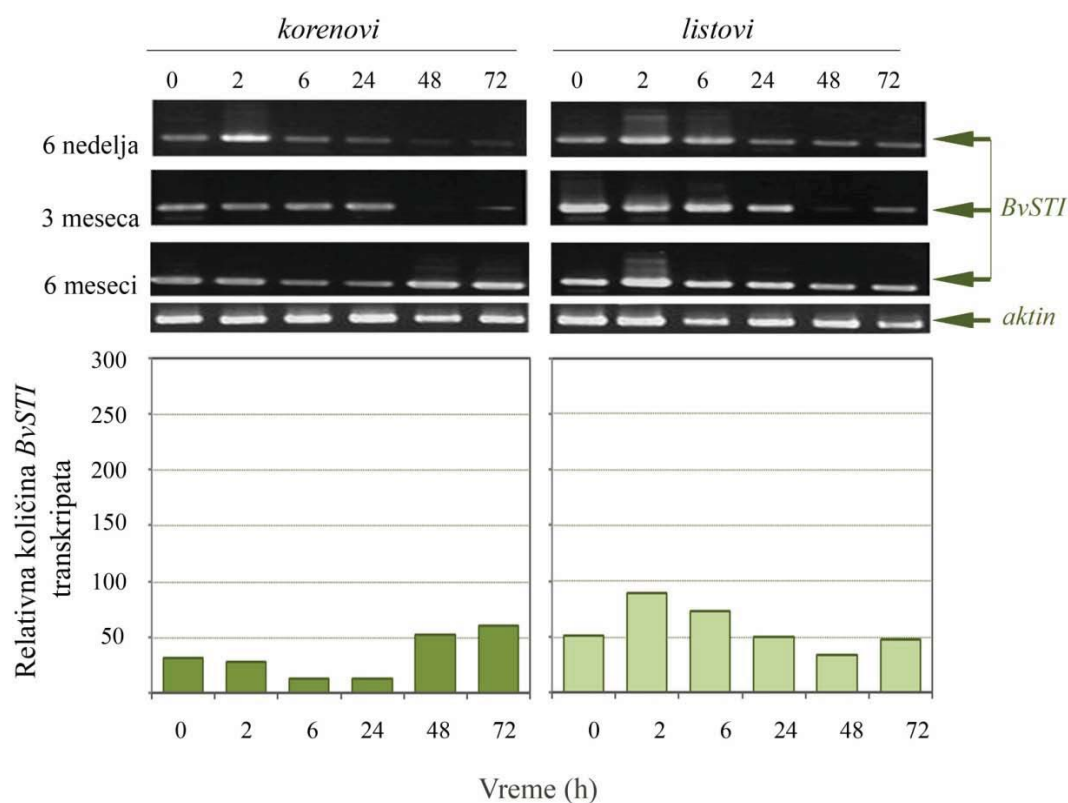


**Slika 12.** RT-PCR analiza ekspresije *BvSTI* gena u F1016 liniji šećerne repe. Akumulacija *BvSTI* transkripata praćena je u listovima i korenovima sakupljenim nakon 2, 6, 24, 48 i 72 sata nakon mehaničkog povređivanja, kao i neposredno pre povređivanja (0 tačka) kod tri starosne grupe biljaka (6 nedelja, 3 i 6 meseci). Kvantifikacija akumuliranih *BvSTI* transkripata u 6 meseci starim biljkama urađena je densitometrijskim upoređivanjem sa količinom akumuliranih transkripata aktinskog gena za svaki uzorak. Stubići predstavljaju relativnu količinu *BvSTI* transkripta dobijenu u jednom od dva nezavisno sprovedena eksperimenta.

Najviši nivo ekspresije u korenovima F1016 linije zabeležen je 2 sata nakon povređivanja sa čak 4 puta više transkripata nego u 0 tački. Ovako visok nivo zadržan je sve do šestog sata od povređivanja, a zatim neznatno opada tokom narednih 18 sati, ali i dalje sa 3,5 puta više transkripata od bazalnog nivoa u nepovređenim korenovima. U listovima mehaničko povređivanje takođe značajno indukuje ekspresiju *BvSTI* gena pa je već 2 sata nakon povređivanja bilo je 2 puta

više transkripata. Najviši nivo ekspresije zabeležen je 6 sati nakon povređivanja sa 2,5 puta intenzivnijom transkripcijom.

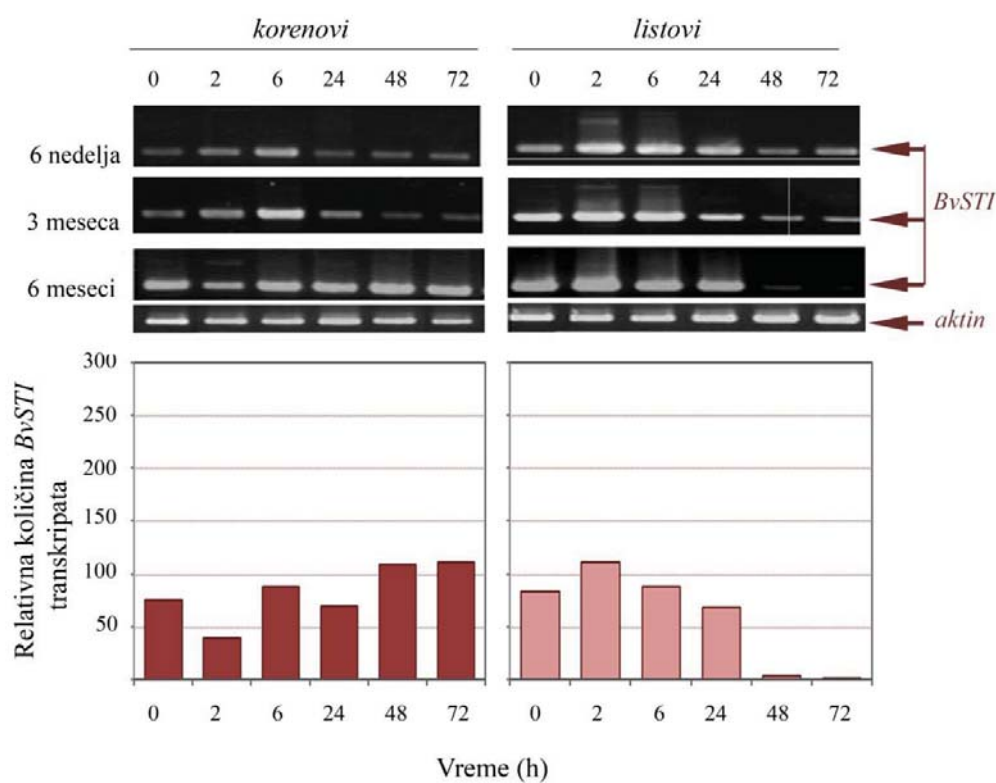
Ekspresija *BvSTI* gena u listovima osetljivih F1010 biljaka bila je takođe indukovana mehaničkim povređivanjem (Slika 13), slično F1016 liniji. Međutim, bazalna količina akumuliranih transkripata bila je manja skoro 2 puta od količine u nepovređenim F1016 listovima i samo je neznatno porasla nakon povređivanja. Najviši nivo zabeležen je 2 sata nakon povređivanja sa oko 1,7 puta više transkripata nego pre povređivanja. Nakon 6 sati od povređivanja nivo transkripcije opada i već nakon 24 sata dostiže ponovo bazalni nivo. Zanimljivo je da 48 sati od povređivanja u listovima F1010 linije ima čak nešto manje transkripata nego u nepovređenim listovima, a to je čak 5 puta manje transkripata nego u istoj vremenskoj tački kod F1016 listova.



**Slika 13.** RT-PCR analiza ekspresije *BvSTI* gena u F1010 liniji šećerne repe. Akumulacija *BvSTI* transkripata praćena je na isti način kao i kod F1016 biljaka, opis uz Sliku 12.

Nasuprot ovome, u F1010 korenovima zabeleženo je opadanje intenziteta transkripcije tokom prvih 24 sata od mehaničkog povređivanja. Već nakon 2 sata primećeno je blago smanjenje u količini akumuliranih transkripata, a zatim to opadanje postaje čak i intenzivnije tokom naredna 22 sata. Tokom ovog perioda, količina *BvSTI* transkripata u korenovima F1010 je bila čak 10 puta niža nego kod korenova F1016 genotipa.

Obrazac ekspresije *BvSTI* gena u F1015 genotipu, registrovanom kao SBRM otporan, pokazao je u izvesnoj meri sličnost sa ekspresijom u osetljivom F1010 genotipu (Slika 14).



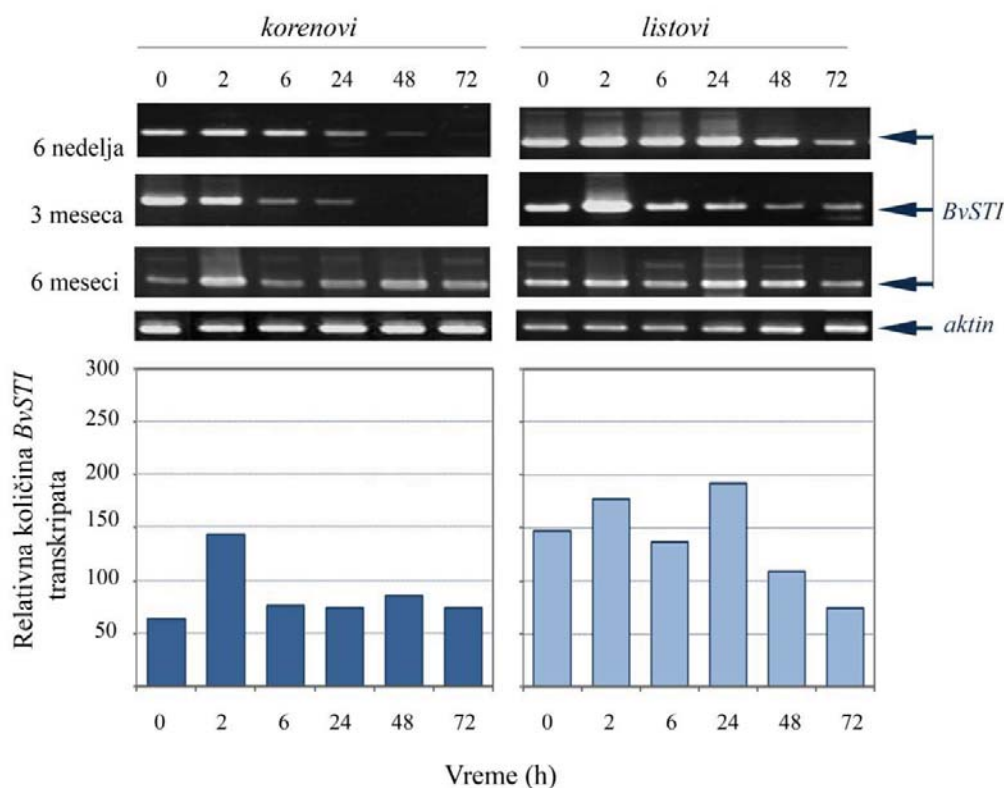
**Slika 14.** RT-PCR analiza ekspresije *BvSTI* gena u F1015 liniji šećerne repe. Akumulacija *BvSTI* transkripata praćena je na isti način kao i kod F1016 biljaka, opis uz Sliku 12.

Iako je bazalni nivo ekspresije u korenovima bio skoro dvostruko viši nego kod F1010, pa čak i F1016 korenova, povređivanje je inicijalno dovelo do redukcije eksprimiranja ovoga gena i smanjivanja količine akumuliranih transkripata. Ipak, za razliku od F1010 korenova gde je tokom 24 sata intenzitet transkripcije ostao redukovan, ovde je već nakon 6 sati od povređivanja došlo do vraćanja transkripcije na bazalni nivo, a nakon 48 sati primećen je čak i porast od 1,6 puta u odnosu na bazalni nivo.

U listovima F1010 biljaka bazalni nivo bio je sličan onome kod F1016 biljaka, ali je ovde povređivanje indukovalo samo blagi porast nivoa ekspresije od svega 1,3 puta. Ubrzo nakon ovog blagog porasta, već posle 6 sati transkripcija je vraćena na nivo pre povređivanja, a zanimljivo, nakon 24 sata količina transkripata opada na nivo koji je teško bilo detektovati.

Kod UT-8 linije koja je korišćena kao parentalna linija u programima selekcije genotipova šećerne repe otpornih na larve SBRM, obrazac ekspresije *BvSTI* gena nakon mehaničkog povređivanja bio je dosta sličan onome uočenom kod F1016 linije (Slika 15). Maksimum transkripcije u korenovima zabeležen je nakon 2 sata od povređivanja. Za razliku od korenova F1016 kod kojih je povišen nivo transkripcije bio zadržan tokom 24 sata, u UT-8 korenovima primećen je veoma brz povratak na bazalni nivo već posle 2 sata.

U nepovređenim listovima UT-8 genotipa zabeležena je najveća količina *BvSTI* transkripata, sa 1,5 puta više transkripata nego u F1016 i čak 3 puta više nego u F1010 liniji. Povređivanje je samo neznatno intenziviralo ekspresiju tokom prva 24 sata od povređivanja.



**Slika 15.** RT-PCR analiza ekspresije *BvSTI* gena u UT-8 liniji šećerne repe. Akumulacija *BvSTI* transkripata praćena je na isti način kao i kod F1016 biljaka, opis uz Sliku 12.

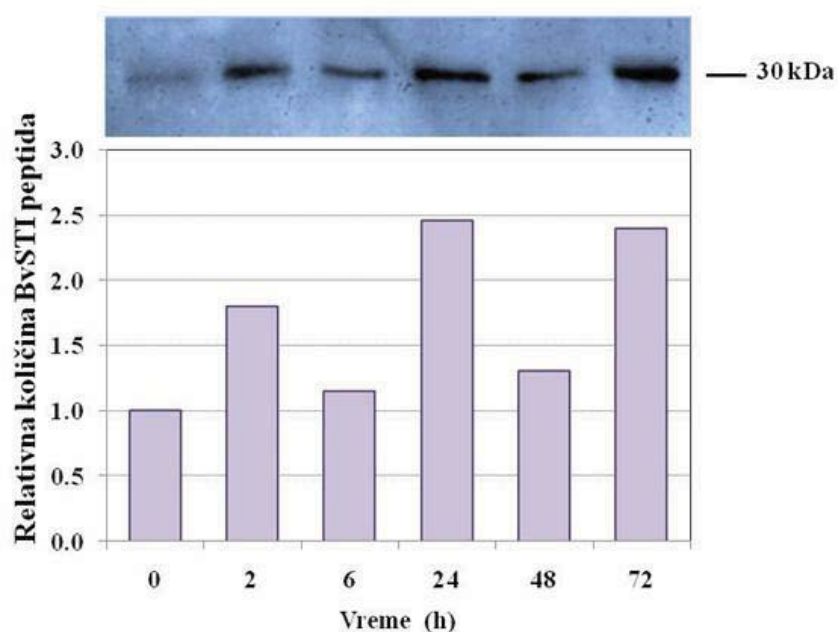
#### 4.1.2. Akumulacija BvSTI proteinaznog inhibitora nakon mehaničkog povređivanja šećerne repe

Akumulacija BvSTI IP analizirana je imunoblot detekcijom u listovima i korenovima dva genotipa kod kojih su primećene najveće razlike u dinamici i intenzitetu transkripcije nakon mehaničkog povređivanja, F1016 i F1010.

U listovima oba analizirana genotipa imunodetekcijom je utvrđeno prisustvo BvSTI proteina veličine oko 30 kDa. Nivo akumulacije proteina određivan je nakon densitometrijske obrade skeniranih membrana i utvrđivanja volumena dobijenih proteinskih traka. Iako je bazalni nivo akumulacije BvSTI proteina u nepovređenim listovima (0h) bio sličan kod obe linije, nakon mehaničkog povređivanja značajno

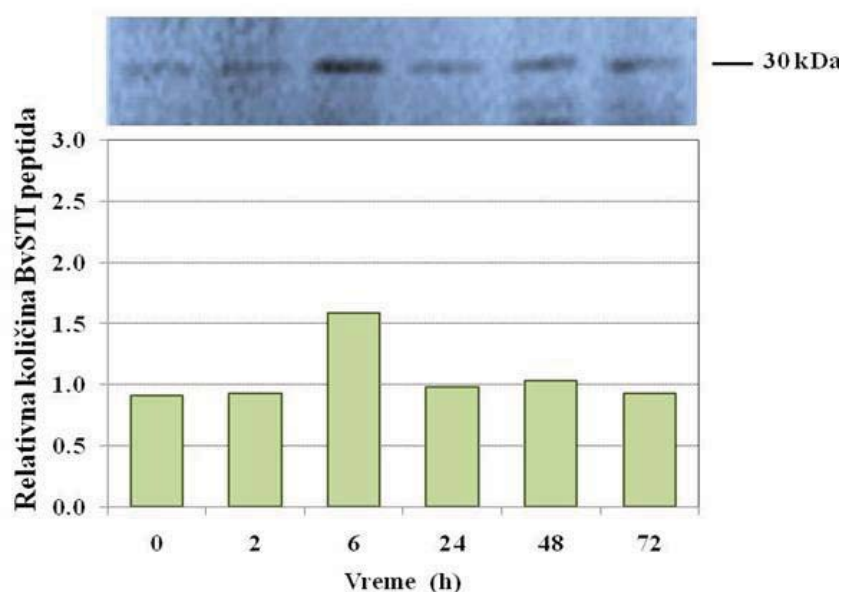
veća količina proteina akumulirala se u F1016 (Slika 16) nego u F1010 listovima (Slika 17).

Već nakon 2 sata od povređivanja količina akumuliranog proteina u F1016 liniji bila je dvostruko veća nego pre povređivanja. Tokom 72 sata od povređivanja primećen je specifičan obrazac akumulacije BvSTI proteina sa naizmeničnim porastima i smanjivanjima u količini detektovanih proteina. Nakon 2 sata od povređivanja detektovano je 1,8 puta više proteina nego u nepovređenim listovima, dok se nakon 6 sati količina akumuliranog proteina vraća na nivo sličan onom u nultoj tački. Nakon 24 i 72 sata ponovo dolazi do porasta količine akumuliranih proteina za 2,5 odnosno 2,4 puta (Slika 16). Nakon 48 sati, slično kao i nakon 6 sati nivo akumuliranih BvSTI proteina je samo neznatno povišen u odnosu na količinu pre povređivanja.



**Slika 16.** Akumulacija BvSTI proteina u listovima F1016 genotipa šećerne repe nakon mehaničkog povređivanja. Akumulirani proteini detektovani su imunoblot analizom u nepovređenim (0 sati), kao i u listovima 2, 6, 24, 48 i 72 sata nakon povređivanja kod 6 meseci starih biljaka. Količina BvSTI proteina određena je densitometrijski, a svaki stubić predstavlja relativnu količinu BvSTI proteina u odnosu na nivo u F1016 nepovređenim listovima, čija je zadata vrednost bila 1.

U F1010 listovima jedino značajno povećanje u količini akumuliranih BvSTI IP zabeleženo je 6 sati nakon povređivanja sa 1,7 puta više ovog proteina nego pre povređivanja (Slika 17). Sličan nivo akumulacije zabeležen je u F1016 listovima, ali znatno ranije, već 2 sata od povređivanja. Za razliku od F1016 linije gde se akumuliranje BvSTI proteina nastavlja tokom 72 sata od povređivanja, kod F1010 linije u svim ostalim vremenskim tačkama nije došlo do značajne promene u nivou akumulacije BvSTI proteina u odnosu na nepovređene listove.

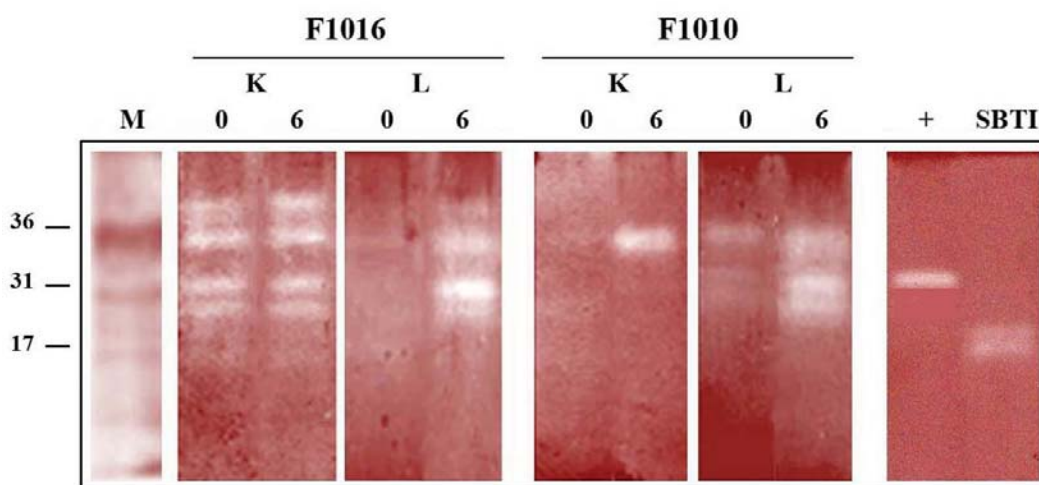


**Slika 17.** Akumulacija BvSTI proteina u listovima F1010 genotipa šećerne repe nakon mehaničkog povređivanja. Akumulacija BvSTI proteina praćena je na isti način kao i kod F1016 biljaka, opis uz Sliku 16.

U korenovima oba genotipa šećerne repe antitela nisu dala specifičnu reakciju sa BvSTI proteinaznim inhibitorom, iako je količina nanetih ukupnih proteina bila dvosotruko veća nego u listovima (rezultati nisu prikazani).

### 4.1.3. *In gel* analiza aktivnosti tripsinskih inhibitora šećerne repe

Kod F1016 i F1010 biljaka kod kojih je mehaničko povređivanje dovelo do promena u ekspresiji *BvSTI* gena, kao i do akumulacije kodiranog IP, praćena je inhibitorna aktivnost ovih proteina na tripsin inkorporiran u poliakrilamidne gelove. Prosvetljene zone (nebojane trake) na mestima inhibicije tripsinske aktivnosti detektovane su kod oba analizirana genotipa šećerne repe. Veći broj proteinskih traka pojavljuje se u nepovređenim korenovima i listovima (0), ali i u povređenim tkivima 6 sati nakon mehaničkog povređivanja (Slika 18).



**Slika 18.** Aktivnost BvSTI proteina u mehanički povređenim korenovima (K) i listovima (L) F1016 i F1010 biljaka šećerne repe. Aktivnost tripsinskih inhibitora analizirana je na gelu nakon razdvajanja ukupnih proteina nativnom PAGE elektroforezom iz nepovređenih (0) tkiva ili 6 sati nakon povređivanja (6). M, proteinski marker; +, proteinski ekstrakt iz listova duvana transformisanog 35S-*BvSTI* genskim konstruktom u kojima je potvrđena ekspresija *BvSTI* gena, kao i aktivnost BvSTI proteina; SBTI, tripsinski inhibitor iz soje nanošen kao pozitivna kontrola za reakciju inhibicije tripsina.

Kod F1016 genotipa detektovano je do četiri trake veličina od 30 do 50 kDa, dok je u F1010 tkivima bio prisutan manji broj traka veličina od 30 do 36 kDa. Tripsinski inhibitor veličine oko 50 kDa detektovan je samo u F1016 genotipu, a nije primećen ni u korenovima ni u listovima F1010 biljaka. Među svim razdojenim



tripsinskim inhibitorima detektovana je i aktivnost proteina koja odgovara BvSTI IP veličine oko 30 kDa.

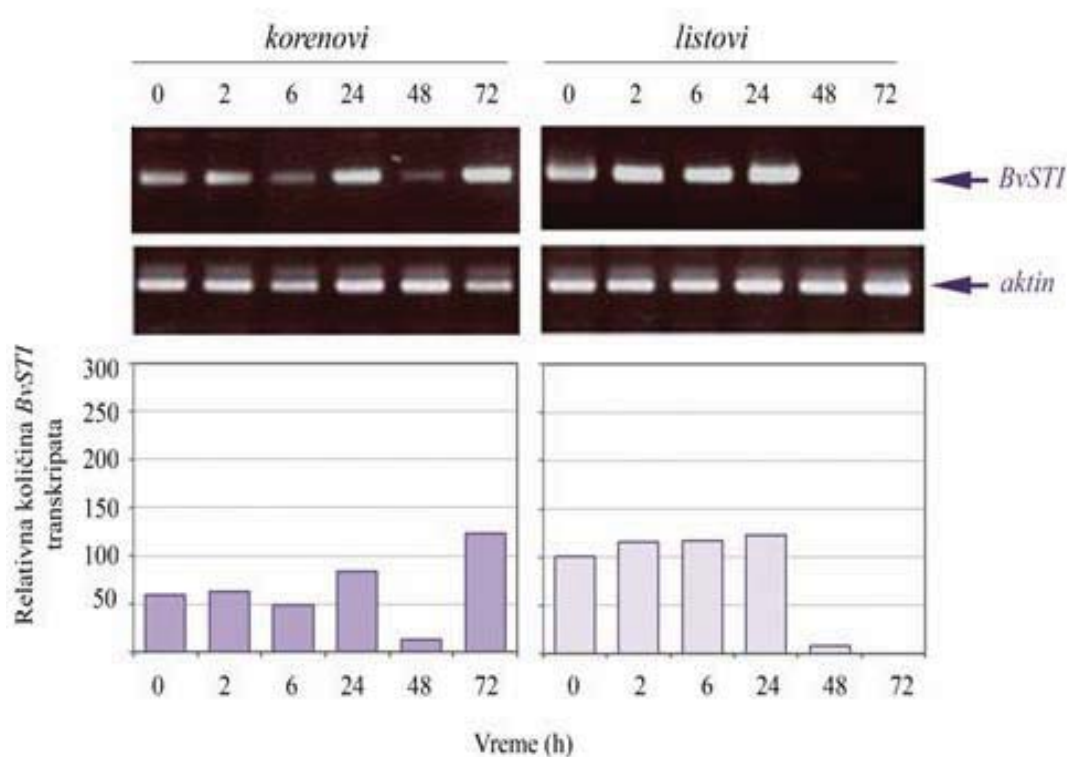
Aktivnost tripsinskih inhibitora kod F1016 linije bila je značajno veća u nepovređenim korenovima nego u listovima. Za razliku od korenova u kojima su razdvojene četiri trake od kojih se jedna nalazila na poziciji BvSTI proteina, u nepovređenim listovima uočena je samo neznatna aktivnost. Međutim, dok je u korenovima 6 sati nakon povređivanja nivo aktivnosti ostao nepromenjen, u listovima je mehaničko povređivanje dovelo do snažne indukcije inhibitorne aktivnosti.

Kod F1010 linije mehaničko povređivanje je indukovalo intenzivniju aktivnost sva tri razdvojena tripsinska inhibitora u listovima. U korenovima pre povređivanja nije uopšte registrovana inhibicija tripsina, dok je 6 sati nakon povređivanja primećena samo jedna prosvetljena traka veličine oko 36 kDa. Aktivnost BvSTI IP veličine oko 30 kDa u korenovima ovog genotipa nije zabeležena kako pre tako ni posle mehaničkog povređivanja.

#### **4.1.4. Ekspresija *BvSTI* gena u tkivima šećerne repe indukovana ishranom larvi**

Ekspresije *BvSTI* gena u listovima i korenovima F1016 i F1010 linija praćena je ne samo nakon mehaničkog povređivanja već i nakon povređivanja nastalog ishranom larvi FAW. Analiza akumulacije RT-PCR produkata pokazala je da je kod oba genotipa obrazac *BvSTI* ekspresije tokom 72 sata nešto drugačiji od onog uočenog nakon mehaničkog povređivanja. Nivo transkripata u listovima je bio viši u F1016 nego u F1010 genotipu pre, ali i posle ishrane FAW larvi tokom prvih 24 sata (Slike 19 i 20). Bazalni nivo u nepovređenim listovima bio je 1,5 puta viši u F1016 nego u F1010 listovima. Nasuprot ovom obrascu, u korenovima je bazalni nivo ekspresije *BvSTI* gena, kao i količina povređivanjem indukovane *BvSTI* iRNK bila slična kod oba genotipa.

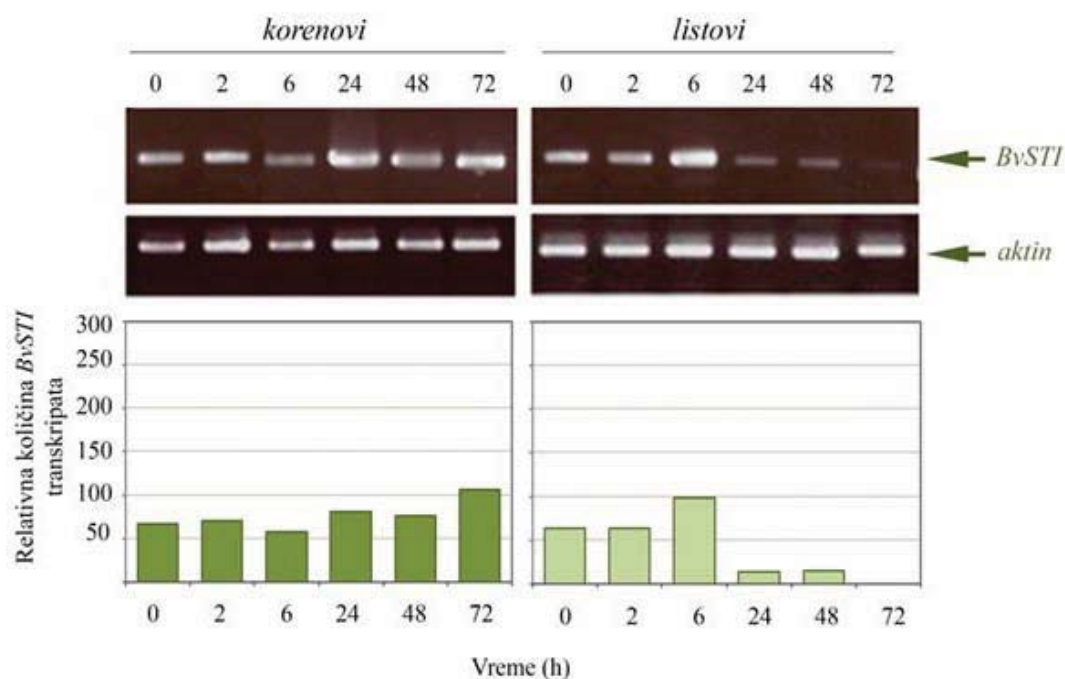
U F1016 korenovima do prvog značajnijeg porasta u akumulaciji *BvSTI* transkripata došlo je tek 24 sata nakon početka hranjenja larvi (Slika 19). Iako je tokom 48 sati zabeležen veoma izražen pad u količini transkripata, najviše detektovanih *BvSTI* iRNA zabeleženo je 72 sata nakon povređivanja, sa 2 puta više transkripata nego pre povređivanja (0 tačka). Kod F1016 listova došlo je samo do blagog porasta u količini transkripata tokom 24 sata od stavljanja larvi na listove, dok je već nakon 48 i 72 sata došlo do skoro potpunog gubitka signala.



**Slika 19.** RT-PCR analiza ekspresije *BvSTI* gena indukovana ishranom larvi FAW kod F1016 linije šećerne repe. Akumulacija *BvSTI* transkripata praćena je na način opisan uz Sliku 12.

Obrazac ekspresije *BvSTI* gena nakon ishrane larvi FAW kod biljaka F1010 nešto je sličniji obrascu ekspresije nakon mehaničkog povređivanja (Slika 13 i 20). U korenovima je takođe primećen blag pad u aktivnosti gena tokom prvih 6 sati, nakon čega se količina transkripata povećava i doštiže najviše vrednosti nakon 72

sata ishrane, sa 1,5 puta više transkripata nego pre početka ishrane. Najintenzivnija transkripcija u listovima zabeležena je 6 sati nakon početka ishrane, sa oko 1,6 puta više transkripata nego u nepovređenim listovima. Ipak ovaj intenzitet bio je i dalje nešto niži nego najviši nivo zabeležen u korenovima (nakon 72 sata). Nakon prvih 6 sati od postavljanja larvi na listove F1010 linije došlo je do naglog pada u aktivnosti *BvSTI* gena i količina akumuliranih transkripata je bila daleko ispod nivoa u 0 tački (skoro 6 puta manje nakon 24 i 48 sata). U listovima na kojima su se larve hranile 72 sata detektovana je izuzetno slaba aktivnost *BvSTI* gena.



**Slika 20.** RT-PCR analiza ekspresije *BvSTI* gena indukovana ishranom larvi FAW kod F1010 linije šećerne repe. Akumulacija *BvSTI* transkripata praćena je na način opisan uz Sliku 12.

## **4.2. BIOTEST SA LARVAMA *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith**

Potencijalno negativno dejstvo BvSTI IP na rast i razviće insekta *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, FAW, praćeno je nakon ishrane ovih larvi na listovima i korenovima ista četiri genotipa šećerne repe, koji se međusobno razlikuju po nivou rezistencije na larve SBRM, ali i po nivou ekspresije *BvSTI* gena. Parametri rasta i razvića analizirani su kod larvi koje su se hranile SBRM rezistentnim genotipovima F1016, F1015 i UT-8, kod kojih je zabeležen relativno visok nivo ekspresije *BvSTI* gena nakon mehaničkog povređivanja, kao i osetljivim F1010 genotipom, sa najnižim zabeleženim nivoom ekspresije ovog gena.

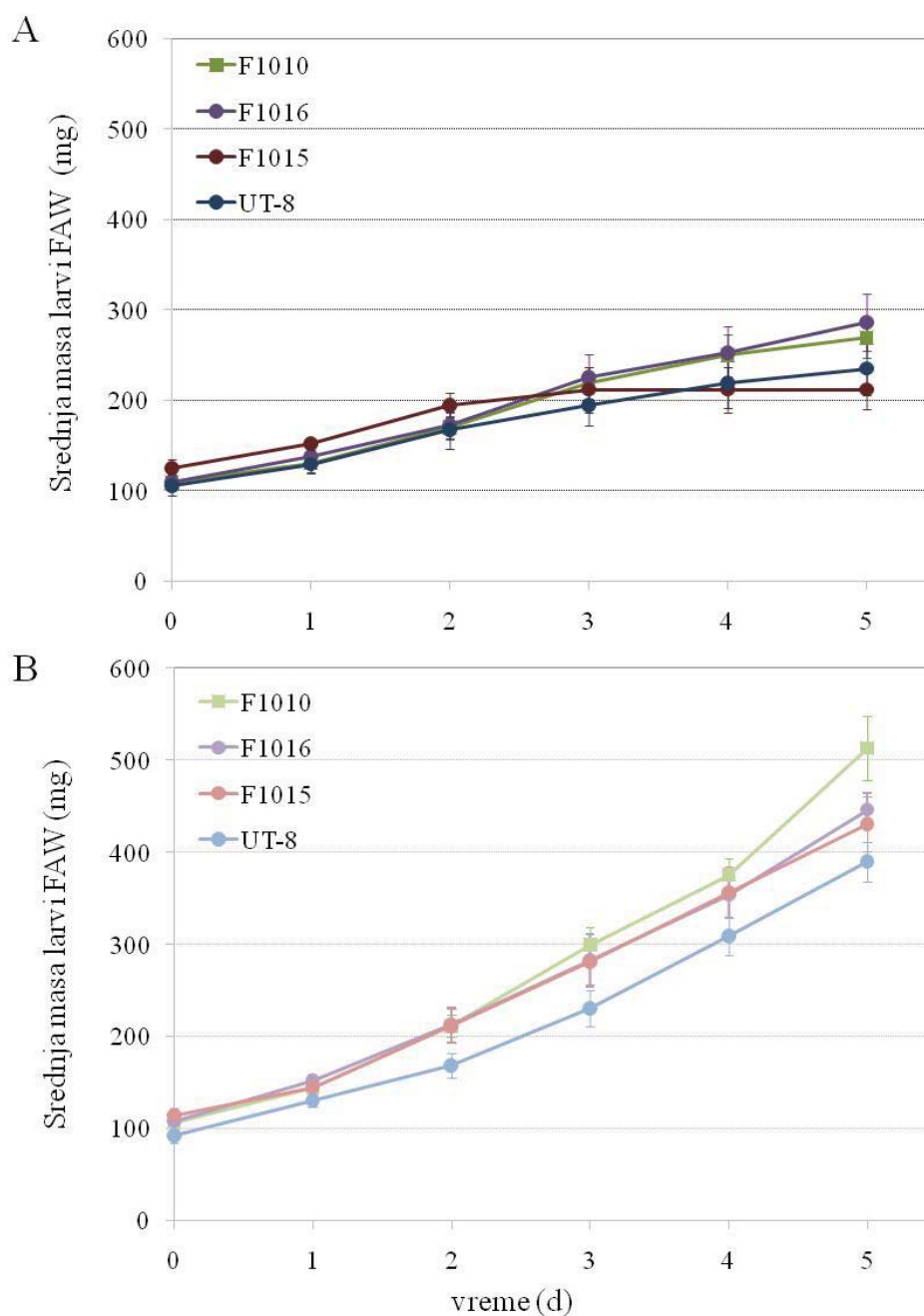
### **4.2.1. Parametri rastenja larvi**

Deset dana nakon izleganja iz jaja i hranjenja na veštačkoj podlozi, po 10 larvi FAW je postavljeno na listove i korenove svakog od četiri ispitivana genotipa. Masa larvi merena je tokom 5 dana najintenzivnije aktivnosti, sve dok prve larve nisu ušle u fazu pred ulutkavanje i počele da gube na masi usred prelaska u sledeći razvojni stadijum. Posmatranje lutki nastavljeno je sve do izleganja adulta. Iako u biotestu nije praćen uticaj na ukupno preživljavanje, uočeno je da je ishrana larvi tokom kratkog perioda od svega 5 dana imala značajan uticaj na neke parametre rasta i razvića insekata FAW.

Tokom ishrane i rasta larvi na korenovima i listovima šećerne repe praćeni su sledeći parametri rasta: masa larvi, ukupno povećanje mase i dnevno povećanje mase.

Srednja masa larvi FAW koje su se hranile korenovima (Slika 21A) nije se statistički značajno razlikovala među ispitivanim genotipovima tokom prvih 4 dana od početka eksperimenta. Međutim, na kraju 5. dana uočne su najveće razlike u vrednostima za prosečne mase larvi. Najteže larve sa prosečnom masom od 285,7 mg bile su one koje su se hranile na korenovima rezistentnog F1016 genotipa. Sa druge strane, najlakše su bile larve sa UT-8 korenova, sa masom od 211,5 mg, dok

su larve sa trećeg rezistentnog genotipa F1015, i osetljivog F1010, imale prosečnu masu između ovih krajnjih vrednosti (Tabela 8).



**Slika 21.** Masa larvi *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith tokom ishrane na korenovima (A) i listovima (B) četiri genotipa šećerne repe sa različitim stepenom osetljivosti prema SBRM larvama, osetljivog F1010 i rezistentnih F1016, F1015 i UT-8. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti ukupne mase larvi  $\pm$  SE ( $n=10$ ).

Larve FAW koje su se hranile listovima šećerne repe su značajno više napredovale tokom eksperimenta u odnosu na larve sa korenova (Slika 21B). Iako su na početku eksperimenta mase larvi bile ujednačene, larve sa listova su bile u proseku 1,8 puta teže od larvi koje su se hranile korenovima šećerne repe. Statistički značajne razlike u masi među larvama koje su hranile listovima različitih genotipova repe uočene su već nakon drugog dana od početka hranjenja. Najteže larve 5. dana bile su one koje su se hranile listovima sa SBRM osetljivog genotipa F1010, sa prosečnom masom od 513,3 mg. Larve koje su se hranile SBRM rezistentnim genotipovima bile su međusobno slične (446,2 mg sa F1016, 430,8 mg sa F1015 i 389,7 mg sa UT-8 genotipa), ali statistički značajno lakše od onih sa osetljivog genotipa (Tabela 8).

Poređenje ukupnog povećanja mase larvi ostvarenog tokom 5 dana pokazalo je nešto oštriju razliku među larvama koje su se hranile korenovima različitih genotipova. Larve koje su se hranile F1010, F1016 i UT-8 korenovima povećale su masu za više od 2 puta u odnosu na početne mase, sa maksimalnim uvećanjem od 175,9 mg kod F1016 linije, dok je najmanje povećanje zabeleženo kod larvi sa F1015 od svega 87,2 mg (Tabela 8). Kod larvi koje su se hranile listovima, ukupno uvećanje mase bilo je znatno veće nego kod onih koje su se hranile korenovima. Larve koje su se hranile osetljivim F1010 genotipom, bile su najteže na kraju eksperimenta, pa su prema tome i pokazale najveće ukupno uvećanje mase (Tabela 8). Ove larve uvećale su svoju masu za čak 407,0 mg. Kod preostala tri genotipa prosečno ukupno uvećanje mase bilo je značajno niže i iznosilo 338,2 mg kod F1016, 316,5 mg kod F1015 i 298,0 mg kod larvi sa UT-8 listova.

Ukoliko se povećanje mase larvi posmatra na nivou dnevnog uvećanja, očava se da su larve sa korenova kod sva četiri genotipa uvećavale najintenzivnije svoju masu samo do drugog (kod UT-8 genotipa), odnosno trećeg dana (kod preostala tri genotipa), a zatim je došlo do usporenog rasta (Slika 22A). Iako su larve i dalje nastavile da dobijaju na masi, što se vidi iz ukupnog povećanja koje u tom periodu i dalje ima pozitivan trend (Slika 21A), dnevno uvećanje mase postaje sve manje. U periodu njihove najintenzivnije ishrane larve su dnevno uvećavale svoju masu na UT-8 genotipu za 38,2 mg (između prvog i drugog dana), a na F1015

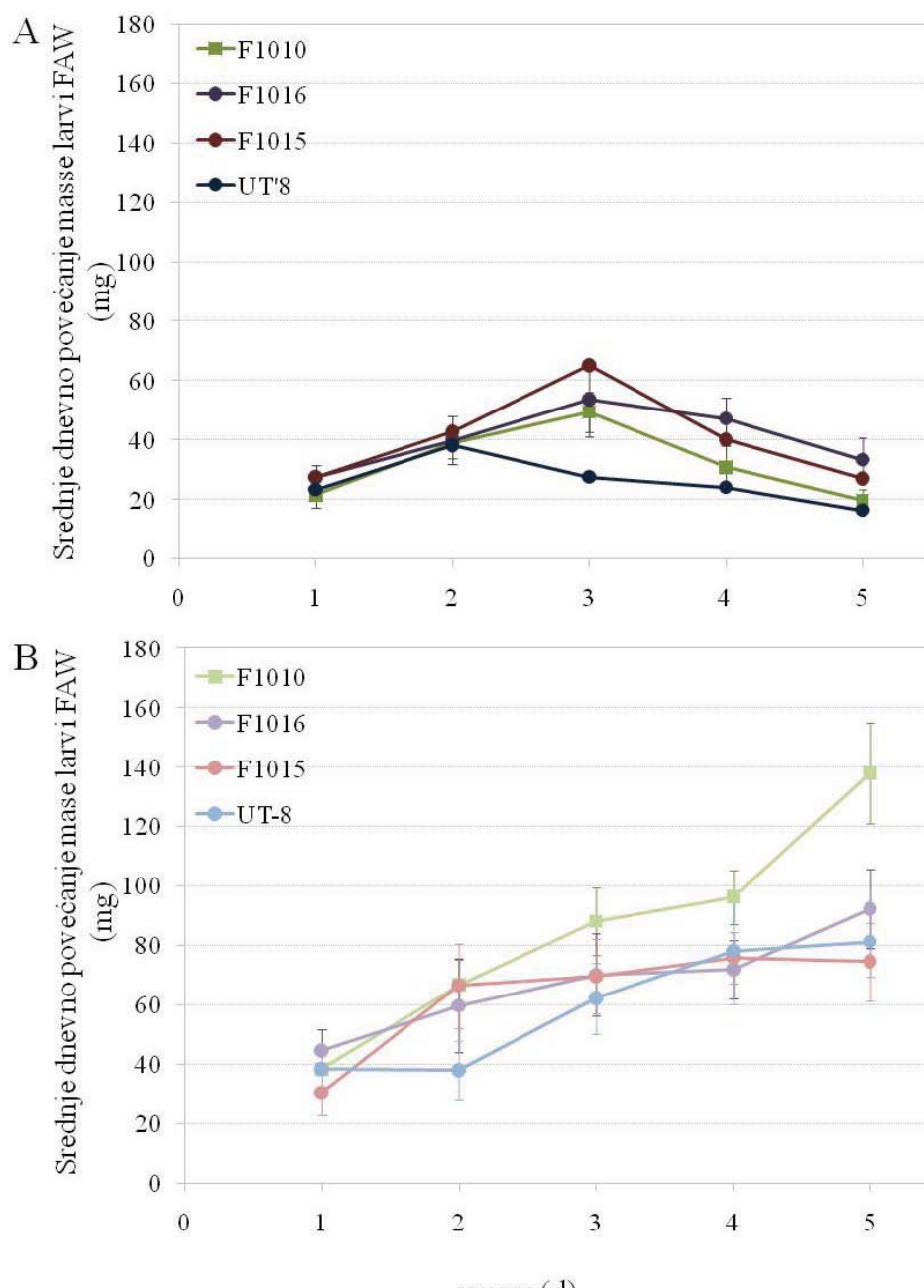
za 65,1 mg, na F1016 za 53,4 mg i 49,3 mg na F1010 genotipu (između drugog i trećeg dana). Međutim, s obzirom da su larve nakon ovog perioda znatno manje uvećavale svoju masu, srednje vrednosti za dnevni prirast mase su znatno niže i iznose 40,4 mg za larve sa F1015 genotipa, 40,2 mg sa F1016, 32,2 mg sa F1010 i svega 25,9 mg za larve sa UT-8 korenova.

**Tabela 8.** Konačna masa i ukupno povećanje mase larvi FAW tokom ishrane na korenovima i listovima četiri genotipa šećerne repe

	<i>Konačna masa larvi (mg)</i>		<i>Ukupno povećanje mase larvi (mg)</i>	
	<i>korenovi</i>	<i>listovi</i>	<i>korenovi</i>	<i>listovi</i>
<b>F1010</b>	285,7 ± 31,8 a	513,3 ± 34,5 a	160,1 ± 16,2 a	407,0 ± 34,2 a
<b>F1016</b>	269,0 ± 22,8 ab	446,2 ± 17,7 b	175,9 ± 24,7 a	338,2 ± 13,6 b
<b>F1015</b>	234,9 ± 25,9 ab	430,8 ± 30,2 b	87,2 ± 16,9 b	316,5 ± 26,8 b
<b>UT-8</b>	211,5 ± 22,1 b	389,7 ± 21,8 b	129,3 ± 17,7 a	298,0 ± 22,7 b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE ( $n=10$ ). Za svaku kolonu različita slova ukazuju na statistički značajne razlike među konačnim masama ili ukupnim povećanjima mase larvi sa različitim genotipova prema LSD testu ( $P \leq 0.05$ ).

Za razliku od korenova, prikaz dnevnih uvećanja mase larvi koje su se hranile listovima 4 genotipa šećerne repe, ima drugačiji obrazac. Kod svih genotipova larve su iz dana u dan dobijale sve više na masi (Slika 22B). Larve koje su bile najteže na kraju eksperimenta hranile su se osetljivim F1010 listovima, sa prosečnim dnevnim prirastom od 85,4 mg. Kod ostalih larvi koje su se hranile rezistentnim genotipovima šećerne repe prosečna uvećanja mase na dnevnom nivou bila su statistički značajno manja. Tako je prosečan dnevni porast mase kod F1016 linije iznosio 67,6 mg, kod UT-8 je bio 63,3 mg, dok je najmanji dnevni porast zabeležen kod F1015 linije od 59,6 mg.



**Slika 22.** Dnevno povećanje mase larvi *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith tokom ishrane na korenovima (A) ili listovima (B) četiri genotipa šećerne repe sa različitim stepenom osetljivosti prema SBRM larvama, osetljivog F1010 i rezistentnih F1016, F1015 i UT-8. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  SE ( $n=10$ ).

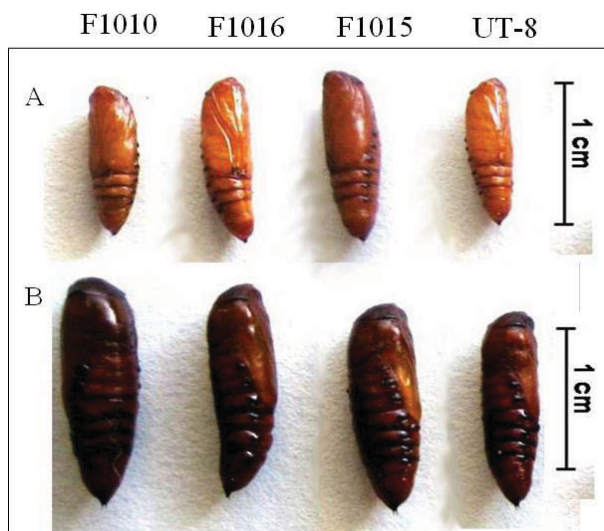


#### 4.2.2. Razviće larvi

Nakon intenzivne ishrane larvi na korenovima i listovima šećerne repe tokom pet dana, posmatran je dalji tok razvića ovih insekata kroz sledeći razvojni stadijum - lutku, sve do izleganja adulta.

Neposredno pred prelazak u stadijum lutke, sve larve su prestale sa ishranom, umirile se i nakon stvaranja čvrstog hitinskog omotača prešle u sledeći stadijum razvića. Kako larvama FAW nije bilo omogućeno da se u fazi pred ulutkavanje ukopaju, prelazak u stadijum lutke nije bio u potpunosti sinhronizovan.

S obzirom na značajno intenzivniju ishranu larvi na listovima nego na korenovima i na veće dnevne i ukupne priraste mase (Slike 21 i 22), veličina svih FAW lutki sa listova (Slika 23B) bila je značajno veća od veličine lutki sa korenova (Slika 23A) bez obzira na genotip kojim su se larve hranile. Takođe, primećeno je da hitinski omotač kod lutki sa listova ima nešto tamniju boju od omotača lutki sa korenova.



**Slika 23.** Izgled FAW lutki razvijenih od larvi koje su se hranile korenovima (A) ili listovima (B) četiri različita genotipa šećerne repe, osetljivog F1010 ili rezistentnih F1016, F1015 i UT-8.

Najveća razlika u masi lutki sa korenova i listova primećena je kod F1010 genotipa (Tabela 9). Kod ove grupe prosečna masa lutki sa listova bila je čak 1,4 puta veća nego masa lutki sa korenova. Nešto manja razlika zapažena je kod F1015 i F1016 genotipova, dok je kod trećeg rezistentnog genotipa repe, UT-8, prosečna masa lutki koje su se razvile iz larvi bila slična, bez obzira da li su se larve hranile korenovima ili listovima.

**Tabela 9.** Masa lutki FAW razvijenih iz larvi koje se se hranile korenovima i listovima četiri genotipa šećerne repe

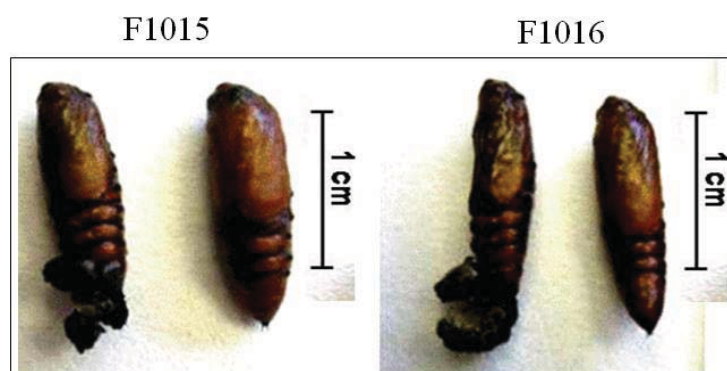
	<i>Masa lutki (mg)</i>	
	<i>korenovi</i>	<i>listovi</i>
<b>F1010</b>	141,0 ± 3,0 b	202,8 ± 20,2 a
<b>F1016</b>	158,8 ± 10,5 a	180,0 ± 10,1 a
<b>F1015</b>	166,1 ± 8,1 a	201,4 ± 9,7 a
<b>UT-8</b>	140,2 ± 7,0 b	137,2 ± 14,4 b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE ( $n=10$ ). Za svaku kolonu različita slova ukazuju na statistički značajne razlike među masama lutki razvijenih iz larvi koje su se hranile različitim genotipova prema LSD testu ( $P \leq 0.05$ ).

Među FAW lutkama koje su se razvile iz larvi koje su se hranile korenovima, najkrupnije su bile one sa F1015 i F1016 genotipova repe sa prosečnom masom od 158,8 mg i 166,1 mg, dok su lutke sa F1010 ili UT-8 bile statistički značajno lakše sa prosečnom masom za obe grupe od oko 140 mg (Tabela 9).

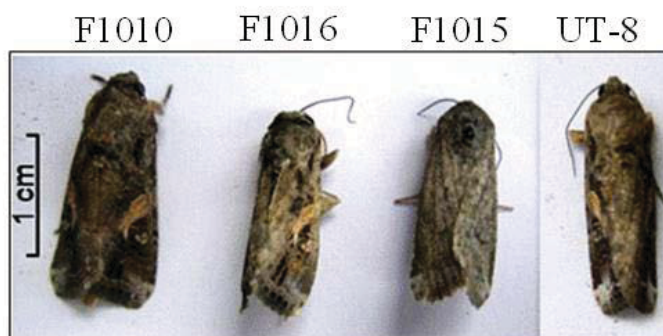
S druge strane kod lutki razvijenih na listovima najkrupnije i najteže su bile one sa F1010 genotipa šećerne repe sa masom od čak 202,8 mg. Sličnu masu imale su lutke sa F1016 i F1015 listova, dok su lutke sa UT-8 genotipa bile statistički značajno lakše od svih ostalih (Tabela 9).

Iako cilj ovog biotesta nije bilo praćenje mortaliteta insekata tokom različitih stupnjeva razvića, zapaženo je da su se prilikom prelaska u lutku kod nekih jedinki javile malformacije koje su rezultovale zaustavljanjem razvića i uginućem. Svega nekoliko larvi i to isključivo sa SBRM rezistentnih F1016 i F1015 listova nije u potpunosti završilo metamorfozu u lutku, dajući slične vidove deformiteta, obično u vidu zaostalih nepokrivenih delova tela (Slika 24).



**Slika 24.** Prikaz abnormalnih lutki razvijenih iz larvi koje su se hranile listovima rezistentnim F1015 i F1016 genotipova šećerne repe. Uz abnormalne (levo) prikazane su i normalno razvijene lutke (desno) koje su se hranile istom hranom.

Iz svih normalno razvijenih lutki nakon 7-10 dana izlegli su se adulti (Slika 25). Svi razvijeni adulti bili su slične veličine i normalnog izgleda.



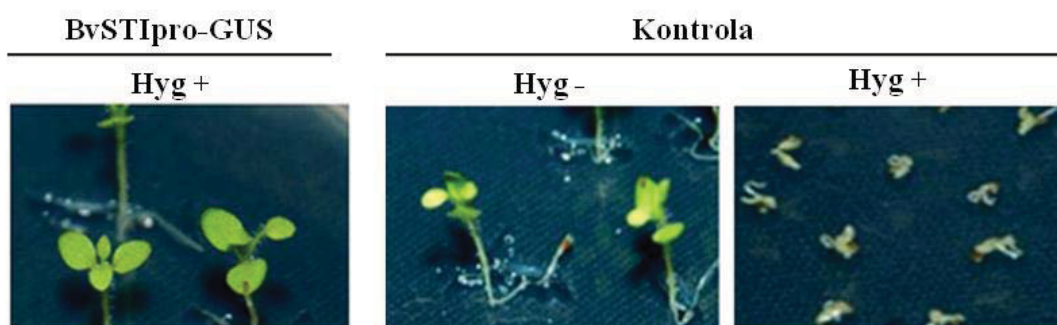
**Slika 25.** Adulti FAW razvijeni nakon ishrane na genotipova šećerne repe koji se odlikuju različitim nivoom otpornosti prema larvama SBRM.

**4.3. EKSPRESIJA PROMOTORSKOG REGIONA *BvSTI* GENA U TRANSGENOM DUVANU**

Za analizu indukcije promotorskog regiona *BvSTI* gena (*BvSTI*pro) i njegove uloge u indukciji ekspresije ovog gena korišćene su transgene biljke duvana (*Nicotiana benthamiana* Domin), u kojima se pod kontrolom ove regulatorne sekvence nalazi GUS reporter gen. Ekspresija himeričnog *BvSTI*pro-GUS gena praćena je u biljkama duvana različite starosti, kao i nakon mehaničkog povređivanja ili ishrane larvi FAW.

**4.3.1. Selekcija Hyg otpornih T2 linija transgenog duvana**

Semena sakupljena sa 6 nasumice odabranih T1 samooplodnih biljaka duvana testirana su na osetljivost prema selektivnom antibiotiku higromicinu, radi provere stabilne integracije transgena. Prilikom isključivanja na agaroznoj podlozi sa Hyg u koncentraciji od 40 mg/l većina semena svih testiranih linija pokazala je otpornost, ukazujući na dominantnu ekspresiju *hptII* gena i aktivnost higromicin fosfotransferaze. Kod kontrolnih semena, sakupljenih sa netransformisanih biljaka duvana, procenat klijanja na podlozi bez Hyg bio je 100%, dok je na podlogama sa Hyg došlo do uginuća svih klijanaca odmah po isključivanju (Slika 26).



**Slika 26.** Testiranje T2 *BvSTI*pro-GUS linija duvana na osetljivost prema selektivnom antibiotiku higromicinu (Hyg). Klijanci kontrolnih i transgenih linija tokom klijanja na podlozi bez (Hyg -) ili sa Hyg u koncentraciji od 40 mg/l (Hyg +).

Upoređivanjem broja prokljalih (Hyg rezistentnih) u odnosu na broj neprokljalih (Hyg osetljivih) semena izračunati su fenotipski segregacioni odnosi za *hptII* gen. Dobijene vrednosti ovih odnosa upoređene su  $\chi^2$  testom sa očekivanim 3:1 Mendelovim odnosima za slučaj integracije pojedinačnih transgena (eng. *single integration site*). Rezultati testa pokazuju da dobijeni segregacioni odnosi za *hptII* gen kod svih testiranih linija ne pokazuju statistički značajne razlike u odnosu na očekivane (Tabela 10), ukazujući na nuklearnu lokalizciju ovog gena. Sve testirane linije bile su heterozigotne za *hptII* gen. Pet od šest analiziranih T1 linija kod kojih je segregacioni odnos bio najbliži teorijskom 3:1 odnosu odabrane su za dalje histohemijske analize (3-1, 3-4, 8-1, 14-2 i 32-1).

**Tabela 10.** Segregacioni odnosi *hptII* gena kod T2 linija transgenog duvana dobijeni na osnovu broja rezistentnih (R) i osetljivih (O) semena na podlozi za isključavanje sa Hyg

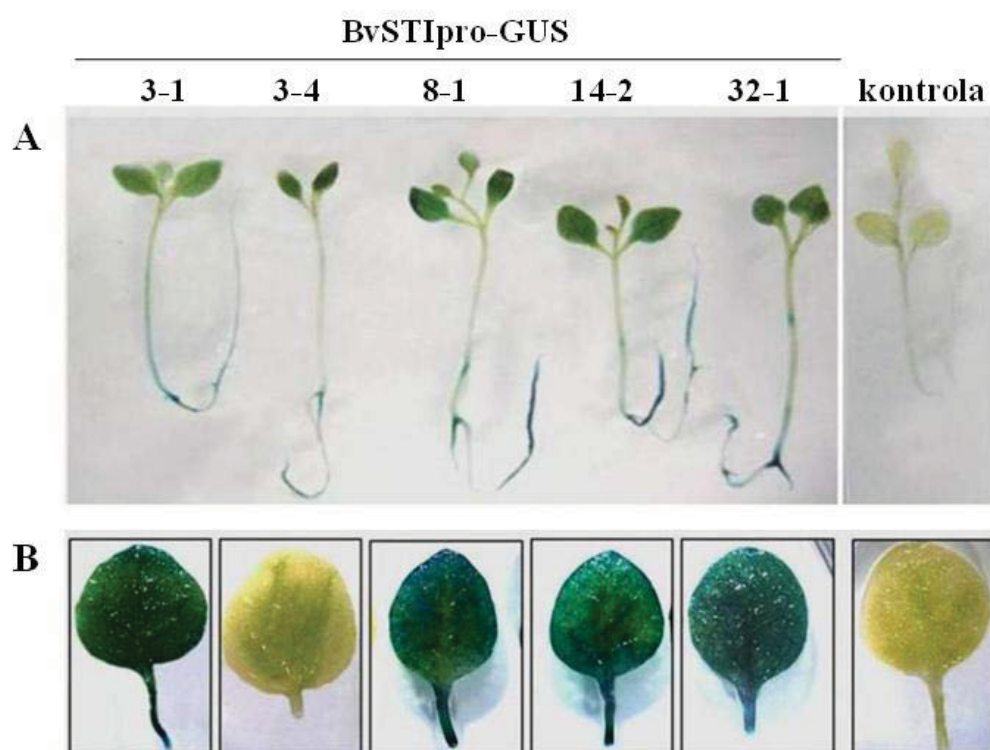
<b>T1 biljke</b>	<b>Dobijeni broj T2 biljaka (R:O)</b>	<b>Očekivani broj biljaka (3R:1O)</b>	<b><math>\chi^2</math></b>
<b>kontrola bez Hyg</b>	50 : 0	---	---
<b>kontrola na Hyg</b>	0 : 50	---	---
<b>3-1</b>	87 : 29	87 : 29	0,00*
<b>3-4</b>	96 : 37	99,75 : 33,25	0,57*
<b>8-1</b>	81 : 33	85,5 : 28,5	0,95*
<b>14-2</b>	84 : 51	138,75 : 46,25	0,65*
<b>31-1</b>	11 : 8	14,25 : 4,75	2,96*
<b>32-1</b>	122 : 34	117 : 39	0,85*

Izračunate  $\chi^2$  vrednosti obeležene znakom (\*) nisu pokazivale statistički značajnu razliku u odnosu na tabelarnu vrednost za  $\chi^2$  sa  $df=1$  i  $P \leq 0.05$  koja iznosi 3,84

### 4.3.2. Ekspresija BvSTIpro-GUS gena tokom razvića duvana

U cilju utvrđivanja prostorne i vremenske ekspresije GUS gena pod kontrolom *BvSTI* promotora, histoheimijskom metodom praćena je aktivnost  $\beta$ -D-glukuronidaze u biljkama transgenog duvana različite starosti. Razvijanje plave boje u tkivima sa aktivnim GUS kodiranim enzimom praćeno je kod *in vitro* gajenih biljaka starih 2 i 6 nedelja, kao i kod biljaka gajenih u stakleniku starih 14 nedelja.

Značajna akumulacija plave boje u listovima i naroćito u mladim korenćićima, primećena je kod 2 nedelje starih biljaka gajenih *in vitro* ukazujući na visok nivo bazalne aktivnosti *BvSTI* promotora. U kontrolnim biljćicama gajenim pod istim uslovima nije došlo do razvijanja i akumuliranja plave boje (Slika 27A).

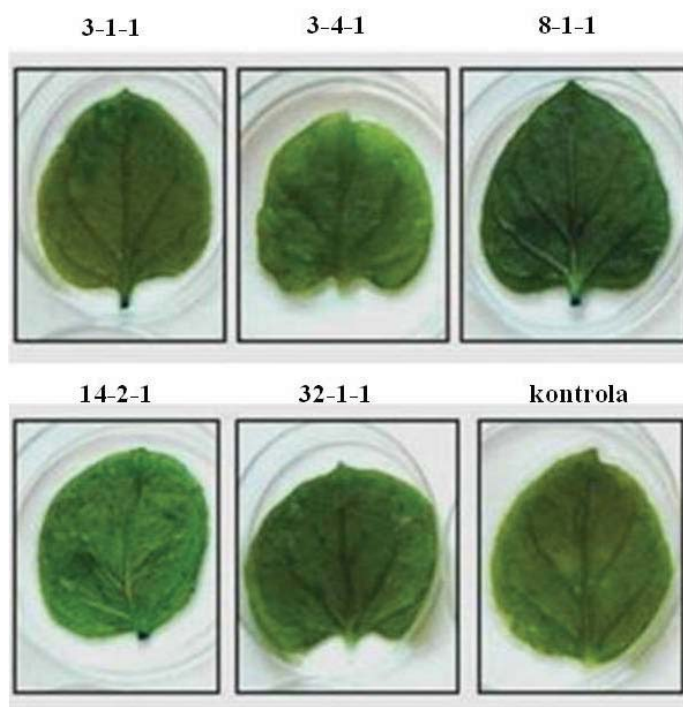


**Slika 27.** Ekspresija BvSTIpro-GUS gena kod transgenog duvana gajenog *in vitro*. Histoheimijska analiza aktivnosti *GUS* gena pokazala je prisustvo plave boje razlićitog intenziteta na mestima aktivnosti enzima  $\beta$ -D-glukuronidaze kod biljaka starih 2 (A) i 6 (B) nedelja. Plava boja nije registrovana ni kod jedne starosne grupe kontrolnih, netransformisanih biljaka duvana. Brojevi predstavljaju oznake T1 linija od kojih su linije T2 dobijene.

Nezavisno razvijene T2 linije, odabrane na osnovu testa na osetljivost prema Hyg, pokazale su različit nivo aktivnosti GUS gena predstavljen različitom obojenošću tkiva. Biljke sa najsvetlijom plavom bojom, i samim tim, najnižim nivoom GUS aktivnosti bile su potomci linija 3-1 i 3-4.

Kod 6 nedelja starih biljaka iz kulture *in vitro* registrovan je značajno intenzivniji nivo bazalne ekspresije GUS gena nego kod mlađih biljaka. Kod svih testiranih biljaka, osim kod biljaka linije 3-4, zabeleženo je prisustvo intenzivne plave boje u listovima i lisnim drškama (Slika 27B). Kod linije 3-1 nizak nivo ekspresije zabeležen kod mladih klijanaca (Slika 27A), značajno je povećan i akumulacija intenzivne plave boje bila je slična kao u ostalim testiranim linijama. Samo kod biljaka linije 3-4 i tokom 6. nedelje od isključavanja zadržao se relativno nizak nivo ekspresije GUS gena.

Međutim, prilično visok nivo bazalne ekspresije GUS gena primećen kod mladih biljaka gajenih u uslovima *in vitro*, kod starijih biljaka gajenih u stakleniku postao je manje intenzivan. Skoro da uopšte nije primećena pojava plave boje na liskama ili drškama svih testiranih linija, ukazujući na izostanak aktivnosti GUS gena. Samo na mestima gde je list povređen, isecanjem prilikom branja sa biljke ili dodirivanjem pincetom tokom histohemijskog bojenja, javljala se lokalizovana plava boja ukazujući na povređivanjem indukovanu ekspresiju *BvSTI* promotora i GUS gena.



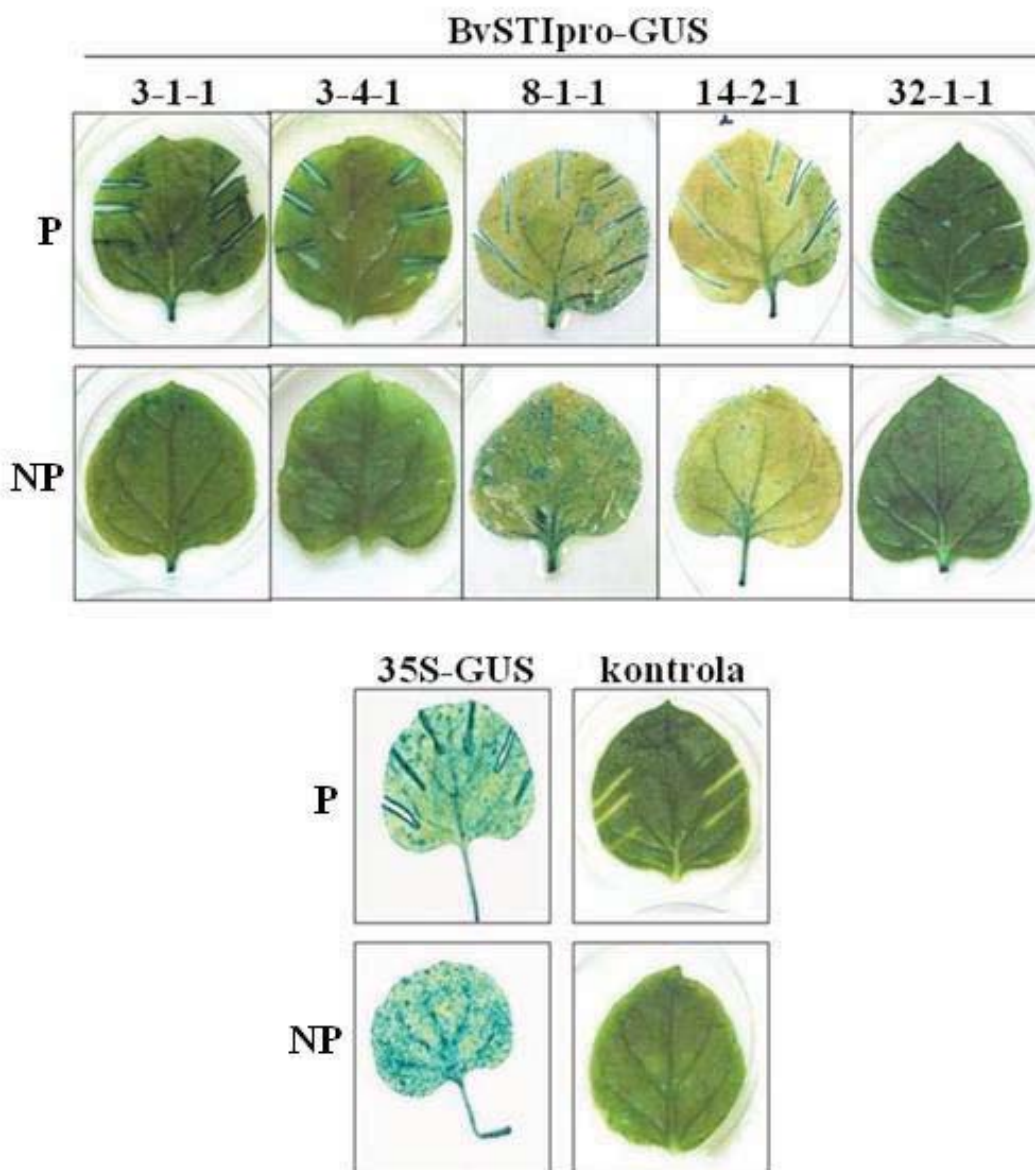
**Slika 28.** Ekspresija BvSTIpro-GUS gena kod biljaka transgenog duvana starih 14 nedelja. Brojevi predstavljaju oznake T2 linija duvana.

#### 4.3.3. Ekspresija BvSTIpro-GUS gena u povređenim tkivima duvana

Da bi se ispitalo da li je moguće povređivanjem indukovati ekspresiju BvSTIpro-GUS gena, odabrana je po jedna T2 biljka koja se pokazala kao najreprezentativniji predstavnik za svaku liniju na osnovu praćenja ekspresije GUS gena tokom razvića. Ekspresija GUS gena pod kontrolom *BvSTI* promotora u povređenim tkivima poređena je sa ekspresijom u biljkama duvana koje su u sebi nosile GUS gen pod kontrolom konstitutivno eksprimiranog 35S promotora. Histochemijska analiza ekspresije *GUS* gena rađena je na listovima i korenovima 14 nedelja starih biljaka iz staklare, kod kojih je prethodno pokazan nizak nivo bazalne ekspresije.



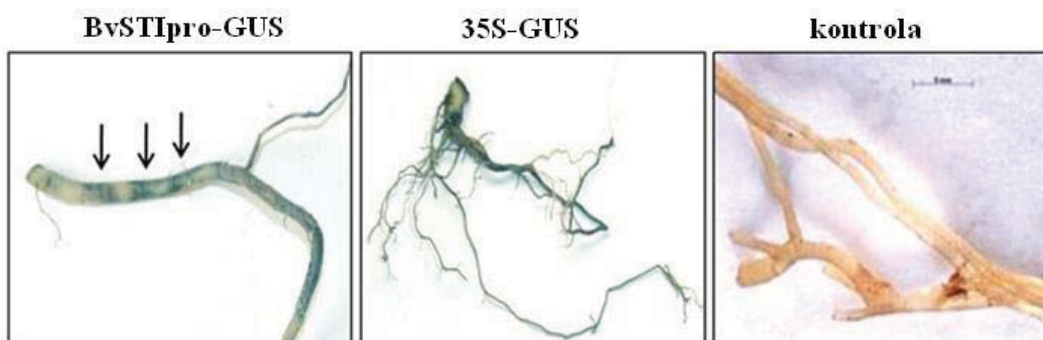
Rezultati analize obojenih delova ukazuju na indukovanu i lokalizovanu BvSTIpro aktivnost u listovima BvSTIpro-GUS transgenih biljaka duvana kao odgovor na mehaničko povređivanje i ishranu FAW larvi (Slike 29 i 30).



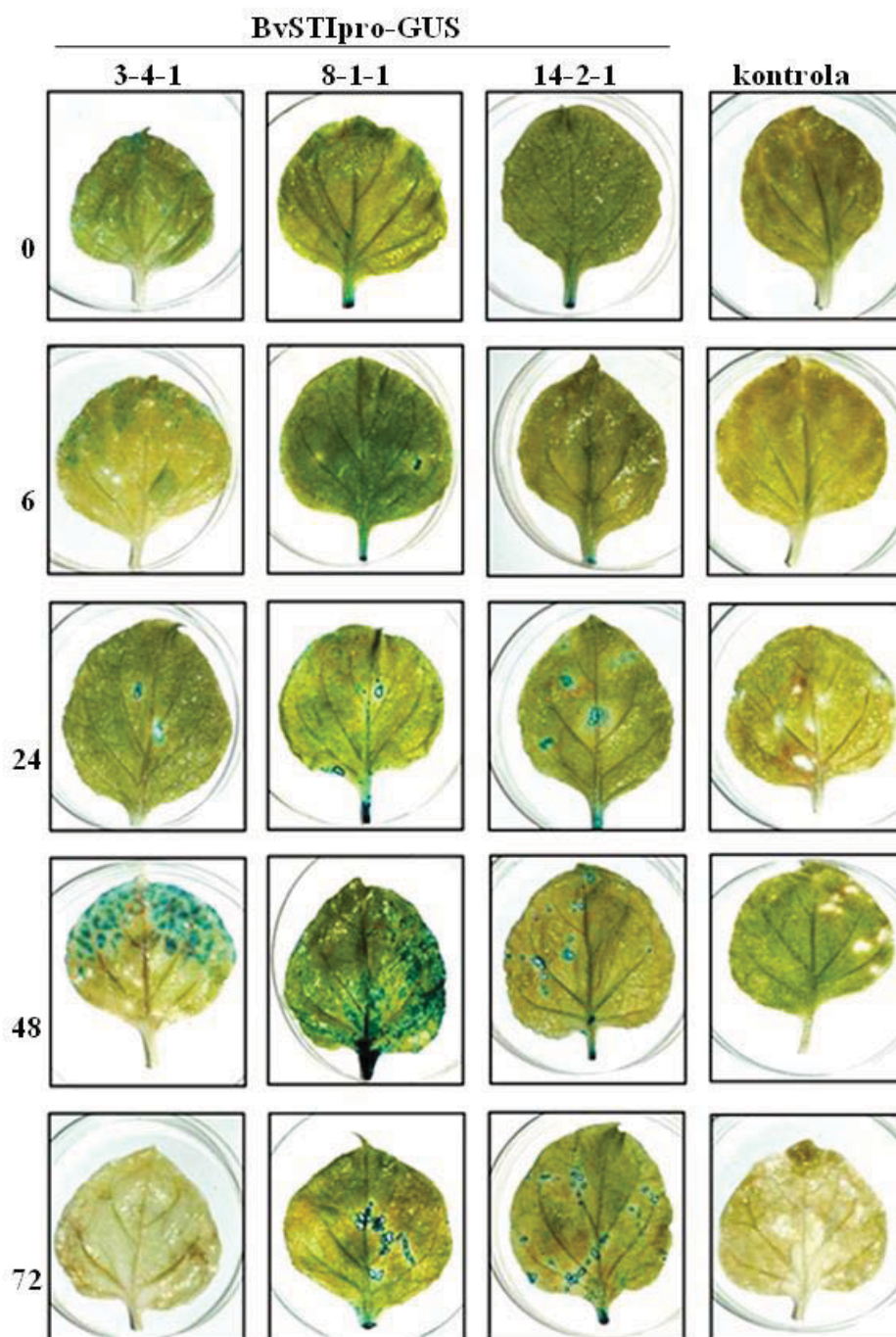
**Slika 29.** Ekspresija BvSTIpro-GUS gena kod mehanički povređenih (P) ili nepovređenih (NP) listova transgenog duvana. Prisustvo plave boje na mestima aktivnosti enzima  $\beta$ -D-glukuronidaze kod 14 nedelja starih biljaka na mestima povređivanja poređeno je sa nepovređenim BvSTIpro-GUS listovima, kao i sa 35S-GUS i kontrolnim netransformisanim biljkama. Brojevi predstavljaju oznake pojedinačnih T2 biljaka kod kojih je urađena analiza.

Nakon mehaničkog povređivanja listova svih analiziranih biljaka uočena je povećana ekspresija GUS gena i to na mestima povređivanja (Slika 29). Presecanje samo ivica listova izbegavanjem provodnih sudova, rezultovalo je u lokalizovanoj akumulaciji plave boje u uskoj zoni oko povređenog tkiva. GUS ekspresija u nepovređenim listovima (Slika 29) bila je neznatna i uočljiva samo na mestima gde je list otkinut sa biljke ili dodirnut tokom izvođenja eksperimenta. Nasuprot tome, listovi 35S-GUS transgenih biljaka pokazivali su visok stepen konstitutivne ekspresije GUS gena po čitavoj površini lista sa najintenzivnijom plavom bojom na mestima povređivanja. Kod kontrolnih netransformisanih biljaka nije zabeležena pojava plave boje u nepovređenim listovima, a takođe ni nakon povređivanja.

U korenovima biljaka raslih u staklari takođe je analizirana akumulacija plave boje usled aktivnosti GUS gena pod kontrolom *BvSTI* promotora nakon mehaničkog povređivanja (Slika 30). Pokazano je da je odgovor na povređivanje kod korenova takođe inducibilan, kao i kod listova, sa jasnom plavom bojom razvijenom na mestima na kojima su pincetom prignječeni delovi korenova. Ipak ovde je primećeno da je zona u kojoj se akumulira plava boja nešto šira nego kod listova. Odgovor GUS gena pod kontrolom 35S promotora bio je više sistemski sa nejasno izraženom granicom između povređenog dela i ostatka korena.



**Slika 30.** Ekspresija GUS gena u mehanički povređenim transgenim korenovima duvana. Prisustvo plave boje akumulirano na mestima povređivanja kod *BvSTI*pro-GUS korenova poređeno je sa 35S-GUS kao i kontrolnim netransformisanim korenovima.



**Slika 31.** Ekspresija BvSTIpro-GUS gena u listovima transgenog duvana nakon ishrane FAW larvi. Aktivnost GUS gena utvrđivana je posredno preko akumulacije plave boje na mestima aktivnosti enzima  $\beta$ -D-glukuronidaze nakon 6, 24, 48 i 72 sata od početka ishrane lervu. Aktivnost GUS gena u povređenim listovima poređena je sa nepovređenim listovima BvSTIpro-GUS biljaka (0), kao i sa kontrolnim, netransformisanim biljkama. Brojevi predstavljaju oznake pojedinačnih T2 biljaka kod kojih je urađena analiza.

Biljke duvana T2 generacije kod kojih je praćena indukcija ekspresije BvSTIpro-GUS himeriãnog gena nakon mehaniãkog povređivanja korišćene su i za ishranu larvi FAW. Akumulacija plave boje praćena je u listovima kojima su se larve hranile tokom 6, 24, 48 ili 72 sata. Histohehmijsko bojenje povređenih listova pokazalo je jasno lokalizovanu ekspresiju *GUS* gena u uskoj zoni oko mesta povređivanja (Slika 31). U okolnom nepovređenom tkivu nije registrovana aktivnost GUS kodiranog enzima β-D-glukuronidaze pojavom plavo obojenog produkta. Listovi kontrolnih netransformisanih biljaka takode su pretrpeli vrlo sliãan stepen oštećenja tkiva od strane larvi, ali u njima nije došlo do akumulacije plave boje.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. SAVREMENE MERE BORBE PROTIV INSEKATA ŠTETOČINA

Prema procenama Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO) do 2050. godine broj stanovnika na Zemlji povećavaće se za 75 miliona godišnje, što će dovesti do rasta od 35% u odnosu na sadašnji broj i konačnog broja od 9,1 milijardi ljudi (FAO 2009). Jedna od najznačajnijih posledica ovako dramatičnog porasta broja stanovnika svakako će biti nedovoljna količina dostupne hrane. Procenjuje se da bi ovakav rast broja ljudi morao da prati i porast u količini proizvedene hrane od čak 70% u odnosu na količinu proizvedenu u periodu 2005/07 (FAO 2009).

Značajni gubici u količini proizvedenih useva sa kojima se danas sukobljavaju uzgajivači hrane širom sveta, a nastali kao posledica nedovoljne kompeticije useva sa korovima, napada različitih patogena, virusa ili životinja štetočina, moraju se umanjiti. Štete koje najznačajniji usevi trpe usled napada životinja štetočina, među kojima su najbrojniji i najznačajniji insekti, predstavljaju bitan udeo u ukupnim gubicima, a procenjuju se na oko 7% kod pšenice, 15% kod pirinča, 9% kod kukuruza, 10% kod krompira i 8% kod soje za period 2001-2003 (Oerke 2006). O veličini i značaju gubitaka prouzrokovanih insektima možda najjasnije govori primer štetočine *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: *Noctuidae*), koja je veoma zastupljena na velikom broju različitih useva širom Azije, Afrike, Australije i u Evropi duž Mediterana. Godišnji gubici nastali usled intenzivne ishrane larvi ovog insekta procenjuju se na preko 2 milijarde US dolara, uprkos ulaganju preko 500 miliona dolara u insekticide kojima se vrši kontrola ovih štetočina (Sharma 2001). Međutim, insekti ne uzrokuju samo direktne gubitke svojom ishranom već predstavljaju problem i kao prenosioci velikog broja različitih biljnih patogena i izazivača oboljenja. Danas se zna da preko 200 oboljenja biljaka može biti preneto insektima kao vektorima (Haq 2004).

Intenziviranjem poljoprivredne proizvodnje, koje podrazumeva pre svega uvećavanje površina pod poljoprivrednim kulturama, raznovrsni ekosistemi u

mnogim slučajevima zamenjeni su ranjivim jednoličnim agro-ekosistemima u kojima su insekti štetočine doživeli punu ekspanziju. Osim toga, i na mestima gde se poljoprivredni proizvodi i semena čuvaju stvaraju se idealni uslovi za dramatična povećanja brojnosti u populacijama insekata koji se ovde hrane. Iako se u borbi protiv insekata štetočina primenjuju različite metode, gubici kod najznačajnijih useva i dalje imaju rastući trend (Dhaliwal i Koul 2010).

Najznačajnija mera borbe protiv insekata štetočina jeste aplikacija hemijskih pesticida. Procenjuje se da se godišnje primeni i do 3 miliona tona insekticida širom sveta (Dhaliwal i Koul 2010). Osim što ova mera predstavlja dodatni trošak za uzgajivača, masivna upotreba hemijskih pesticida često dovodi i do pojave štetnih efekata kod useva, ali i neselektivnog uništavanja korisnih insekata. Poseban rizik po okolinu i zdravlje ljudi predstavlja zaostajanje nerazgrađenih čestica sa insekticidnim dejstvom, koje zatim dospevaju do vode i hrane, te predstavljaju značajnog zagađivača okoline. Ipak jedna od najvećih opasnosti koja prati masovnu aplikaciju insekticida na usevima jeste razvijanje otpornosti na te hemijske agense u populacijama insekata štetočina. Za čak 16 vrsta insekata prijavljeno je postojanje potpune rezistentnosti na sve do sada korišćene aktivne hemijske materije u čak 3237 slučajeva do 2008. godine (Whalon i sar. 2008; Andow 2008). Stoga su savremene biotehnološke strategije, koje uglavnom podrazumevaju razvijanje biljnih genotipova sa povišenim stepenom otpornosti na insekte štetočine, danas postale poželjna alternativa.

Metodama genetičkog inženjeringa moguće je dobiti transgene biljke koje aktivno sintetišu agense sa insekticidnim dejstvom (Lemaux 2008; Lawrence i Koundal 2002). Zbog potvrđenog negativnog uticaja biljnih IP na rast i razviće insekata, geni koji kodiraju ove proteine postali su glavni kandidati u borbi protiv štetočina (Dunse i sar. 2010; Maheswaran i sar. 2007; Abdeen i sar. 2005). Do danas više desetina IP gena iz različitih biljnih vrsta je metodama genetičkog inženjeringa uvedeno u genome biljaka koje su zatim pokazivale povišen nivo otpornosti prema insektima štetočinama (Ninković i sar. 2007; Ferry i sar. 2006; De Leo i Gallerani 2002; Duan i sar. 1996; Graham et al, 1995). Među ovim biljkama puno je i poljoprivrednih kultura, kao što su grašak (Charity i sar. 1999), pirinač

(Bu i sar. 2006; Alfonso-Rubi 2003; Xu i sar. 1996), pšenica (Bi i sar. 2006), karfiol (Lu i sar. 2005), krompir (Marchetti i sar. 2000; Gatehouse i sar. 1996; Cloutier i sar. 2000), paradajz (Brunelle i sar. 2004), jagoda (Graham i sar. 1997). Linije transgenog pirinača sa ubačenim i eksprimiranim proteinaznim inhibitorom iz krompira (PI-II) pokazale su povišen stepen rezistentnosti na larve *Sesamia inferens* (Duan i sar. 1996), dok je u eksperimentima u kojima su se larve *Mamestra brassicae* hranile transgenim biljkama arabidopsisa i duvana u kojima je bio eksprimiran gen za inhibitor tripsina iz slačice *MTI-2* pokazano da su larve vrlo senzitivne na visoke koncentracije akumuliranih inhibitora, sa značajnom stopom smrtnosti i redukovanim masama, zajedno sa pojačanom ekspresijom digestivnih proteinaza (De Leo i sar. 2001).

IP ne usmrćuju insekte direktno i trenutno, poput Bt toksina, već redukuju njihovu digestivnu efikasnost i utiču stoga negativno na njihov rast i razviće. Na ovaj način negativni selektivni pritisak na populacije štetnih insekata nešto je blaži nego u slučaju visoko insekticidnog Bt toksina, što u velikoj meri sprečava intezivan i brz razvoj rezistentnosti na ove proteine kod insekatskih populacija.

Međutim, zbog ogromnog broja herbivornih insekata koji su štetočine važnih poljoprivrednih kultura, kao i zbog činjenice da nisu svi insekti osetljivi na već okarakterisane IP, postoji potreba da se identifikuju novi insekticidni proteini. Takođe, smatra se i da je maksimalan kapacitet IP u borbi protiv štetnih insekata moguće postići korišćenjem IP transgena iz nesrodnih i filogenetski udaljenih biljnih vrsta, kao i geografski izolovanih vrsta. Izvore IP gena treba tražiti i među biljnim vrstama koje prirodno nisu izložene insektima štetočinama sa poljoprivrednih kultura, s obzirom da je tokom ko-evolucionih interakcija između biljaka i njihovih insekata štetočina došlo je do adaptacije insekata na IP njihovih biljaka domaćina. Neki od izolovanih IP gena za koje se smatra da mogu imati izuzetno veliki potencijal u borbi protiv štetočina poljoprivrednih kultura jesu tripsinski inhibitori *AeTI* iz *Archidendron ellipticum* (fam. *Mimosoideae*) retkog drveta koje se sreće u šumama Great Nicobar ostrva (Bhattacharyya i sar. 2007), *Pj* inhibitor iz južnoameričkog žbuna *Prosopis juliflora* (Oliveira i sar. 2002), *ApTI* iz tropskog drveta *Adenantha pavonia* (Macedo i sar. 2004) ili *TTI* iz afričkog drveta

*Tamarindus indica* (Araújo i sar. 2005). Takođe, kod polifagnih insekata potrebno je prethodno izvršiti analizu dejstva više dostupnih IP i utvrditi koji od njih ima najtoksičnije dejstvo na datog insekta. U radu Saadati i Bandani (2011) praćen je efekat nekoliko inhibitora serinskih proteinaza poreklom iz različitih biljnih vrsta (TLCK, TPCK, SBTI, i kombinacije SBTI i TPCK) prisutnih u veštačkim podlogama u koncentracijama od 1% i 4% na rast i razviće larvi *Eurygaster integriceps*, kao i aktivnost njihovih digestivnih proteinaza. Pokazano je da različiti IP mogu imati vrlo različite efekte na rast i razviće. Najefikasnija je bila kombinacija dva IP, sintetičkog inhibitora himotripsina, TPCK, i inhibitora tripsina iz soje, SBTI, koja je dovela do 100% smrtnosti kod larvi *E. integriceps*.

Zbog svega gore navedenog neophodno je identifikovati i okarakterisati što veći broj različitih IP gena kao potencijalnih transgena koji će se koristiti u borbi protiv herbivornih insekata štetočina. *BvSTI* gen, koji po strukturi pripada porodici serinskih inhibitora Kunitz-tipa, izolovan je iz korena šećerne repe genotipa F1016, koji je razvijen u procesima selekcije i okarakterisan kao otporan na insekt *Tetanops myopaeformis* (Puthoff i Smigocki 2007). Detaljna *in planta* karakterizacija ekspresije *BvSTI* gena šećerne repe omogućava otkrivanje insekticidnog potencijala ovog inhibitora, kao i mogućnosti njegove upotrebe u procesima razvijanja biljnih genotipova rezistentnih na insekte.

### 5.2. NIVOI EKSPRESIJE *BvSTI* GENA I STEPEN OTPORNOSTI GENOTIPOVA ŠEĆERNE REPE NA LARVE SBRM

Ekspresija *BvSTI* gena praćena je u četiri genotipa šećerne repe koji pokazuju različit stepen otpornosti na larve SBRM: otpornim F1016, F1015 i UT-8, i osetljivom F1010 genotipu. S obzirom da je poznato da je aktivnost IP gena moguće indukovati povređivanjem (Telang i sar. 2003; Pearce i sar. 1993), ispitivali smo ekspresiju *BvSTI* gena u biljkama različite starosti nakon mehaničkog povređivanja. Kod svih ispitivanih genotipova obrazac ekspresije *BvSTI* gena zabeležen u najmlađim, 6 nedelja starim tkivima, nije se značajno menjao ni kod



starijih starosnih grupa (Slike 12, 13, 14 i 15). Akumulacija povređivanjem indukovanih *BvSTI* transkripata u korenovima bila je najveća u najstarijim biljkama. S druge strane, najmlađi analizirani listovi imali su relativno visok nivo ekspresije koji se održao sve do kraja vegetativne sezone, kod 6 meseci starih biljaka.

Relativnom kvantifikacijom i upoređivanjem nivoa akumuliranih transkripata kod 6 meseci starih biljaka, uočeno je da su viši nivoi *BvSTI* transkripata detektovani kod svih SBRM otpornih genotipova šećerne repe u odnosu na aktivnost ovog gena kod osetljivog F1010 genotipa (Slike 12, 13, 14 i 15). Najviši nivo transkripata detektovan je kod F1016 genotipa (Slika 12). U korenovima ovih biljaka akumulirano je i do 4,3 puta, a u listovima 2,4 puta više transkripata kao odgovor na mehaničko povređivanje. Kod UT-8 genotipa koji se odlikuje nešto nižim stepenom otpornosti prema larvama SBRM uočen je sličan obrazac indukcije, ali je količina akumuliranih *BvSTI* iRNK bila niža, naročito u korenovima (Slika 15). Zanimljivo, kod trećeg otpornog genotipa, F1015, zabeležen je značajno različit obrazac indukcije koji se u mnogome poklapao sa obrascem dobijenim kod osetljivog F1010 genotipa. Mehaničko povređivanje je kod ova dva genotipa dovelo do početnog smanjenja u nivou ekspresije *BvSTI* gena kod povređenih u odnosu na nepovređene korenove (Slike 13 i 14). I kod F1015 i kod F1010 korenova 2 sata nakon povređivanja detektovano je manje *BvSTI* transkripata nego u nepovređenim tkivima. Međutim, za razliku od F1010 genotipa gde je snižena količina transkripata zadržana tokom 24 sata, u F1015 korenovima već nakon 2 sata količina transkripata se povećava. Ovo povećanje nije značajno, ali se ekspresija ovoga gena podiže na bazalni nivo, detektovan pre povređivanja.

Različit obrazac ekspresije *BvSTI* gena kod linija šećerne repe definisanih kao otporne na larve SBRM, mogao bi biti posledica različitog porekla ovih genotipova. F1016 genotip izveden je metodama klasičnog ukrštanja iz originalnog otpornog UT-8 genotipa (Campbell i sar. 2000). U našim eksperimentima ova dva genotipa imala su veoma slične obrasce indukcije *BvSTI* gena, s tim što je, očekivano, kod potomačkog, selekcijom unapređenog F1016 genotipa nivo ekspresije bio značajno viši. Sa druge strane, F1015 genotip dobijen je procesom masovne selekcije za

otpornost prema SBRM larvama direktno iz populacije osetljivog F1010 genotipa (Campbell i sar. 2000). Stoga, F1015 može pokazivati neke od karakteristika F1010 genotipa kao što je početno smanjenje u aktivnosti *BvSTI* gena koje nastaje nakon mehaničkog povređivanja korenova.

U eksperimentima na polju inficiranom larvama SBRM, u kojima je procenjivano oštećenje korenova nastalo kao posledica prisustva i ishrane SBRM larvi bez primene insekticida, testirani su genotipovi F1016 i F1015. Procenjeni stepen oštećenja korenova rangiran je na skali od 0 do 9 na kojoj se manje oštećenim korenovima dodeljuju niže vrednosti. Kod korenova SBRM rezistentnih genotipova procenjeno oštećenje je iznosilo 1,8 - 2,6 za F1016 i 3,1 - 3,6 za F1015. Kod komercijalnih testiranih hibrida stepen oštećenja dobio je najviše vrednosti od 4,7 - 5,8 sugerišući na značajno niži stepen otpornosti ovih genotipova u odnosu na prethodna dva (Campbell i sar. 2000). Naši rezultati dobijeni analizom ekspresije *BvSTI* gena nakon mehaničkog povređivanja u potpunosti su u korelaciji sa ovim rezultatima procenjivanja oštećenja u polju. Genotipovi sa povišenim nivoom ekspresije *BvSTI* gena pokazivali su manji stepen oštećenja na korenovima prouzrokovan ishranom SBRM. Korelacija između indukovane ekspresija ovog gena i povišenog stepena otpornosti kod analiziranih genotipova šećerne repe, naročito kod F1016 genotipa, ukazuju na značajno učešće *BvSTI* IP u mehanizmima odbrane aktiviranim nakon mehaničkog povređivanja.

Zanimljivo je uporediti i bazalnu ekspresiju *BvSTI* gena uočenu pre povređivanja korenova i listova kod sva četiri ispitivana genotipa. Najniži bazalni nivo ekspresije zabeležen je, očekivano, kod osetljivog F1010 genotipa, dok je kod rezistentnih F1015 korenova i UT-8 listova zabeležena najveća količina *BvSTI* iRNK molekula pre indukcije mehaničkim povređivanjem. Prisustvo *BvSTI* transkripata u tkivima šećerne repe kod svih ispitivanih genotipova, kako kod mladih tako i kod starijih organa, ukazuje na činjenicu da ovaj IP nema isključivu ulogu u odbrani, već moguće i neke druge fiziološke funkcije. Međutim, ono što ipak ukazuje na njegovu značajnu ulogu u odbrani jeste činjenica da je kod genotipa sa najvećim stepenom rezistentnosti na insekte (F1016) relativno nizak bazalni nivo *BvSTI* transkripata, posebno u korenovima, nakon povređivanja vrlo brzo i višestruko

povećan. Visok nivo transkripcije kod ovog genotipa zadržava se najduže od svih analiziranih rezistentnih genotipova održavajući tako odbrambeni sistem u pripravnosti satima nakon povređivanja. Kod druga dva rezistentna genotipa, koja se ipak odlikuju nešto nižim stepenom otpornosti prema larvama insekata, samo povređivanje ne dovodi do tako brze i intenzivne akumulacije *BvSTI* transkripata iako je bazalni nivo značajno viši. Šta više, kod F1015 genotipa, kao što smo ranije naveli, dolazi do supresije u ekspresiji gena i početnog smanjivanja količine transkripata.

### **5.3. AKTIVNOST *BvSTI* GENA NAKON ISHRANE FAW LARVI**

Iako je u eksperimentima u kojima se ispituje ekspresija IP gena uobičajeno korišćenje mehaničkog povređivanja tkiva radi indukcije genske ekspresije, obrazac ekspresije IP gena indukovanih povređivanjem usled ishrane herbivornih insekata može biti značajno različit od onog koji nastaje nakon mehaničkog povređivanja (De Vos i sar. 2005; Korth i Dixon 1997). Stoga je ekspresija *BvSTI* gena nakon povređivanja insektima praćena u genotipovima F1016 i F1010, kod kojih su obrazac i nivo ekspresije bili međusobno jako različiti nakon mehaničkog povređivanja (Slike 12 i 13) i kod kojih se publikovani nivo osetljivosti na SBRM larve najviše razlikovao (Campbell i sar. 2000). S obzirom da postoje velike poteškoće u gajenju larvi SBRM u laboratorijskim uslovima, kao i da je teško sa inficiranih polja prikupiti larve ujednačenog stepena razvića, u eksperimentima je korišćen drugi insekt kao model organizam. Larve odabranog FAW spadaju u grupu polifagnih herbivora i utvrđeno je da se hrane listovima, ali i transgenim 'hairy roots' šećerne repe (Smigocki i sar. 2009). Iako FAW pripada drugom redu insekata (Lepidoptera) u odnosu na dipteru SBRM, i da ima različite navike u ishrani, ove larve koriste takođe serinske proteinaze kao glavne digestivne enzime (Srinivasan i sar. 2006), te stoga predstavljaju pogodan model organizam za ispitivanje potencijalne inhibitorne aktivnosti *BvSTI* proteaznog inhibitora na proteinaze larvalnog digestivnog sistema.

Prethodna istraživanja su pokazala da larve FAW, koje su se hranile listovima transgenog duvana ili 'hairy roots' šećerne repe u kojima je eksprimiran *BvSTI* transgen, pokazuju značajno zaostajanje u rastu i razviću u odnosu na kontrolne larve koje su se hranile netransformisanim tkivima (Smigocki i sar. 2009). Larve koje su se tokom 8 dana hranile *BvSTI* transgenim linijama duvana bile su od 30% do čak 75% lakše u odnosu na larve koje su se hranile netransformisanim biljkama. I kod larvi koje su se hranile transgenim 'hairy roots' šećerne repe tokom 5 dana, primećen je značajan pad u masi. Interesantno je primetiti da kod transgenih linija koje su nastale transformacijom F1016 genotipa, otpornog na larve SBRM, prosečna masa larvi je smanjena čak za 50% u odnosu na kontrolne, dok kod linija dobijenih transformacijom osetljivog F1010 genotipa smanjenje je iznosilo svega 10%. Ovi rezultati već unapred mogu da sugerišu da se u transgenim F1016 linijama sa over-eksprimiranim *BvSTI* genom nalazi veća količina ovog IP i, samim tim, insekticidna aktivnost prema larvama FAW je bila intenzivnija, a redukcija mase veća.

U eksperimentima u kojima su se larve FAW hranile listovima i korenovima dvaju genotipova šećerne repe različite otpornosti, pokazano je da dolazi do akumulacije *BvSTI* transkripata kao odgovor na ishranu larvi, kako kod SBRM otpornog F1016, tako i kod osetljivog F1010 genotipa. Međutim, kod oba genotipa obrazac transkripcije dobijem tokom 72 sata bio je drugačiji, a količina akumuliranih transkripata bila je daleko niža nego u mehanički povređenim tkivima (Slike 19 i 20).

U listovima F1016 linije, 'grickanje' FAW larvi dovelo je tokom 24 sata do neznatnog porasta u količini *BvSTI* transkripata od samo 1,2 puta, u odnosu na porast od čak 4,3 puta nakon mehaničkog povređivanja. U uzorcima listova prikupljenim nakon 48 i 72 sata od početka ishrane larvi, kao i u uzorcima F1010 listova nakon 24, 48 i 72 sata, primećeno je skoro u potpunosti odsustvo *BvSTI* iRNK molekula. Verujemo da je skoro kompletan prestanak aktivnost *BvSTI* gena nastao zbog činjenice da je već nakon 24 sata od početka hranjenja preostalo tkivo u kome je izvršena analiza bilo teško oštećeno i skoro u potpunosti uvelo usled veoma intenzivne ishrane ovih larvi. U korenovima, povređivanje nastalo ishranom

larvi FAW indukovalo je sličan obrazac ekspresije *BvSTI* gena kod obe linije, sa karakterističnim blagim naizmeničnim povećavanjima i smanjivanjima u količini transkripata (Slike 19 i 20). Objašnjenje za ovako specifičan obrazac aktivnosti *BvSTI* gena možda leži u dinamici ishrane FAW larvi tokom njihovih larvalnih stupnjeva objavljenoj u radu Pitre i Hogg (1983). Naime, ovi autori tvrde da je srednje vreme trajanja larvalnih stupnjeva kod FAW jedan i po dan, pri čemu se tokom ovog perioda značajno menja njihov apetit i količina konzumirane hrane. Takođe, treba imati na umu i da korenovi nisu primarni izvor hrane ovih larvi, te je i očekivano bilo da će rezultati analize ekspresije *BvSTI* gena iz ovih korenova biti različiti u odnosu na listove. Najveća količina transkripata bila je akumulirana u uzorcima sakupljenim 72 sata od početka ishrane kod oba analizirana genotipa šećerne repe, sa oko 2 puta više transkripata nego u nepovređenim korenovima kod F1016 genotipa i sa oko 1,5 puta više kod F1010 genotipa.

Nepodudaranja u obrascima ekspresije *BvSTI* gena primećena nakon mehaničkog i povređivanja insektima u saglasnosti su sa ranije objavljenim rezultatima drugih autora. Iako postoje brojne publikacije koje pokazuju da pojedini geni mogu biti istovetno indukovani mehaničkim povređivanjem ili ishranom herbivornih insekata (Howe i sar. 1996; Stratmann i Ryan 1997), više je onih koji pokazuju potpuno različit obrazac ekspresije gena nakon ovih povređivanja. Microarray analiza više od 150 gena *Arabidopsis-a* pokazala je da su geni koji su pokazivali veoma intenzivnu ekspresiju indukovanu mehaničkim povređivanjem bili znatno manje aktivni, a neki skoro da i nisu bili indukovani ishranom insekta *Pieris rapae* (Reymond i sar. 2000). Zanimljiva je činjenica da insekti nisu indukovali ekspresiju nekih od gena za koje se zna da se eksprimiraju nakon povređivanja i koji aktivno učestvuju u odbrani biljaka od patogena. To su tzv. 'pathogenesis related' (PR) geni, *PR-2* i *PAL*, ali i geni uključeni u sintezu aromatičnih metabolita *CCR* i *COMT*, čije dejstvo može da utiče na razviće insekata. Autori sugerišu da postoji mogućnost da su larve *P. rapae* tokom evolucije razvile posebne strategije i specifična ponašanja prilikom ishrane kojima uspevaju da izbegnu aktiviranje i ekspresiju bar nekih odbrambenih mehanizama biljaka.

Iako je očigledno da je mehaničko povređivanje dovoljno da probudi odbrambene sisteme biljke, još uvek se jako malo zna o prirodi primarnih signala kod mehaničkog povređivanja, kao i o receptorima na plazma membranama koji te signale registruju (León i sar. 2000). Proučavanjem prvih koraka u kaskadnom putu prenosa informacije o mehaničkom povređivanju, primećeno je da dolazi do oslobađanja malih oligosaharida, tzv. oligogalakturonida, iz oštećenih ćelijskih zidova (Benhamou i sar. 1990; Coté i Hahn, 1994). Iako se tokom povređivanja ovi molekuli primarno oslobađaju iz povređenih zidova, kod paradajza je uočeno da dolazi i do povređivanjem indukovane ekspresije gena za poligalakturonazu koja učestvuje u *de novo* sintezi ovih molekula (Bergey i sar. 1999). S obzirom da je dokazano da je ovaj gen indukovano prisustvom sistemina, ovi mali oligosaharidi se mogu smatrati jednim od početnih komponenti u signalnom putu koji dovodi do aktivacije odbrambenih puteva na mestu oštećenja. Takođe, kod mehaničkog povređivanja pokazano je da biljke paradajza proizvode etilen, koji uključivanjem u OD put indukuje sintezu JK kao signalnog molekula (O'Donnell i sar. 1996).

Sa druge strane, prilikom napada insekata osim mehaničkog povređivanja na mestu ishrane dolazi i do oslobađanja specifičnih eksudata, vrlo često *species*-specifičnih, direktno u povređeno tkivo. Ova obično složena kombinacija signala može izazvati potpuno drugačiji odgovor biljke i indukciju specifičnih odbrambenih mehanizama (Felton i Tumlinson 2008; Voelckel i Baldwin 2004; Frey i sar. 2000). Do danas su načinjeni značajni koraci u otkrivanju, pre svega hemijske prirode samih eksudata, ali i receptora. Tako je kod kukuruza determinisan plazma protein koji je odgovoran za prepoznavanje i vezivanje volicina iz pljuvačke larvi *S. exigua* (Truitt i sar. 2004). Signalni put kojim se dalje prenose signali o napadu insekata teku direktno ka OD putu i sintezi JK.

U slučaju *BvSTI* gena dobijeni obrasci transkripcije nakon mehaničkog povređivanja su daleko više odgovarali publikovanim nivoima otpornosti ispitivanih genotipova šećerne repe na larve SBRM, nego obrasci dobijeni nakon ishrane FAW insekata. Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da je aktivacija *BvSTI* gena indukovana samim povređivanjem, a da specifičan način nanošenja povreda u vidu površinskih ogrebotina ili produbljivanja kanala, kao i

sami eksudati SBRM larvi, samo delimično utiču na ekspresiju ovog gena. Ishrana FAW koje se odlikuju drugačijim ponašanjem pri ishrani, uništavajući skoro u potpunosti tkiva kojima se hrane, očigledno ne dovode do direktnog aktiviranja *BvSTI* gena, iako je i u FAW povređenim tkivima zabeleženo neznatno intenziviranje transkripcije ovog gena. S toga je, kao što smo već ranije napomenuli, veoma važno ispitati insekticidni potencijal različitih IP prema ciljanom insektu, radi pronalaženja najpogodnijeg kandidata, pre nego što se preduzmu konkretne biotehnoške mere.

#### **5.4. MEHANIČKO POVREĐIVANJE I AKTIVNOST *BvSTI* IP**

Analize na proteinskom nivou pokazale su da osim očekivanog *BvSTI* kodiranog proteina veličine oko 30 kDa, u F1016 i F1010 genotipovima nakon mehaničkog povređivanja aktivnost na gelu pokazuju i neki drugi proteini sa inhibitornom aktivnošću prema tripsinu (Slika 18). Proteazni inhibitori široko su prisutni kod biljaka i njihova uloga nije vezana isključivo za mehanizme odbrane i zaštitu od proteolitičkih enzima parazita i insekata (Fan i Wu 2005). Ovi proteini uključeni su u mnoge procese kao što je regulacija endogenih proteinaza tokom dormancije semena ili mobilizacija rezervnih proteina (Fan i Wu 2005; Brzin i Kidric 1995).

Među detektovanim proteinima sa inhibitornim dejstvom na tripsin, kod oba analizirana genotipa šećerne repe *BvSTI* specifična antitela reagovala su sa proteinom iz lista veličine oko 30 kDa (Slike 16 i 17). Imunoblot detekcijom uočen je različit obrazac akumulacije ovog proteina u povređenim listovima kod F1016 i F1010 genotipova. Kod oba genotipa obrazac akumulacije *BvSTI* proteina pokazao je izvesne razlike u odnosu na obrazac transkripcijske aktivnosti ovog gena. Akumulacija genskih transkripata bila je najintenzivnija nakon 6 sati nakon povređivanja kod F1016, odnosno nakon 2 sata kod F1010 genotipa (Slike 12 i 13). S druge strane, najveća količina akumuliranih *BvSTI* proteina detektovana je nakon 24 sata kod F1016 i 6 sati od povređivanja kod F1010 genotipa (Slike 16 i 17).

Primećeni nedostatak direktne korelacije između intenziteta transkripcije i aktivnosti i/ili akumulacije genskog produkta zapažen je i od strane drugih autora. Tragajući za genima odgovornim za povišeni stepen otpornosti određenih genotipova šećerne repe u odnosu na nematode, Cai i sar. (2003) pronašli su da je inhibicija razvića nematode povezana sa aktivnošću sporamin proteinaznog inhibitora kodiranog od strane *SpTI-1* gena. Međutim, stepen otpornosti nije zavisio od količine akumuliranog inhibitora u transgenim 'hairy roots' dobijenim transformacijom pomoću *Agrobacterium rhizogenes* soja koji u sebi nosi *SpTI-1* gen. Slično, Wu i sar. (1997) su pokazali imunoblot analizom da se u transgenim biljkama krompira akumulira značajna količina rekombinantnih ekstracelularnih anjonskih peroksidaza, dok je aktivnost odgovarajućeg transgena i akumulacija odgovarajućih iRNK praćena Northern analizom, bila neznatna. Transgeni krompir imao je čak 6 do 20 puta više peroksidaza u odnosu na netransformisane biljke, dok je porast u aktivnosti samog transgena bio svega 2 do 6 puta.

U listovima F1016 genotipa visoka količina BvSTI proteina akumulirana je nakon 2, 24 i 72 sata od mehaničkog povređivanja, sa maksimumom detektovanim nakon 24 sata (Slika 16). I u ostalim tačkama (6 i 48 sati) količina BvSTI proteina bila je viša nego u nepovređenim listovima. Nasuprot ovome, u listovima osetljivog F1010 genotipa, imunoblot analiza pokazala je rast u količini akumuliranog proteina samo nakon 6 sati nakon povređivanja (Slika 17). U svim ostalim analiziranim vremenskim tačkama, pre i posle 6 sati, nivo akumulacije bio je sličan onome kod nepovređenih listova (0 tačka). Ovo ukazuje da viši nivo akumuliranih BvSTI proteina detektovan kod povređenih listova F1016 genotipa verovatno pruža prednost ovoj liniji u borbi protiv herbivornih insekata, u odnosu na osetljivi F1010 genotip.

BvSTI specifična antitela nisu reagovala ni sa jednim od aktivnih tripsinskih inhibitora u korenovima obe analizirane linije. Razlog ovome moguće leži u tkivno-specifičnoj modifikaciji ovog proteina ili količine nakupljenog proteina u korenovima ipak nisu bile dovoljne za imunoblot detekciju. Nemogućnost detektovanja rekombinantnih insekticidnih proteina u transgenim biljkama koje se odlikuju povišenim stepenom otpornosti na insekte štetočine već je ranije bila



publikovana u radu Maheswaran i sar. (2007). Istovremeno, pokazano je da porast u koncentraciji proteina inhibitora digestivnih proteinaza ne znači i proporcionalan porast otpornosti na insekte (Tamhane i sar. 2007). Niske koncentracije rekombinantnog CamIP proteina značajno su inhibirale aktivnost digestivnih proteinaza larvi *H. armigera* čak do 70%, ali stepen inhibicije se nije uvećavao sa porastom količine ovog proteina (Tamhane i sar. 2007).

Poređenjem aktivnosti inhibitora tripsina u korenovima i listovima šećerne repe 6 sati nakon mehaničkog povređivanja, kada je i zabeležena značajna akumulacija ovih proteina kod oba ispitivana genotipa (F1010 i F1016), uočen je porast u ukupnoj aktivnosti kao odgovor na povređivanje (Slika 18). Jedino u korenovima otpornog genotipa F1016 nije bilo promene u intenzitetu inhibicije tripsina nakon povređivanja. Iako je u nepovređenim korenovima ovog genotipa bila akumulirana mala količina *BvSTI* iRNK molekula, koja se drastično povećala nakon mehaničkog povređivanja, analize na proteinskom nivou ne pokazuju tako velike promene u aktivnosti produkata ovog gena. Izuzetno velika aktivnost *BvSTI* IP, ali i drugih inhibitora tripsina u ovim korenovima, zabeležena je i kod nepovređenih tkiva, a samo povređivanje nije značajno promenilo nivo aktivnosti ovih proteina. To bi značilo da prve trenutke nakon napada ili povređivanja, korenovi spremno dočekuju sa već izuzetno aktivnim odbrambenim IP, verovatno usled vrlo efikasnih procesa translacije, a da se intenziviranim procesima transkripcije nakon povređivanja taj visok nivo održava tokom daljeg trajanja napada.

Zanimljivo, aktivnost *BvSTI* proteinaznog inhibitora veličine 30 kDa u potpunosti je izostala kod F1010 korenova, kako pre povređivanja tako i u mehanički povređenim korenovima. Ovo može da sugeriše da u F1010 korenovima, posebno osetljivim na napad SBRM larvi, očekivani *BvSTI* protein nije uopšte prisutan ili je u potpunosti neaktivan, bez obzira na uočenu ekspresiju *BvSTI* gena u ovim tkivima. Potpuno odsustvo ili snižena akumulacija aktivnog *BvSTI* proteina u organima kojima se hrane larve SBRM, direktno ukazuje na moguću ulogu *BvSTI* gena u razvijanju otpornosti genotipova šećerne repe prema ovom insektu.

Ispitivanje aktivnosti tripsinskih inhibitora na gelu ukazuje na još jedan interesantan rezultat. Protein veličine oko 50 kDa sa izraženom inhibicijom tripsina detektovan je samo u korenovima i listovima otporne F1016 linije, dok ga u F1010 liniji uopšte nema ili je u potpunosti neaktivan. Otvara se pitanje da li je i ovaj protein možda uključen u odbanu od insekata štetočina kojima je serinski tip digestivnih proteinaza dominantan.

#### 5.5. PARAMETRI RASTENJA I RAZVIĆA VRSTE *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith NA ŠEĆERNOJ REPI SA RAZLIČITIM NIVOIMA EKSPRESIJE *BvSTI* GENA

Da bismo potvrdili ulogu BvSTI IP u otpornosti šećerne repe na insekte, kao i opravdali naše verovanje da je *BvSTI* dobar kandidat-gen u razvijanju otpornih genotipova drugih biljnih vrsta, sproveden je biotest sa larvama FAW. Jaka inhibicija insekatskih proteinaza izolovanim IP u uslovima *in vitro* kada se insekti hrane veštačkom hranom u kojoj se inhibitori nalaze dokumentovana je od strane više autora (Broadway i Duffey 1986; Broadway i Colvin 1992; Johnston i sar. 1989). S druge strane, IP eksprimirani *in planta* su obično prisutni u nižoj koncentraciji, a njihova količina može varirati u zavisnosti od starosti i fiziologije biljke domaćina, ali i od vrste biljnog tkiva (Cloutier i sar. 2000; De Leo i sar. 2001; Abdeen i sar. 2005), te ne mora uvek doći i do značajnog uticaja na rast i razviće insekata štetočina. S toga je najpoželjnije testirati uticaj IP na rast i rastenje larvi u bioesejima u kojima se larve direktno hrane biljkom koja aktivno sintetiše određeni IP. Kao što je već ranije pomenuto, među digestivnim enzimima FAW larvi iz reda Lepidoptera dominiraju serinske proteinaze sa čak 92% učešća u ukupnim proteinazama (Srinivasan i sar. 2006). Ostatak proteinaza čine elastaze (1%), aminopeptidaze (5%) i karboksipeptidaze (1%). U radu McManus i Burges (1995) dokumentovano je da inhibitor serinskih proteinaza iz soje, SBTI, inkorporiran u veštačku hranljivu podlogu dovodi do inhibicije tripsinskih proteinaza kod srodne vrste *S. litura*. Polifagne larve FAW hrane se listovima velikog broja biljnih vrsta, pre svega različitim travama, ali je njihovo prisustvo

zabeleženo i na velikom broju gajenih poljoprivrednih kultura, pa tako i na šećernoj repi (All 1988).

Potencijalno insekticidno dejstvo BvSTI IP na rast i razviće larvi FAW ispitivano je kod istih genotipova šećerne repe koji se međusobno razlikuju po nivou otpornosti na larve SBRM, ali i, kako je prethodno pokazano, po nivou ekspresije *BvSTI* gena. Tokom ovog biotesta praćeno je nekoliko parametara rastenja i razvića larvi, u skladu sa očekivanim negativnim uticajima. Naime, u brojnim biotestovima pokazano je da ishrana insekata na biljkama sa akumuliranim insekticidnim agensima i povišenim stepenom otpornosti prema herbivorima može uticati na različite aspekte razvića, te se kao posledice mogu javiti: promena u veličini i masi larvi, izmenjeno vreme razvića sa skraćenim ili produženim larvenim stadijumom i obično kraćim životom adulta, povećana smrtnost larvi, naročito tokom prvih stupnjeva razvića ili lutki neposredno pred prelazak u adultni stadijum (Cloutier i sar. 1999; De Leo i sar. 2001; Ninković i sar. 2007). Takođe, dokumentovane su i različite promene u fiziologiji, koje se pre svega odnose na karakteristike digestivnog sistema (Hinks i Hupka 1995; Girard i sar. 1998), ali i ponašanju insekata najčešće vezanom za procese ishrane (Winterer i Bergelson 2001).

S obzirom da su larve u prvim stadijumima razvića izuzetno ranjive i da je stopa smrtnosti tokom ovog perioda obično visoka, mi smo u bioeseju koristili larve stare 10 dana. Takođe, larve u ovom periodu svoga razvića se najintenzivnije hrane, te je za verovati i da će sa velikom količinom unete hrane u digestivni sistem larvi dospeti i visoke koncentracije IP te će njihovo negativno dejstvo na proteolitičke enzime koji učestvuju u varenju te hrane biti najveće.

Mase larvi merene tokom intezivne ishrane na listovima pokazale su statistički značajne razlike među larvama koje su se hranile listovima SBRM osetljivog F1010 genotipa u odnosu na larve koje su se hranile listovima bilo kog od tri rezistentna genotipa (F1016, F1015 i UT-8). Za pet dana, koliko je trajala ishrana, larve sa listova F1010 genotipa povećale su svoju masu skoro pet puta u odnosu na masu pre početka ishrane (Slika 21), dok je uvećanje mase sa

rezistentnih genotipova bilo manje od četiri puta. Slične rezultate dalo je i poređenje dnevnog prirasta mase larvi (Slika 22), koje je pokazalo da su iz dana u dan najviše napredovale larve sa osetljivih listova. Pretpostavljamo da je kod larvi koje su se hranile osetljivim F1010 genotipom, kod koga je ekspresija *BvSTI* gena bila niža nego u bilo kom od rezistentnih genotipova, efikasnost digestije usled manjeg uticaja *BvSTI* IP bila mnogo veća, što je rezultovalo u bržem i većem porastu mase larvi. Do sličnih opažanja došli su i War i sar. (2012) koji su pratili parametre rasteња i razvića larvi srodne vrste *S. litura* nakon ishrane na tri genotipa biljke *Arachis hypogaea*, vrste iz familije trava koja se gaji radi ekstrakcije jestivog ulja iz plodova. Mase larvi koje su se tokom četiri dana hranile genotipovima ICGV 86699 i NCAC 343 rezistentnim na insekte, bile su statistički značajno niže, nego kod larvi koje su se hranile osetljivim TMV 2 genotipom. Slični rezultati sa obično mnogo izraženijim razlikama dobijeni su i u nizu bioeseja u kojima su insekti hranjeni transgenim biljkama u kojima su eksprimirani različiti biljni IP (Maheswaran i sar. 2007; Abdeen i sar. 2005; Gatehouse i Gatehouse 1998). U ovim bioesejima insekti sa transgenih IP biljaka bili su značajno manji i lakši od onih koji se hrane kontrolnim, netransformisanim biljkama. Johnson i sar. (1989) su čak pokazali da je smanjenje mase larvi *M. sexta* direktno srazmerno nivou eksprimiranog PI-II transgena u duvanu. Još jedno moguće objašnjenje za značajno manju masu larvi sa biljaka u kojima se *BvSTI* IP akumulira u velikoj količini, može proisteći iz opažanja drugih naučnika u kojima su opisane velike promene u sastavu digestivnih enzima kod larvi *Spodoptera* nakon unosa inhibitora serinskih proteinaza hranom. Naime, primećeno je da ove larve vrlo brzo 'reaguju' na inhibiciju intenziviranjem produkcije neosetljivih digestivnih proteinaza (Bhattacharyya i sar. 2006). Tokom ove brze adaptacije sve raspoložive metaboličke snage preusmerene su na ove procese, što može dovesti do deficita važnih aminokiselina te se smanjuje *de novo* sinteza strukturnih proteina, a samim tim i stope rasta larvi (Broadway i Duffey 1986; Jongsma i sar. 1996).

Tokom poslednjeg larvenog stupnja insekti dostižu kritičnu masu na kojoj larva prestaje sa ishranom i polako se priprema za ulazak u metamorfozu i sledeći razvojni stadijum (Davidowitz i sar. 2004; Davidowitz i Nijhout 2004). Iako

mehanizmi kojima larva određuje kritičnu masu i pravo vreme za ulazak u procese metamorfoze nisu poznati, ovo nije fiksirana veličina i pored genetičkih, zavisi i od faktora okoline, kao što je između ostalih i kvalitet ishrane (Davidowitz i sar. 2003; 2004). Iako je postojala statistički značajna razlika u masi među larvama koje su se hranile listovima različitih genotipova šećerne repe, kod svih larvi je prilično sinhronizovano došlo do postizanja kritične mase i sve su nakon pet dana ishrane počele postepeno da smanjuju masu i pripremaju se za procese metamorfoze kojima prelaze u sledeći stadijum razvića, lutku.

Nešto drugačija slika delovanja BvSTI IP na rast FAW larvi dobijena je kod insekata koji su se hranili korenovima šećerne repe. Za razliku od listova kojima se ovi insekti inače hrane, korenovi ne predstavljaju primarni izbor larvi. Međutim, primećeno je da usled nedostatka neke druge hrane, larve započinju sa ishranom ubrzo nakon postavljanja na komade korenova u plastičnim petri kutijama. Iako su mase larvi postavljenih na listove i korenove bile jako slične, nakon pet dana ishrane krajnje mase ovih larvi bile su skoro duplo manje od masa larvi sa listova za svaki od ispitivanih genotipova. I dok su larve sa listova povećale svoju masu tokom ovog perioda za četiri do pet puta, larve sa korenova otežale su u proseku dva puta u odnosu na početak eksperimenta. Takođe, i posmatranjem dnevnih prirasta uočava se da su ove larve značajno uvećavale svoju masu samo tokom prva dva (UT-8) odnosno tri dana (ostala tri genotipa) i da su već nakon toga počele sa smanjivanjem svoje mase. Za razliku od larvi koje su se hranile listovima i koje su dostigle svoje maksimalne mase i kritične mase tek nakon 15 dana od piljenja, kod larvi koje su se hranile korenovima, već nakon 2 ili 3 dana od početka ishrane, tj. 12 ili 13 dana od piljenja, primećena je redukcija u masi i larve su počele sa postepenim pripremanjem za ulazak u metamorfozu. Čini se da je kod ovih larvi nutritivni kvalitet hrane predstavljao presudan faktor koji je drastično uticao na razviće larvi u ovom stadijumu i koji je pokrenuo procese metamorfoze čak 2-3 dana ranije od onih sa listova. Iako se smatra da se u nepovoljnim sredinskim uslovima koji podrazumevaju i ishranu neadekvatnom hranom loše nutritivne vrednosti, procesi presvlačenja odlažu, a vreme razvića generalno produžava, izgleda da je kod ovih larvi izvor hrane imao suprotan efekat skraćujući trajanje

larvenih stadijuma i vodeći ka ubrzanom razviću. Slični rezultati dobijeni su sa larvama kompirove zlatice koje su se hranile transgenim biljkama krompira u kojima je eksprimiran *OC-I* gen. Tako su, Lecardonnel i sar. (1999) primetili brže razviće larvi, a Cloutier i sar. (1999) raniju pojavu adulata.

Veličina koju su larve dostigle tokom faze ishrane pre početka metamorfoze samo delimično je odredila i veličinu pupa razvijenih iz larvi i sa listova i korenova. Značajne razlike u masi među larvama koje su se hranile listovima rezistentnih u odnosu na one sa osetljivog genotipa šećerne repe, skoro potpuno su nestale kada su larve prešle u stadijum pupe. Bez obzira na hranu koju su prethodno konzumirale pupe su po izgledu i veličini bile jako slične (Slika 23). Jedino odstupanje od proseka pokazale su pupe sa UT-8 listova, koje su bile za nešto manje od 30% lakše od prosečne mase lutki sa ostala tri genotipa. Ipak ovakva situacija se mogla i očekivati s obzirom da su larve sa ovih listova ipak bile najlakše, iako razlika u njihovoj i masi larvi sa F1016 i F1015 genotipova nije bila statistički značajna. Zanimljivo je da značajno veća masa larvi koje su se hranile F1010 listovima nije preslikana i u masu lutki, već je ta statistički značajna razlika nestala.

Poput značajnih razlika u masi i veličini među larvama koje su se hranile listovima i korenovima, i u samom izgledu lutki razvijenih iz tih larvi bile su očigledne izvesne razlike (Slika 23). Lutke sa listova bile su ne samo znatno krupnije i teže od onih sa korenova, već je i boja njihovog hitinskog omotača bila znatno tamnija.

Iako tokom petodnevne ishrane larvi na različitim genotipovima šećerne repe nije došlo do umiranja larvi, u stadijumu lutke javili su se prvi vidovi morfoloških abnormalnosti (Slika 24). Izgleda da larve nisu bile u stanju da u potpunosti pređu u sledeći stadijum, pa su se na krajevima novih lutki nalazili prikačeni larveni ostaci. S obzirom da su se ove abnormalnosti javile samo na pojedinačnim lutkama koje su se hranile rezistentnim genotipovima F1016 i F1015, verujemo da bi ovo mogla biti posledica negativnog dejstva odrambenih mehanizama, u koje spada i ekspresija BvSTI IP. Međutim, iako kod svih razvijenih

adulata nisu primećena nikakva odstupanja od normalne morfologije (Slika 25), smatra se da bilo kakve varijacije u masi larvi ili lutki, menjaju normalan tok životnog ciklusa. Dugotrajan, hroničan negativan efekat IP tokom čitavog perioda ishrane larvi jedna je od najznačajnijih karakteristika koja ove proteine svrstava u grupu veoma pogodnih biljnih insekticida. Snižen fekunditet, niska stopa preživljavanja preko zime i snižen odbrambeni potencijal protiv predatora i parazita, samo su neke od karakteristika koje su česte kod insekata koji su se hranili biljkama kod kojih se intenzivno eksprimiraju IP. Na primer, značajna redukcija u fekunditetu i smanjen broj izleglih jaja primećen je kod nekih Diptera koje su se hranile podlogama u kojima su se nalazili IP (Spates i Harris 1984).

### 5.6. INDUKCIJA PROMOTORSKOG REGIONA *BvSTI* GENA U POVREĐENIM BILJKAMA TRANSGENOG DUVANA

Da bi se *BvSTI* ili bilo koji drugi gen uspešno koristio u biotehnologiji u cilju unapređenja biljnih genoma, neophodno je pažljivo birati regulatorne sekvence koje će voditi ka kontrolisanoj ekspresiji ovih transgena. Najčešće korišćeni promotori pri transformaciji biljaka proteinima koji će povećati rezistenciju na insekte (cry ili IP) jesu oni koji se konstitutivno eksprimiraju. Najpoznatiji i najčešće korišćen je svakako CaMV 35S promotor iz mozaičnog virusa karfiola ili nos promotor iz bakterije *Agrobacterium* koji kontroliše aktivnost gena koji kodira enzim nopalin sintetazu. Na ovaj način obezbeđuje se kontinuirana i intenzivna ekspresija transgena i nakupljanje insekticidnih proteina u visokoj koncentraciji u svim transgenim tkivima i tokom svih faza razvića biljke. Međutim, konstitutivna ekspresija heterolognih proteina u transgenim biljkama može dovesti do nepovoljnih efekata, kao što je redukcija rasta usled visoke metaboličke potrošnje tokom kontinuirane sinteze rekombinantnih proteina (Rai i sar. 2009). U slučaju insekticidnih transgena, održavanje permanentno visoke koncentracije ovih toksina u organima transgenih biljaka može dovesti i do nastanka rezistencije prema ovim proteinima u populacijama štetnih insekata (Bakhsh 2012), ali i do nepovoljnog uticaja na populacije korisnih insekata (Babendreier i sar. 2008).

Insekticidni transgeni bi trebalo da budu eksprimirani na stabilan i predvidiv način, da se aktiviraju u tkivima kojima se hrane insekti i to u trenutku njihovog napada. Takođe, važno je i da nivo ekspresije i akumulacija proteina budu visoki kako bi se dejstvo na insekta ostvarilo i pre nego što se on udalji sa mesta na kome se hrani. Većine inducibilnih promotora koji se danas koriste u biotehnologiji ipak ne poseduju sve ove poželjne karakteristike. Cao i saradnici (2001, 2006) su analizirali ekspresiju Bt gena *cry1Ab* pod kontrolom inducibilnog PR-1a promotora iz duvana, koji se indukuje nakon delovanja patogena kroz signalni put u kome učestvuje salicilna kiselina. Za ovaj promotor se zna da mu je ekspresija strogo kontrolisana, ali i dosta spora, te da se prve količine transkripata gena koji je pod njegovom kontrolom javljaju tek posle 8 sati, a da se maksimum dostiže tek nakon 96 sati od indukcije (Lodhi i sar. 2008). Kod transgenog karfiola uočeno je da u uslovima pre indukcije nema Cry1Ab proteina, dok je nakon indukcije, protein bio prisutan u svim analiziranim delovima biljke, ali u vrlo različitim koncentracijama. Signal koji je nastao na mestu indukcije i koji je doveo do ekspresije gena, smanjivao se u prostoru i tokom vremena. U udaljenim delovima biljke koncentracija sintetisanog endotoksina bila je stoga nezadovoljavajuća.

Da bi se ovakvi nedostaci nadomestili bilo je brojnih pokušaja modifikacija inducibilnih promotora u cilju intenziviranja ekspresije gena koji su pod njihovom kontrolom. Tako su Kumar i sar. (2009) konstruisali himeričan 35S(r)PR-1a promotor u cilju intenziviranja ekspresije *cry* gena na mestu napada larvi. Ovaj promotor nastao je modifikacijom inducibilnog, ali slabog PR-1 promotora umetanjem uzvodno konstitutivno eksprimiranog 35S promotora u obrnutoj orijentaciji. Insekticidni *cry1EC* gen pod kontrolom ovog himeričnog promotora eksprimirao se konstitutivno, ali nakon ujeda insekata na mestu povređivanja došlo je do pojačane ekspresije gena i intenzivnijeg nakupljanja endotoksina. Ipak ni ovako modifikovani promotori nisu pružali idealne odgovore u borbi protiv insekata štetočina.

Na osnovu naših rezultata analize ekspresije *BvSTI* gena *in planta* u genotipovima šećerne repe uočena je inducibilna ekspresija ovog gena. Pokazano je da osim larvi i mehaničko povređivanje listova i korenova može da dovede do



intenzivne ekspresije ovog gena. Kod genotipova F1016 i UT-8 koji su pokazali najviši nivo ekspresije *BvSTI* gena nakon povređivanja već nakon 2 sata došlo je do vrlo intenzivne akumulacije transkripata. Zna se da IP spadaju u grupu odbrambenih agenasa koje kodiraju tzv. 'kasni geni' i da se aktiviraju tek kada signalni molekuli kodirani od strane 'ranih gena' koji se aktiviraju povređivanjem i/ili insekatskim elicitorom, indukuju njihovu sintezu (de Bruxelles i Roberts 2001). Prvi znaci intenzivne genske aktivacije i zadovoljavajući stepen aktivnosti biljnih insekticidnih agenasa javljaju se najranije jedan sat nakon povređivanja, a u nekim slučajevima potrebno je i nekoliko sati nakon napada da bi se videli prvi značajniji efekti indukcije (Maffei i sar. 2007). Stoga se može smatrati da akumulacija *BvSTI* transkripata koja se dešava kod F1016 već nakon 2 sata od mehaničkog povređivanja *in planta* predstavlja dosta brzu odbrambenu reakciju.

Da bismo potvrdili ulogu regulatornih sekvenci u inducibilnoj aktivnosti *BvSTI* IP, analizirali smo promotorsku sekvencu ovog gena kloniranu iz korena F1016 genotipa, koji je pokazivao najintenzivniju ekspresiju *BvSTI* gena nakon mehaničkog povređivanja (Slika 12). Za *BvSTI* promotor vezan je GUS reporter gen, radi lakšeg praćenja ekspresije i ovaj himerični konstrukt je pomoću *A. rhizogenes* ubačen u model biljke duvana, *N. benthamiana*.

U odabranim T2 linijama transgenog duvana, koje su bile rezistentne na higromicin i čiji se segregacioni odnos za *hpt* gen nije statistički značajno razlikovao od očekivanog Mendelovog 3:1 odnosa, vrlo intenzivna ekspresija GUS gena primećena je kod biljaka starih 2 i 6 nedelja gajenih u uslovima *in vitro* (Slika 27). GUS ekspresija je bila više konstitutivna sa značajnim razlikama u intenzitetu ekspresije među ispitivanim linijama. Ove razlike među pojedinačnim linijama naročito su izražene kod 6 nedelja starih biljaka, gde neke od linija iako rezistentne na Hyg (npr. linija 3-4), skoro uopšte nisu pokazivale aktivnost GUS kodiranog enzima  $\beta$ -D-glukuronidaze praćenu pojavom plave obojenosti.

Kod 2 nedelje starih biljaka pojava obojenosti duž čitavih biljaka može da ukazuje na konstitutivnu ekspresiju GUS gena u svim ćelijama i/ili na postojanje sistemskog odgovora, odnosno prenos signala koji je doveo do aktiviranja

BvSTIpro-GUS gena kroz čitavu biljku. Još 1991. godine Pearce i sar. su otkrili postojanje polipeptidnog signala, koji su nazvali sistemin i za koji je pokazano da aktivira *inhibitor I* i *II* gene koje kodiraju sintezu tripsinskih inhibitora u transgenim listovima duvana. U daljim istraživanjima dokazali su prisustvo TTI (eng. *Tobacco Trypsin Inhibitor*) IP u mladim listovima koji su se nalazili na biljci iznad starijih mehanički povređenih listova (Pearce i sar. 1993). Na ovaj način nedvosmisleno su dokazali induktivnu prirodu ekspresije TTI gena, ali i potvrdili postojanje signala koji je doveo do sistemskog odgovora čitave biljke na povređivanje. Još jedna zanimljiva činjenica koja je u saglasnosti sa našim rezultatima i koja može da pomogne u razumevanju istih je da su u mladim listovima transgenog duvana registrovali niske koncentracije TTI IP čak i pre povređivanja, što može da pojasni pojavu obojenosti kod naših 6 nedelja starih nepovređenih listova odvojenih od biljke, u kojima je dakle prekinut vaskularni sistem i samim tim sprečen eventualni protok signalnih molekula i sistemsko širenje signala.

Tek u starijim biljkama gajenim u stakleniku akumulacija obojenog produkta GUS reakcije nije bila detektovana ni kod jedne transgene linije, kao ni kod kontrolnih netransformisanih biljaka pre povređivanja. Slična zapažanja o razlikama u ekspresiji promotorskog regiona IP gena u različitim biljnim organima ili tokom razvića biljaka pokazana su kod najbolje proučenog gena koji kodira proteinazni inhibitor kod biljaka, *pinII* gen iz krompira. Dokazano je da ovaj gen ima inducibilnu ekspresiju nakon povređivanja u listovima, ali u cvetovima ovaj gen se eksprimira konstitutivno (Pena-Cortes i sar. 1991). Ovaj gen takođe je aktivan i u procesu formiranja tubera, tokom koga je njegova ekspresija konstitutivna i sistemska (Keil i sar. 1989).

Iako je indukcija povređivanjem jedna od najpoželjnijih karakteristika ovakvih promotora, vidimo da je teško povući oštre granice između konstitutivnih i inducibilnih promotorskih sekvenci. Moguće objašnjenje za konstitutivnu ekspresiju BvSTI promotora kod transgenih biljaka duvana tokom ranih stadijuma razvića moglo bi da leži u činjenici da je tokom ovog perioda BvSTI IP uključen u neki od fizioloških procesa. S druge strane, ove biljke su tokom ovog perioda

gajene u uslovima *in vitro*, za koje je u mnogim slučajevima pokazano da mogu predstavljati stresnu sredinu za biljku (Joyce i sar. 2003), te je možda naizgled konstitutivna ekspresija i visok nivo akumuliranog produkta GUS reakcije bila u stvari indukovana. U slučaju disbalansa i/ili neodgovarajućih uslova u 'mikrookruženjima' u kojima se gaje biljke *in vitro* (visoka vlažnost, nedovoljna osvetljenost, supraoptimalni nivoi hranljivih elemenata i šećera, visoka koncentracija etilena) može doći do indukcije brojnih mehanizama kojima biljke odgovaraju na stres (Desjardins i sar. 2009). Dolazi do promena u antioksidativnom sistemu, indukovanja ekspresije 'pathogenesis' ili 'stress related' gena, kao što su PR geni ili geni koji kodiraju proteine toplotnog stresa (eng. *Heat Stress Proteins*; HSP). Takođe, povišen je i nivo salicilne kiseline, koja učestvuje u regulaciji ekspresije SAR (eng. *Systemic Acquired Resistance*) gena koji dovode do povećavanja otpornosti prema patogenima (Van Breusegem i sar. 2001). U više slučajeva je potvrđena i uloga IP u odgovoru biljaka na niz abiotičkih stresova (Pernas i sar. 2000; van der Vyver i sar. 2003; War i sar. 2011).

U eksperimentima u kojima je praćena ekspresija GUS gena pod kontrolom još jednog inducibilnog promotora u transgenim biljkama šećerne repe dobijeni su vrlo slični obrasci ekspresije (Snyder i sar. 1999). Naime, osmotinski promotor (Osm), koji se indukuje povređivanjem ili nekim abiotskim faktorima kao što su abscisinska kiselina, etilen ili NaCl (Nelson i sar. 1992), kontrolisao je konstitutivnu ekspresiju GUS gena kod biljaka gajenih *in vitro*. Nivo akumuliranih produkata GUS reakcije bio je čak značajno veći od nivoa koji je akumuliran u tkivima u kojima je bio ekspimiran 35S-GUS gen. Međutim, kod biljaka koje su rasle u staklari, ekspresija Osm-GUS gena bila je inducibilna i nakon povređivanja listova, histohemijskim bojenjem je pokazana jasno lokalizovana obojenosti tkiva u uskoj zoni oko presečene ivice.

Još jedno moguće objašnjenje za vrlo intenzivnu GUS ekspresiju u mladim tkivima moglo bi da leži u činjenici da su ove mlade biljčice izuzetno osjetljive i na najmanje mehaničke stimuluse, te da je mehanički dodir prilikom izvlačenja iz hranljivog medijuma, kao i prilikom potapanja u GUS pufer bilo dovoljan da se indukuje ekspresija *BvSTI* promotora. Slična hiperosetljivost na mehaničku

indukciju primećena je kod biljaka *Arabidopsis-a* transformisanih vektorom koji je nosio GUS gen vezan za već pomenuti inducibilni *pinII* promotor. Čak i dodir sitnih kapi vode prilikom prskanja biljaka bio je dovoljan da indukuje GUS aktivnost kod ovih biljaka (Godard i sar. 2007).

U slučaju *BvSTI* promotora, ove pretpostavke mogu biti podržane činjenicom da kod starijih biljaka koje su bile gajene u zemlji u stakleniku, nije primećena konstitutivna ekspresija GUS gena (Slika 28). Ekspresija u listovima transgenih biljaka nije zabeležena u situaciji bez stimulusa, za razliku od 35S-GUS transformanata, kod kojih se obojenost javila po čitavoj površini lista. Tek nakon mehaničkog zasecanja ivica listova duvana dolazilo je pojave snažne ekspresije *BvSTIpro-GUS* gena. Akumulacija produkata GUS bojene reakcije bila je lokalizovana, sa tek ponegde prisutnom neznatnom obojenošću na mestima koja nisu bila povređena.

Ipak, u mehanički povređenim korenovima primećeno je da je odgovor, tj. pojava obojenosti tkiva zahvatala nešto šire područje oko mesta povređivanja, slično odgovoru koji je uočen kod biljaka koje su transformisane konstitutivno eksprimiranim 35S-GUS genom. Slična organ-specifična ekspresija bila je zabeležena i za *win3.12* promotor iz topole eksprimiran u transgenim korenovima krompira nakon mehaničkog povređivanja ili infekcije patogenim gljivama (Yevtushenko i sar. 2004).

Aktivnost *BvSTIpro-GUS* himeričnih gena kod transgenih listova duvana kojima su se hranile larve FAW takođe pokazuju inducibilnu ekspresiju lokalizovanu na mestima ugriza insekata (Slika 31). Larve kojima je dozvoljeno da se hrane listovima tokom 6, 24, 48 ili 72 sata ostavljale su specifične okrugle zone na čijim se ivicama pojavila intenzivna plava boja nakon inkubacije sa X-Gluc supstratom za GUS kodirani enzim. Zanimljivo je da osim pojave većeg broja plavom bojom oivičenih 'rupica' na listovima kojima su se larve hranile duži vremenski period, nije došlo do difuzije obojenosti po površini lista. Objašnjenje za ovako usku i oštru lokalizaciju indukovanog odgovora moglo bi da leži upravo u činjenici da je analiza ekspresije *BvSTIpro-GUS* himeričnog gena nakon oštećenja

izazvanih ishranom larvi FAW praćena u listovima odvojenim od biljke. U ovakvom sistemu prekinut je vaskularni sistem, a samim tim i kretanje potencijalnih inducibilnih signala, kao što je npr. sistemin, kroz floem do nepovrećenih delova biljke u kojima bi stimulisali aktiviranje regulatornih sekvenci *BvSTI* promotora (Jongsma i Bolter 1997; Pearce i sar. 1991). Mnogi insekti iz redova Orthoptera, Lepidoptera i Coleoptera razvili su tokom evolucije odbrambene mehanizme na insekticidne odbrambene agense biljaka upravo koristeći ćinjenicu da je odbrana biljaka uglavnom systemska i bazirana na transportu signalnih molekula koji će indukovati sintezu odbrambenih agenasa u ćitavoj biljci. Mnogi od ovih insekata razvili su vrlo specifićne vidove ponašanja tokom ishrane pri ćemu aktivno presecaju provodne sudove i hrane se iskljućivo na delovima sa strane suprotne od povrede na kojoj odbrambeni agensi nisu dospeli (Agrawal i Konno 2009; Dussourd i Denno 1991).

### 5.7. PERSPEKTIVE KORIŠĆENJA *BvSTI* KAO TRANSGENA U CILJU POVEĆANJA OTPORNOSTI BILJNIH GENOTIPOVA PREMA INSEKTIMA ŠTETOĆINAMA

Iako je već u velikom broju slućajeva pokazan negativan efekat razlićitih biljnih IP na insekte štetocine, veruje se da bi ovaj pristup mogao imati kontinuiran uspeh samo ukoliko se novi IP geni otkrivaju i introdukuju u biljne genotipove. Analizom ekspresije novo-otkrivenog *BvSTI* gena u povrećenim tkivima šećerne repe kod genotipova koji su razvijeni u procesima selekcije i razvijanja linija otpornih prema larvama štetocine SBRM, pokazano je da se aktivna sinteza i akumulacija ovog IP podudara sa stepenom otpornosti genotipova. Potpuno odsustvo ili znaćajno redukovana aktivnost ovog IP kod biljaka osetljivih na larve insekata ukazuje na njegovu vaćnu ulogu u odbrambenim mehanizmima. Na osnovu svega napred navedenog verujemo da bi ovaj gen pre svega mogao da poslući kao dobar molekularni marker u procesima evaluacije razlićitih genotipova šećerne repe u potrazi za otpornim varijantama. Takoće, smatramo i da bi *BvSTI* gen bio dobar kandidat-gen, ćijom bi se heterolognom ekspresijom povećala otpornost razlićitih biljaka na insekte.

Međutim, trebalo bi imati na umu da eksprimiranjem insekticidnih transgena u biljkama nije potpuno izvesno povećavanje otpornosti prema insektima, pre svega zbog izuzetno složenih mehanizama kojima se insekti aktivno suprotstavljaju biljnim odbrambenim snagama, a koje su razvili tokom koevolucije sa biljkama kojima se hrane. Zbog izuzetne efikasnosti ovih mehanizama važno ih je sagledati i pronaći način da se unaprede biotehnološki pristupi čime bi se korišćenje IP transgena učinilo efikasnijim.

Naime, veliki broj polifagnih herbivora, koji predstavljaju dominantnu grupu kada su insekti štetočine u pitanju, razvio je sposobnost brze izmene sastava digestivnih enzima u zavisnosti od hrane koja im je dostupna, ali i od prisustva nehranljivih i potencijalno štetnih agenasa, kao što su IP. Za kratko vreme ovi insekti su sposobni da aktiviraju ekspresiju proteinaza koje su neosetljive na prisutne IP, te neometano nastave digestiju. Ovako sofisticiran način adaptacije najbolje ilustruje slučaj jednog od danas najrasprostranjenijih i najznačajnijih štetočina, larvi vrste *H. armigera*, koje se hrane na preko 180 različitih biljnih vrsta, među kojima su i poljoprivredne kulture kukuruz, pamuk, kupusi, krompir, paradajz i sl. Dominantne digestivne serinske proteinaze ovih larvi kodirane su od strane kompleksne multigenске familije u okviru koje se nalazi čak 27 gena (Bown i sar. 1998). Samo male varijacije u aminokiselinskim sekvencama u zoni aktivnog centra ovih proteinaza mogu učiniti IP potpuno inkompatibilnim kao supstrat. U radu Brito i sar. (2001) pokazano je da larve *Heliothis virescens* aktivno menjaju sastav tripsinskih proteinaza ukoliko se hrane podlogom koja u sebi sadrži tripsinski inhibitor, u odnosu na larve koje se hrane podlogom bez inhibitora. Novosintetisane tripsinske proteinaze imaju izmenjenu specifičnost prema supstratu. Slično je pokazano i za larve *S. exigua* koje su bile izložene hroničnom delovanju inhibitora serinskih proteinaza iz krompira (IP2) konstitutivno eksprimiranog u transgenom duvanu kojim su se larve hranile (Jongsma i sar. 1995). Aktivnost proteinaza osetljivih prema IP2 smanjila se sa 76%, koliko je zabeleženo u digestivnom sistemu larvi koje su se hranile kontrolnim netransformisanim biljkama, na 6-22% u digestivnom sistemu larvi koje su se hranile transgenim listovima. Istovremeno, aktivnost drugog tipa proteinaza koje

su bile neosetljive na IP2 povećala se 2,5 do 3 puta, nadomestujući značajan pad digestije usled dejstva IP2 inhibitora.

Kod nekih insekata pak dolazi do pojačane ekspresije i akumulacije već postojećih proteinaza osetljivih na uneti IP, te se većom koncentracijom prevazilazi smanjena digestija usled prisustva inhibitora. McManus i Burgess (1995) su pokazali da kod larvi *S. litura* dolazi do značajnog povećanja u ekspresiji dominantnih serinskih proteinaza nakon ishrane sojinim SBTI inhibitorom, iako je pokazano u eksperimentima *in vitro* da su te proteinaze bile izuzetno osetljive prema ovom inhibitoru.

Istovremeno neki od insekata pojačavaju ekspresiju gena i akumulaciju proteinaza drugih funkcionalnih grupa, čime se u potpunosti menja proteazni profil i prevazilazi negativno dejstvo hranom unetih IP. Kod larvi kolecptere *Baris coerulescens*, u čijem digestivnom sistemu dominiraju cisteinske proteinaze sa najmanje četiri različite aktivne forme, nakon ishrane transgenim biljkama uljane repice sa eksprimiranim inhibitorom cisteinskih proteinaza OC-I, došlo je do drastične inhibicije svih cisteinskih proteinaza od skoro 80% (Bonadé-Bottino i sar. 1999). U isto vreme aktivnost serinskih proteinaza, koje su inače značajno manje zastupljene kod ovih insekata, uvećana je više od dva puta.

Kod mnogih insekata nezavisno od toga da li je aktivan neki od gore navedenih mehanizama odbrane, može doći do aktivne degradacije i inaktivacije molekula IP unetih hranom (Michaud i sar. 1995; Zhu-Salzman i sar. 2003). Iako je u radu Yang i sar. (2009) pokazano da MTI2 (eng. *Mustard Trypsin Inhibitor 2*) inhibira i do 80% serinskih proteinaza vrste *Plutella xylostella*, kako u *in vitro* eksperimentima, u kojima je želudačni ekstrakt larve inkubiran sa ovim inhibitorom, tako i u *in vivo* eksperimentima u kojima su se larve direktno hranile homozigotnim MTI2 T4 transgenim biljkama arabidopsisa, kod ovih insekata nije primećen nikakav negativan uticaj na rast i razviće i bili su u potpunosti otporni prema ovom IP. Na osnovu dobijene konstante disocijacije insekatskih tripsina prema MTI2, koncentracije digestivnih tripsina i koncentracije MTI2 u listovima izračunato je da bi čak 99% tripsinske aktivnosti u digestivnom sistemu insekata

trebalo da bude osetljivo prema MTI2 i inhibirano *in vivo*. Dodatnom analizom sastava i aktivnosti digestivnih enzima kod larvi nakon ishrane na MTI2 transgenim biljkama, utvrđen je blagi porast ukupne enzimske aktivnosti, ali istovremeno nije primećena indukcija drugih serinskih proteinaza rezistentnih prema ovom inhibitoru. Takođe, preinkubacija MTI2 sa digestivnim proteinazama tokom 3 sata dovela je do potpune inaktivacije ovih enzima. Na osnovu svih navedenih rezultata autori veruju da rezistentnost larvi *P. xylostella* nastaje kao posledica enzimske inaktivacije MTI2 u digestivnom sistemu ovih insekata.

Dakle, insekti za vrlo kratko vreme mogu da izmene sastav digestivnih enzima kvantitativno, ali i kvalitativno, što dovodi i do brze pojave otpornosti na rekombinantne insekticidne proteine. Kod vrste *S. litura* primećeno je da samo larve u prvom stadijumu razvića pokazuju značajno smanjenje rasta kada se hrane na podlozi u kojoj se nalazi inhibitor tripsinskih proteinaza poreklom iz soje (McManus i Burgess 1995). Kod starijih larvi primećena je brza adaptacija i statistički značajne razlike u parametrima rasta i razvića u odnosu na larve hranjene kontrolnim podlogama bez IP nisu zabeležene. Slično, rezultati eksperimenata Michaud i sar. (1995) pokazuju su da su se samo prvi i drugi stadijum u razviću larvi krompirove zlatice odlikovali visokim stepenom osetljivosti prema inhibitoru cisteinskih proteinaza iz pirinča, OC-I.

Ovako brzo adaptiranje i prevazilaženje negativnih uticaja insekticidnih proteina u populacijama insekata moglo bi dovesti do limitiranja upotrebe ovih agenasa u cilju borbe protiv štetočina. Istovremeno, mnogi od kandidat-gena do sada otkrivenih i okarakterisanih pokazuju ili previše visoku specifičnost prema određenoj grupi proteinaza ili je njihov efekat suviše slab, te insekti vrlo lako mogu da prevaziđu štetno dejstvo ovih inhibitora. Stoga je danas potreba da se poveća efikasnost odbrambenih transgena jedan od aktuelnih zadataka u borbi protiv štetočina. Jedan od pristupa jeste tzv. slaganje gena (eng. *genes stacking*, *genes pyramiding*), koje podrazumeva kombinovanje dva ili više gena koji kodiraju toksične agense sa različitim mehanizmima delovanja i njihovu istovremenu koekspresiju u transgenim biljkama (Senthilkumar i sar. 2010; Christou i sar. 2006; Abdeen i sar. 2005; Zhao i sar. 2003; Urwin i sar. 1998). Na ovaj način



istovremenom ekspresijom povećao bi se spektar delovanja insekticidnih transgena, ali i omogućilo odlaganje razvijanja rezistentnosti kod insekata na te agense. Takođe, postoji i generalno uverenje da IP eksprimirani istovremeno sa nekim drugim zaštitnim proteinom (Bt toksini,  $\alpha$ -amylase, lektini) mogu da spreče degradaciju ovih proteina u digestivnom sistemu insekata i da time i posredno pojačaju njegovo insekticidno dejstvo (Gatehouse i Gatehouse, 1998).

Introdukciju dva ili više različita transgena moguće je sprovesti na više načina: seksualnim ukrštanjem već transformisanih biljaka koje u svom genomu eksprimiraju pojedinačne transgene (Dietz-Pfeilstetter 2010; Cao i sar. 2002), korišćenjem složenih višestrukih genskih konstrukata, uzastopnom retransformacijom već transgenih biljaka novim genskim konstruktima ili simultanim kotransformisanjem sa više plazmida (Mehrotra i sar. 2011; Morris i sar. 2006; Chang i sar. 2002).

Primer veoma uspešne ekspresije više IP transgena prikazali su Dunse i sar. (2010). Oni su pokušali da pojačaju insekticidno dejstvo pojedinačnih IP i time utiču na rast i razviće insekta *H. punctigera*, koji predstavlja jednog od najznačajnijih štetočina pamuka. Iako je pokazano da konzumiranje IP iz *N. alata* (NaPI) eksprimiranog u pamuku drastično redukuje rast i utiče na razviće (Heath i sar. 1997), preživele larve pokazivale su izvestan stepen adaptacije prilagođavanjem sastava digestivnih enzima. Naime, ovaj prilično potentni inhibitor sastoji se iz čak pet zasebno aktivnih subjedinica, od čega četiri imaju visok stepen specifičnosti prema tripsinskim proteinazama, a jedna prema himotripsinu (Atkinson i sar. 1993). Zbog intenzivnog delovanja NaPI na digestivni sistem larvi, kod preživelih larvi dominantne tripsinske proteinaze bile su zamenjene himotripsinskim. Da bi se pojačao efekat inhibicije na larvalne proteinaze efekat NaPI je bio 'pojačan' još jednim IP poreklom iz krompira koji je pokazivao veliku specifičnost prema himotripsinu, *StPin1A*. *Agrobacterium*-posredovanim transformacijama dobije su transgene linije u kojima su bili eksprimirani *NaPI* ili *StPin1A*, a zatim je ukrštanjem homozigotnih linija dobijena hemizigotna *NaPI-StPin1A* linija. Nakon 2 godine ispitivanja u polju, ove biljke

pokazivale su značajno viši stepen otpornosti prema *H. punctata* larvama u odnosu na biljke koje su akumulirale bilo koji od ova dva IP pojedinačno.

Kod tzv. klonalnih biljaka kao što su jagoda ili krompir, tokom evolucije seksualno razmnožavanje u potpunosti je zamenjeno nekim od vidova vegetativnog, te se za ove vrste primenjuju nešto drugačiji pristupi pri dobijanju višestrukih transformanata, koji isključuju seksualno razmnožavanje. Tako su recimo u pokušaju da se kod krompira poveća, ali i održi otpornost na krompirovog moljca tubera (*Phthorimaea operculella*), u biljke kultivara Iwa uvedena i koeksprimirana dva gena koja kodiraju različite Bt toksine, *cry1Ac9* i *cry9Aa2* (Meiyalaghan i sar. 2010). Slaganje gena retransformacijom DG4c linije koja je pokazivala visok nivo eksprimiranja *cry9Aa2* gena plazmidom koji nosi *cry1Ac* gen, pokazao se kao mnogo efikasniji način od simultane transformacije sa dva različita plazmida koja nose pojedinačne transgene.

Aktivnost Bt toksina Cry1A, Cry3 i Cry4, veoma zastupljenih u pokušajima borbe protiv insekata štetočina, a za koje su opisani slučajevi pojave rezistentnosti kod nekih populacija insekata, pojačana je u transgenim biljkama serinskim proteaznim inhibitorom iz bundeve (MacIntosh i sar. 1990). Sintetička sekvenca koja kodira mali tripsinski inhibitor CMTI (*Cucurbita maxima* tripsinski inhibitor), čiji je model aktivnosti u digestivnom sistemu insekata potpuno drugačiji, vezana je za skraćeni *cry1Ac* i ovaj složeni vektor ubačen je u duvan. Rezultati biotesta u kome su se larve *H. virescens* hranile dvostrukim transgenim biljkama u kojima su istovremeno bila eksprimirana oba gena pokazali su 6 puta veću aktivnost Bt toksina nego u larvama koje su se hranile kontrolnim biljkama.

Nalik mnogim genetički transformisanim linijama s eksprimiranim pojedinačnim insekticidnim genima koje su već duže vreme komercijalno dostupne širom sveta, Bollgard II® pamuk koji produkuje simultano *cry1Ac* i *cry2Ab2* rekombinantne proteine (Perlak i sar. 2001) komercijalno je dostupan još od 2003. godine u SAD.

Na kraju, verujemo da bi *BvSTI* gen u kombinaciji sa nekim drugim odbrambenim genom koji poseduje insekticidno dejstvo mogao pružiti efikasnu strategiju za povećanje otpornosti prema insektima štetočinama poljoprivrednih i drugih ekonomski važnih kultura. Istovremeno, smatramo i da bi promotor ovog gena mogao biti korišćen za inducibilnu kontrolu ekspresije ovih transgena, čime bi se efekat ovih insekticidnih agenasa optimizovao.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Analizom ekspresije *BvSTI* gena u listovima i korenovima četiri genotipa šećerne repe pokazano je da mehaničko povređivanje indukuje aktivnost ovog gena.
2. Transkripcijski obrasci dobijeni analizom ekspresije *BvSTI* gena nakon mehaničkog povređivanja u potpunosti su u korelaciji sa već publikovanim rezultatima o otpornosti ispitivanih genotipova na larve SBRM, dobijenih na osnovu procenjivanja oštećenja korenova u polju inficiranom ovim larvama.
3. Kod svih ispitivanih genotipova obrazac ekspresije *BvSTI* gena nije se značajno menjao sa starenjem biljaka, sa najintenzivnijom transkripcijom zabeleženom kod najstarijih, 6 meseci starih biljaka. Nivo akumuliranih *BvSTI* transkripata bio je značajno viši u svim listovima nego u korenovima tokom 72 sata od mehaničkog povređivanja.
4. Relativnom kvantifikacijom i upoređivanjem nivoa akumuliranih transkripata kod 6 meseci starih biljaka, uočeno je da su viši nivoi *BvSTI* transkripata detektovani kod svih SBRM otpornih genotipova šećerne repe (F1016, F1015 i UT-8) u odnosu na aktivnost ovog gena kod osetljivog F1010 genotipa. Najviši nivo transkripata detektovan je kod F1016 genotipa.
5. Kod SBRM otpornih F1015 biljaka zabeležen je obrazac indukcije koji se u mnogome poklapao sa obrascem dobijenim kod F1010 osetljivog genotipa iz koga je ovaj genotip izveden. Mehaničko povređivanje u oba slučaja dovelo je do intenziviranja aktivnosti u listovima, ali i do početnog smanjenja nivoa ekspresije *BvSTI* gena kod povređenih korenova.
6. U eksperimentima u kojima su se larve polifagnog insekta *Spodoptera frugiperda* hranile listovima i korenovima dvaju genotipova šećerne repe, pokazano je da dolazi do akumulacije *BvSTI* transkripata kao odgovor na ishranu larvi, i to kako kod SBRM otpornog F1016, tako i kod osetljivog F1010

- genotipa. Međutim, obrazac transkripcije dobijen tokom 72 sata bio je različit kod ispitivanih genotipova, a količina akumuliranih transkripata bila je daleko niža nego u mehanički povređenim tkivima.
7. Analize na proteinskom nivou pokazale su da osim očekivanog *BvSTI* kodiranog proteina veličine oko 30 kDa, u F1016 i F1010 genotipovima nakon mehaničkog povređivanja aktivnost na gelu pokazuju i neki drugi proteini sa inhibitornom aktivnošću prema tripsinu. Šest sati nakon mehaničkog povređivanja uočen je porast u ukupnoj aktivnosti tripsinskih inhibitora i u korenovima i u listovima šećerne repe.
  8. Ipak, aktivnost *BvSTI* proteinaznog inhibitora veličine 30 kDa u potpunosti je izostala kod F1010 korenova, kako pre povređivanja tako i u mehanički povređenim korenovima. Potpuno odsustvo ili snižena akumulacija aktivnog *BvSTI* proteina u organima kojima se hrane larve SBRM kod osetljivog genotipa, direktno ukazuje na ulogu *BvSTI* gena u razvijanju otpornosti genotipova šećerne repe prema ovom insektu.
  9. Među detektovanim proteinima sa inhibitornim dejstvom na tripsin, kod oba analizirana genotipa šećerne repe *BvSTI* specifična antitela reagovala su sa proteinom iz lista veličine oko 30 kDa pokazujući inducibilnu akumulaciju ovog proteina nakon mehaničkog povređivanja. Međutim, *BvSTI* specifična antitela nisu reagovala ni sa jednim od aktivnih tripsinskih inhibitora u korenovima oba analizirana genotipa.
  10. Ispitivanjem uticaja odbrambenih mehanizama šećerne repe, među kojima i *BvSTI* IP, na parametre rasta i razvića polifagnog insekta *S. frugiperda*, pokazane su statistički značajne razlike u masi larvi koje su se hranile listovima SBRM osetljivog F1010 genotipa u odnosu na larve koje su se hranile listovima bilo kog od tri rezistentna genotipa (F1016, F1015 i UT-8).
  11. Razlike između larvi koje su se hranile različitim genotipovima šećerne repe prenosile su se i na očigledne razlike u izgledu lutki razvijenih iz tih larvi.

- Lutke sa listova bile su u proseku dvostruko teže od onih sa korenova, a boja njihovog hitinskog omotača bila je znatno tamnija.
12. U stadijumu lutke javili su se prvi vidovi morfoloških abnormalnosti na pojedinačnim lutkama koje su se hranile rezistentnim genotipovima F1016 i F1015. Verujemo da je bi ovo mogla biti posledica negativnog dejstva odrambenih mehanizama u koje spada i ekspresija BvSTI IP.
  13. Ipak kod svih razvijenih adulta nisu primećena nikakva odstupanja od normalne morfologije.
  14. Analizom indukcije regulatornih sekvenci *BvSTI* gena u higromicin rezistentnim T2 linijama transgenog duvana, kod kojih se segregacioni odnos za *hpt* gen nije statistički značajno razlikovao od očekivanog Mendelovog 3:1 odnosa, vrlo intenzivna konstitutivna ekspresija GUS gena primećena je kod biljaka starih 2 i 6 nedelja gajenih u uslovima *in vitro*.
  15. U starijim biljkama gajenim u stakleniku akumulacija obojenog produkta GUS reakcije nije bila detektovana ni kod jedne transgene linije, kao ni kod kontrolnih netransformisanih biljaka pre povređivanja. Mehaničko povređivanje i povređivanje FAW larvama indukovalo je brzu i jasno lokalizovanu BvSTIpro-GUS ekspresiju.

## 7. LITERATURA

- Abdeen A, Virgós A, Olivella E, Villanueva J, Avilés X, Gabarra R, Prat S (2005): Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57(2):189-202
- Abe K, Kondo H, Arai S (1987): Purification and characterization of a rice cysteine protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 2763-2768
- Agrawal AA, Konno K (2009): Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 311-331
- Alfonso-Rubí J, Ortego F, Castañera P, Carbonero P, Díaz I (2003): Transgenic expression of trypsin inhibitor *CMe* from barley in Indica and Japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Research* 12(1): 23-31
- All JN (1988): Fall armyworm (Lepidoptera: *Noctuidae*) infestations in no-tillage cropping systems. *Florida Entomologist* 71: 268-272
- Alpeter F, Díaz I, McAuslane H, Gaddour K, Carbonero P, Vasil IK (1999): Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor *CMe*. *Molecular Breeding* 5: 53-63
- Andow DA (2008): The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews* 4: 142-199
- Araújo CL, Bezerra IW, Oliveira AS, Moura FT, Macedo LL, Gomes CE, Barbosa AE, Macedo FP, Souza TM, Franco OL, Bloch JC, Sales MP (2005): *In vivo* bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *in vitro* bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind

- tree (*Tamarindus indica*) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(11): 4381–4387
- Arimura GI, Ozawa R, Maffei ME (2011): Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. International Journal of Molecular Sciences 12: 3723-3739
- Atkinson AH, Heath RL, Simpson RJ, Clarke AE, Anderson MA (1993): Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. Plant Cell 5: 203–213
- Babendreier D, Reichhart B, Romeis J, Bigler F (2008): Impact of insecticidal proteins expressed in transgenic plants on bumblebee microcolonies. Entomologia Experimentalis et Applicata 126: 148–157
- Bakhsh A, Siddique S, Husnain T (2012): A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (*Cry1Ac*) expression in cotton. Euphytica 183: 65-74
- Baldwin IT, Gorham D, Schmelz EA, Lewandowski CA, Lynds GY (1998): Allocation of nitrogen to an inducible defense and seed production in *Nicotiana attenuata*. Oecologia 115: 541–552
- Barton K, Whitely H, Yang NS (1987): *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiology 85: 1103-1109
- Bazzini A, Almasia N, Manacorda C, Mongelli V, Conti G, Maroniche G, Rodriguez M, Distéfano A, Hopp HE, del Vas M, Asurmendi S (2009): Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. BMC Plant Biology 9(1): 152
- Benedict JH, Sachs ES, Altman DW, Deaton DR, Kohel RJ, Ring DR, Berberich BA (1996): Field performance of cotton expressing CryIA insecticidal crystal



- protein for resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 89:230-238
- Benhamou N, Chamberland H, Pauzé FJ (1990): Implication of pectic components in cell surface interactions between tomato root cells and *Fusarium oxysporum* F. sp. *radicus-lycopersici*. *Plant Physiology* 92: 995-1003
- Bergey DR, Orozco-Cárdenas M, de Moura DS, Ryan CA (1999): A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 1756-1760
- Bernays EA (1998): Evolution of feeding behavior in insect herbivores. *BioScience* 48(1): 35-44
- Bhattacharyya A, Mazumdar S, Mazumdar-Leighton S, Babu CR (2006): A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry* 67: 232-241
- Bi RM, Jia HY, Feng DS, Wang HG (2006): Production and analysis of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) with improved insect resistance by the introduction of cowpea trypsin inhibitor gene. *Euphytica* 151: 351-360
- Birk Y (1994): Protein proteinase inhibitors in legume seeds - overview. *Archives Latino Americans de Nutrition* 44: 26-30
- Bohinc T, Goreta Ban S, Ban D, Trdan S (2012): Glucosinolates in plant protection strategies: A review. *Archives of Biological Sciences* 64(3): 821-828
- Bolton MD (2009): Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(5): 487-497
- Bonadé-Bottino M, Lerin J, Zaccomer B, Jouanin L (1999): Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 131-138

## 7. Lliteratura

- Boulter D, Edwards GA, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Hilder VA (1990): Additive protective effects of incorporating two different higher plant derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Protection* 9(5): 351-354
- Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA (1998): Midgut carboxypeptidase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: *Noctuidae*) larvae: enzyme characterisation, cDNA cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28(10): 739-749
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson VM (1998): Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiology* 118(1): 237-247
- Brito LO, Lopes AR, Parra JRP, Terra WR, Silva-Filho MC (2001): Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128B: 365-375
- Broadway RM, Duffey SS (1986): Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larvae *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 32:827-833
- Broadway RM, Colvin AA (1992): The influence of cabbage proteinase inhibitors, *in situ*, on the growth of larval *Trichoplusia ni* and *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* 18: 1009-1024
- Brown WE, Ryan CA (1984): Isolation, characterization of a wound induced trypsin inhibitor from alfalfa leaves. *Biochemistry* 23: 3428-3422

## 7. Lliteratura

- Brunelle F, Cloutier C, Michaud D (2004): Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 55:103–113
- Brzin J, Kidric M (1995): Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 13: 420-467
- Bu QY, Wu L, Yang SH, Wan JM (2006): Cloning of a potato proteinase inhibitor gene *PINII-2x* from diploid potato (*Solanum phurejia* L.) and transgenic investigation of its potential to confer insect resistance in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 732–739
- Cai D, Thurau T, Tian Y, Lange T, Yeh KW, Jung C (2003): Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. *Plant Molecular Biology* 51: 839–849
- Campbell LG, Anderson AW, Dregseth RJ, Smith LJ (1998): Association between sugarbeet root yield and sugarbeet root maggot (Diptera: *Otitidae*) damage. *Journal of Economic Entomology* 91: 522–527
- Campbell LG, Anderson AW, Dregseth RJ (2000): Registration of F1015 and F1016 sugarbeet germplasms with resistance to the sugarbeet root maggot. *Crop Science* 40: 867–868
- Campbell LG, Miller J, Rekoske M, Smith LJ (2008): Performance of sugarbeet hybrids with sugarbeet root maggot resistant pollinators. *Plant Breeding* 127: 43–48
- Campbell LG, Panella L, Smigocki AC (2011): Registration of F1024 sugarbeet germplasm with resistance to sugarbeet root maggot. *Journal of Plant Registrations* 5: 241–247

## ***7. Lliteratura***

- Cao J, Shelton AM, Earle ED (2001): Gene expression and insect resistance broccoli containing a *Bacillus thuringiensis cry1Ab* gene with the chemically inducible PR-1a promoter. *Molecular Breeding* 8: 207–216
- Cao J, Zhao JZ, Tang JD, Shelton AM, Earle ED (2002): Broccoli plants with pyramided *cry1Ac* and *cry1CBt* genes control diamondback moths resistant to Cry1A and Cry1C proteins. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 258–264
- Cao J, Bates SL, Zhao JZ, Shelton AM, Earle ED (2006): *Bacillus thuringiensis* protein production, signal transduction, and insect control in chemically inducible PR-1a/*cry1Ab* broccoli plants. *Plant Cell Reports* 25(6): 554–560
- Chan L, DeLumex BO (1982): Properties of trypsin inhibitor from winged bean (*Psophocarpus tetragonolonus*) seed isolated by affinity chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 42-46
- Chang MM, Culley D, Choi JJ, Hadwiger AL (2002): *Agrobacterium*-mediated co-transformation of a pea  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science* 163: 83-89
- Charity JA, Anderson MA, Bittisnich DJ, Whitecross M, Higgins TJV (1999): Transgenic tobacco and peas expressing a proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* have increased insect resistance. *Molecular Breeding* 5(4): 357-365
- Checker VG, Chhibbar AK, Khurana P (2012): Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. *Transgenic Research* 21(5): 939-957
- Chen MS (2008): Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15: 101-114
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S (2002): Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic

- stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 129: 661-677
- Cherrett JM (1972): Chemical aspects of plant attack by leaf-cutting ants. In: *Phytochemical ecology* (ed. Harborne JB) London: Academic Press 13-24
- Chirumamilla A, Yocum GD, Boetel MA, Dregseth RJ (2008): Multi-year survival of sugarbeet root maggot (*Tetanops myopaeformis*) larvae in cold storage. *Journal of Insect Physiology* 54: 691- 699
- Chougule NP, Bonning BC (2012): Toxins for Transgenic Resistance to Hemipteran Pests. *Toxins* 4(6): 405-429
- Christeller JT, Farley PC, Ramsay RJ, Sullivan PA, Laing WA (1994): Midgut proteinase activities of three keratinolytic larvae, *Hofmannophila pseudospretalla*, *Tineola bisselliella* and *Anthrenocerus australis*, and the effect of proteinase inhibitors on proteolysis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 25: 159-173
- Christeller JT (2005): Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal* 272: 5710–5722
- Christou P, Capell T, Kohli A, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (2006): Recent development and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science* 11(6): 302-308
- Cloutier C, Fournier M, Jean C, Yelle S, Michaud D (1999): Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 40: 69–79
- Cloutier C, Jean C, Fournier M, Yelle S, Michaud D (2000): Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on *oryzacystatin I*-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-

- production of insensitive proteases. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 44: 69–81
- Confalonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, Fogger C, Delledonne M (1998): Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (*Kti3*) gene. Molecular Breeding 4: 137–145
- Coté F, Hahn MG (1994): Oligosaccharins: structures and signal transduction. Plant Molecular Biology 26: 1375-1411
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH (2007): *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF (2003): Critical weight in the development of insect body size. Evolution and Development 5: 188-197
- Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF (2004): The effects of environmental variation on a mechanism that controls insect body size. Evolutionary Ecology Research 6: 49-62
- Davidowitz G, Nijhout HF (2004): The physiological basis of reaction norms: Where developmental rate and duration of development connect. Integrative and Comparative Biology 44: 443-449
- de Bruxelles GL, Roberts MR (2001): Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. Critical Reviews in Plant Sciences 20: 487-521
- De Leo F, Bonadé-Bottino MA, Ceci LR, Gallerini R, Jouanin L (1998): Opposite effect on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin inhibitor in transgenic plants. Plant Physiology 118: 997-1004
- De Leo F, Bonadé-Bottino MA, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L (2001): Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 593–602

- De Leo F, Gallerani R (2002): The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32(5): 489-96
- De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR (2002): PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research* 30 (1): 347-348
- De Vos M, Van Oosten VR, van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ (2005): Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 923–937
- Delledone M, Allegro G, Belenghi B, Balestrazzi A, Picco F, Levine A, Zelasco S, Calligari P, Confalonieri M (2001): Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding* 7: 35-42
- Desjardins Y, Dubuc JF, Badr A (2009): *In vitro* culture of plants: a stressful activity! *Acta Horticulturae* 812: 29–50
- Dhaliwal GS, Dhawan AK, Singh R (2007): Biodiversity and ecological agriculture: Issues and perspectives. *Indian Journal of Ecology* 34(2): 100-109
- Dhaliwal GS, Koul O (2010): Quest for pest management: from green revolution to gene revolution. Kalyani Publishers, New Delhi.
- Di Maro A, Terracciano I, Sticco L, Fiandra L, Ruocco M, Corrado G, Parente A, Rao R (2010): Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology* 147(1): 1–6
- Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996): Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or

- tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 6025-6030
- Dietz-Pfeilstetter A (2010): Stability of transgene expression as a challenge for genetic engineering. Plant Science 179: 164–167
- Ding LC, Hu CY, Yeh KW, Wang PJ (1998): Development of insect-resistant transgenic cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from loal sweet potato. Plant Cell Reports 17: 854-860
- Drake HL, Horn MA (2007): As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. Annual Review of Microbiology 61: 169-189
- Duan X, Li X, Xue Q, Abo-el-saad M, Xu D, Wu R (1996): Transgenic rice plants harboring an introduced *potato proteinase inhibitor II* gene are insect resistant. Nature Biotechnology 14: 494–498
- Duke JA (1983): Handbook of Energy Crops: *Beta vulgaris* L. [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Beta\\_vulgaris.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Beta_vulgaris.html)
- Dunaevskii YE, Gladysheva IP, Pavlukova EB, Beliakova GA, Gladyshev DP, Papisova AI, Larionova NI, Belozersky MA (1997): The anionic protease inhibitor BBWI - 1 from buckwheat seeds. Kinetic properties and possible biological role. Physiologia Plantarum 100: 483-488
- Dunse KM, Stevens JA, Lay FT, Gaspar YM, Heath RL, Anderson MA (2010): Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107(34): 15011-15015
- Dussourd DE, Denno RF (1991): Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. Ecology 72: 1383-1396



## ***7. Lliteratura***

- English L, Slatin SL (1992): Mode of action of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 1-7
- Euler M, Baldwin IT (1996): The chemistry of defense and apparency in the corollas of *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 107: 102–112
- Fan SG, Wu GJ (2005): Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46: 273-292
- FAO (2009): Feeding the world in 2050. World Agricultural Summit on Food Security 16–18 November 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Felton GW, Tumlinson JH (2008): Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 457–463
- Ferry N, Edwards MG, Gatehouse J, Capell T, Christou P, Gatehouse AM (2006): Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic Research* 15: 13-19
- Foissac X, Loc NT, Christou P, Gatehouse AMR, Gatehouse JA (2000): Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *Journal of Insect Physiology* 46: 573-583
- Forster V, Marrese D, Staska K, Trinks K, Stander JR (1997): Petition for determination of nonregulated status: glufosinate tolerant sugar beet, transformation event T120-7. AgrEvo USA Comapany, Wilmington, Delaware. p: 67
- Freeman BC, Beattie GA (2008): An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01

## 7. Lliteratura

- Frey M, Stettner C, Paré PW, Schmelz EA, Tumlinson JH, Gierl A (2000): An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 14801-14806
- Garza R, Vera J, Cardona C, Barcenás N, Singh SP (2001): Hypersensitive response of beans to *Apion godmani* (Coleoptera: *Curculionidae*). *Journal of Economical Entomology* 94: 958-962
- Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Dobie P, Kilminster AM, Boulter D (1979): Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30: 948-958
- Gatehouse AMR, Boulter D (1983): Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 345-350
- Gatehouse AMR, Down RE, Powell KS, Sauvion N, Rahbé Y, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Gatehouse JA (1996): Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79: 295-307
- Gatehouse AMR, Gatehouse JA (1998): Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pesticide Science* 52: 165-175
- Gatehouse JA (2011): Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Current Protein and Peptide Science* 12(5): 409-416
- Gianessi L (2009): The benefits of insecticide use: sugarbeets. CropLife Foundation, Crop Protection Research Institute, [www.croplifefoundation.org](http://www.croplifefoundation.org)
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV (1992): The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 615-636

## ***7. Lliteratura***

- Girard C, Le Métayer M, Bonadé-Bottino M, Pham-Delègue P-H, Jouanin L (1998): High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 229–237
- Godard KA, Byun-McKay A, Levasseur C, Plant A, Seguin A, Bohlmann J (2007): Testing of a heterologous, wound- and insect-inducible promoter for functional genomics studies in conifer defense. *Plant Cell Reports* 26: 2083–2090
- Goggin FL (2007): Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 399-408
- Gourinath S, Alam N, Srinivasan A, Betzel Ch, Singh TP (2000): Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and  $\alpha$ -amylase from ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica D* 56: 287-293
- Graham JS, Pearce G, Merryweather J, Titani K, Ericsson LH, Ryan CA (1985): Wound induced proteinase inhibitors from tomato leaves. II. The cDNA-deduced primary structure of preinhibitor II. *Journal of Biological Chemistry* 260: 6561-6564
- Graham JS, Hall G, Pearce G, Ryan CA (1986): Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta* 169: 399-405
- Graham J, McNicol RJ, Greig K (1995): Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor gene. *Annals of Applied Biology* 127: 163–173
- Graham J, Gordon SC, McNicol RJ (1997): The effect of the *CpTi* gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiorynchus sulcatus* F. Coleoptera: *Curculionidae*). *Annals of Applied Biology* 131: 133–139

- Graham JS, Ryan CA (1997): Accumulation of metallocarboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101: 1164-1170
- Green TR, Ryan CA (1972): Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defence mechanism against insects. *Science* 175: 776-777
- Greenblatt HM, Ryan CA, James MNG (1989): Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 205: 201-228
- Greenwood PE, Nikulin MS (1996): *A Guide to Chi-squared Testing*. New York: Wiley.
- Guilleroux M, Osbourn A (2004). Gene expression during infection of wheat roots by the 'Take-All' fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Molecular Plant Pathology* 5: 203-216
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, Gomez-Lim MA (1999): The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology* 17: 1223-1226
- Habib H, Fazili KM (2007): Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2(3): 68-85
- Haq SK, Atif SM, Khan RH (2004): Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 43(1): 145-159
- Haruta M, Major IT, Christopher ME, Patton JJ, Constabel CP (2001): A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Molecular Biology* 46: 347-359

---

## 7. *Lliteratura*

- Hass GM, Nau H, Biemann K, Grahn DT, Ericsson LH, Neurath H (1975): The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry* 14: 14-142
- Hass GM, Hermodson MA (1981): Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry* 20: 2256-2260
- Heath RL, Barton PA, Simpson RJ, Reid GE, Lim G, Anderson MA (1995): Characterization of the protease processing sites in a multidomain proteinase inhibitor precursor from *Nicotiana glauca*. *European Journal of Biochemistry* 230: 250-257
- Heath RL, McDonald G, Christeller JT, Lee M, Bateman K, West J, Heeswijck RV, Anderson MA (1997): Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *Journal of Insect Physiology* 43(9): 833-842
- Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Bigler F (1998): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* 27: 1255 -1263
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker F, Boulter D (1987): A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163
- Hilder VA, Boulter D (1999): Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. *Crop Protection* 18: 177-191
- Hinks CF, Hupka D (1995): The effects of feeding leaf sap from oats and wheat with and without soybean trypsin inhibitor, on feeding behavior and digestive physiology of adults males of *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Insect Physiology* 41: 1007-1015
- Hoffmann MP, Zalom FG, Wilson LT, Smilanick JM, Malyj LD, Kiser J, Hilder VA, Barnes WM (1992): Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor:

---

## 7. *Lliteratura*

- Efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85: 2516-2522
- Horisberger M, Tacchini-Vonlanthen M (1983a): Ultrastructural localization of Kunitz inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv. Maple Arrow by the gold method. *Histochemistry and Cell Biology* 77(1): 37-50
- Horisberger M, Tacchini-Vonlanthen M (1983b): Ultrastructural localization of Bowman-Birk inhibitor on thin sections of *Glycine max* (Soybean) cv. Maple Arrow by the gold method. *Histochemistry and Cell Biology* 77(3): 313-321
- Howe GA, Lightner J, Browse J, Ryan CA (1996): An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077
- Huang F, Buschman LL, Higgins RA, McGaughey WH (1999): Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European Corn Borer. *Science* 284(5416): 965-967
- Hui D, Javeed I, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT (2003): Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, *Sphingidae*) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in the accumulations of herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiology* 131: 1877-1893
- Irie K, Hosoyama H, Takeuchi T, Iwabuchi K, Watanabe H, Abe M, Abe K, Arai S (1996): Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Molecular Biology* 30: 149-157
- Jacobsen SE, Olszewski NE (1996): Gibberellins regulate the abundance of RNAs with sequence similarity to proteinase inhibitors, dioxygenases and dehydrogenases. *Planta* 198: 78-86

- James C (2010): Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No 42. ISBN 978-1-892456-49-4. ISAAA, Ithaca, NY.
- James DJ, Passey AJ, Webster AD, Barbara DJ, Viss P, Dandekar AM, Uratsu SL (1993): Transgenic apples and strawberries: Advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *Acta Horticulturae (ISHS)* 336: 179-184
- Janmaat AF, Myers J (2003): Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 2263-2270
- Jefferson RA (1987): Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5(4): 387-405
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan CA (1989): Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 9871-9875
- Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosch D, Stiekema WJ (1995): Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 8041-8045
- Jongsma MA, Stiekema WJ, Bosch D (1996): Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Trends in Biotechnology* 14: 331-333
- Jongsma MA, Bolter C (1997): The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43: 885-895
- Joyce SM, Cassells AC, Jain CM (2003): Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74(2): 103-121

## ***7. Lliteratura***

- Kato T, Hori M, Ogawa T, Muramoto K, Toriyama K (2010): Expression of gene for *Dioscorea batatas* tuber lectin 1 in transgenic tobacco confers resistance to green-peach aphid. *Plant Biotechnology* 27: 141-145
- Keil M, Sanchez-Serrano JJ, Willmitzer L (1989): Both wound inducible and tuber specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *European Molecular Biology Organization Journal* 8: 1323-1330
- Kervinen J, Tobin GJ, Costa J, Waugh D, S, Wlodawer A, Zdanov A (1999): Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *European Molecular Biology Organization Journal* 18(14): 3947-3955
- Kessler A, Baldwin IT (2001): Defensive functions of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144
- Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T (2001): Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology* 126: 811-825
- Klopfenstein NB, Allen KK, Avila FJ, Heuchlin SA, Martinez J, Carman RC, Hall ER, McNabb HS (1997): Proteinase inhibitor II gene in transgenic poplar: chemical and biological assays. *Biomass and Bioenergy* 12: 299-311
- Knop Wright M, Brandt SL, Coudron TA, Wagner RM, Habibi J, Backus EA, Huesing JE (2006): Characterization of digestive proteolytic activity in *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: *Miridae*). *Journal of Insect Physiology* 52: 717-728
- Knowels BH, Dow JAT (1993): The crystalendotoxin of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioassays* 15:469
- Knowels BH (1994): Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology* 24: 275-308



## 7. Literatura

- Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM (1997): Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2(10): 379-384
- Korth KL, Dixon RA (1997): Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology* 115: 1299-1305
- Kovačev L, Čačić N, Mezei S (2008): Pola veka oplemenjivanja šećerne repe u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo. Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Zbornik radova, Sveska 45: 103-112
- Kumar M, Kumar Shukla A, Singh H, Tuli R (2009): Development of insect resistant transgenic cotton lines expressing *cry1EC* gene from an insect bite and wound inducible promoter. *Journal of Biotechnology* 140: 143-148
- Kunitz M (1945): Crystalline soybean trypsin inhibitor. Part II: General properties. *Journal of General Physiology* 30: 291-310
- Lange WH (1987): Insect pests of sugar beet. *Annual Review of Entomology* 32: 341-360
- Lara P, Ortego F, Gonzalez-Hidalgo E, Castañera P, Carbonero P, Díaz I (2000): Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: *Noctuidae*) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. *Transgenic Research* 9(3): 169-178
- Lawrence PK, Koundal KR (2002): Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1): 93-102
- Lecardonnell A, Chauvin L, Jouanin L, Beaujean A, Prevost G, Sangwan B (1999): Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Science* 140: 71-79
- Lemaux P (2008): Genetically engineered plants and foods: A scientist's analysis of the issues (Part I). *Annual Review of Plant Biology* 59: 771-812

- León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001): Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 52(354): 1-9
- Leple J, Bonade-Bottino M, Augustin S, Pilate G, Letan V, Delplanque A, Cornu D, Jouanin L (1995): Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: *Chrysomelidae*) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding* 1: 319-328
- Leroy C, Jauneau A, Quilichini A, Dejean A, Orivel J (2008): Comparison between the anatomical and morphological structure of leaf blades and foliar domatia in the ant-plant *Hirtella physophora* (*Chrysobalanaceae*). *Annals of Botany* 101(4): 501-507
- Leszczynski B, Warchol J, Niraz S (1985): The influence of phenolic compounds on the preference of winter wheat cultivars by cereal aphids. *Insect Science Applications* 6: 157-158
- Lewellen RT (1992): Use of plant introductions to improve populations and hybrids of sugarbeet. In: *Use of plant introductions in cultivar development, Part 2*. Crop Science Society of America, Madison, WI (USA), p: 117-135
- Li YE, Chen ZX, Wu X, Li SJ, Jiao GL, Wu JH, Fan X P, Meng JH, Zhu Z, Wang W, Zhu Y, Xu HL, Xiao GF, Li XH (1998): Obtaining transgenic cotton plants with cowpea trypsin inhibitor gene. *Acta Gossypii Sinica* 10: 237-243
- Lodhi N, Ranjan A, Singh M, Srivastava R, Singh SP, Chaturvedi CP, Ansari SA, Sawant SV, Tuli R (2008): Interactions between upstream and core promoter sequences determine gene expression and nucleosome positioning in tobacco PR-1a promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779(10): 634-644
- Logemann J, Jach G, Tommerup H, Mundy J, Schell J (1992): Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Biotechnology Journal* 10(3): 305-308

- Lu L, Le, J, Ming S, Li L, Cao B (2005): Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). African Journal of Biotechnology 4: 45-49
- Macedo MLR, Sa CM, Freire MGM, Parra JRP (2004): A Kunitz-type inhibitor from *Adenantha pavonia* L. seeds active against coleopteran pest proteases and its effect on the development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(9): 2533-2540
- Maffei ME, Mithofer A, Boland W (2007): Before gene expression: early events in plant-insect interaction. Trends in Plant Science 12(7): 310-316
- Maheswaran G, Pridmore L, Franz P, Anderson MA (2007): A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. Plant Cell Reports 26(6): 773-782
- Marchetti S, Delledonne M, Fogher C, Chiabà C, Chiesa F, Savazzini F, Giordano A (2000): Soybean Kunitz, *C-II* and *PI-IV* inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. Theoretical and Applied Genetics 101(4): 519-526
- Marres M, Meloun B, Pavlik M, Kostka V, Baudys M (1989): Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structural relationship to trypsin inhibitor family. FEBS Letters 251: 94-98
- Masclef A (1891): Atlas des Plantes de France
- McGaughey WH, Whalon ME (1992): Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science 258: 1451-14 55
- McIntosh SC, Kishore GM, Perlak FJ, Marrone PG, Stone TB, Sims SR, Fuchs RL (1990): Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38(4): 1145-1152

- McManus MT, Burgess EPJ (1995): Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology* 41: 731-738
- McManus MT, Burgess EPJ, Philip B, Watson LM, Laing WA, Voisey CR, White DWR (1999): Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: effects on larval development of *Spodoptera litura*. *Transgenic Research* 8: 383-395
- Mehrotra M, Singh AK, Sanyal II, Altosaar I, Amia DV (2011): Pyramiding of modified *cry1Ab* and *cry1Ac* genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) for improved resistance to pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Euphytica* 182: 87-102
- Meiyalaghan S, Pringle MJ, Barrell JP, Jacobs MEJ, Conner JA (2010): Pyramiding transgenes for potato tuber moth resistance in potato. *Plant Biotechnology Reports* 4: 293-301
- Mello OM, Silva-Filho MC (2002): Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 71-81
- Menzel G, Harloff H-J, Jung C (2003): Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(5): 571-576
- Michaud D, Cantin L, Vrain TC (1995): Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin-II by oryzacytatin-insensitive insect digestive proteinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322: 469-474
- Michaud D, Cantin L, Bonadé-Bottino M, Jouanin L, Vrain TC (1996): Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complexes using mildly denaturing gelatin polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 17: 1373-1379

- Morris LW, Ducreux JML, Fraserb DP, Millamc S, Taylor AM (2006): Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Metabolic Engineering* 8: 253–263
- Mosolov VV, Loginova MD, Fedurkina NV, Benken II (1976): The biological significance of proteinase inhibitors in plants. *Plant Science Letters* 7(2): 77–80
- Mosolov VV, Valueva TA (2005): Proteinase inhibitors and their function in plant: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41: 227–246
- Murashige T, Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479
- Nandi AK, Basu D, Das S, Sen SK (1999): High level expression of soybean trypsin inhibitor gene in transgenic tobacco plants failed to confer resistance against damage caused by *Helicoverpa armigera*. *Journal of Biosciences (Bangalore)* 24: 445-52
- Narwaez-Vasquez J, Franceschi VR, Ryan CA (1993): Proteinase-inhibitor synthesis in tomato plants - evidence for extracellular deposition in roots through the secretory pathway. *Planta* 189(2): 257-266
- Nelson DE, Raghothama KG, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA (1992): Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. *Plant Molecular Biology* 19: 577–588
- Ninković S, Miljuš-Djukić J, Radović S, Maksimović V, Lazarević J, Vinterhalter B, Nešković M, Smigocki A (2007): *Phytodecta fornicata* Bruggemann resistance mediated by *oryzacystatin II* proteinase inhibitor transgenes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91: 289-294
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ (1996): Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917

- Oerke EC (2006): Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43
- Ojima A, Shiota H, Higashi K, Kamada H, Shimma Y, Wada M, Satoh S (1997): An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. *Plant Molecular Biology* 34: 99-109
- Oliveira AS, Pereira RA, Lima LM, Morais AAH, Melo FR, Franco OL, Bloch JC, Grossi-de-Sa MF, Sales MP (2002): Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 122-132
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011): How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326
- Orozco-Cárdenas ML, McGurl B, Ryan CA (1993): Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8273-8276
- Panella L, Lewellen RT (2007): Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives. *Euphytica* 154: 383-400
- Park H, Yamanaka N, Mikkonem A, Kusakabe I, Kobayashi H (2000): Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64: 931-999
- Pautot V, Holzer FM, Reisch B, Walling LL (1993): Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 9906-9910
- Pearce G, Ryan CA, Liljegren D (1988): Proteinase inhibitors I and II in fruit of wild tomato species: transient components of a mechanism for defense and seed dispersal. *Planta* 175: 527-531

## 7. Lliteratura

- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991): A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898
- Pearce G, Johnson S, Ryan CA (1993): Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase iso inhibitors of the potato inhibitor II family. *Plant Physiology* 102: 639-644
- Peña-Cortés H, Sánchez-Serrano JJ, Rocha-Sosa M, Willmitzer L (1988): Systemic induction of proteinase inhibitor II gene expression in potato plants by wounding. *Planta* 174: 84-89
- Peña-Cortés H, Willmitzer L, Sánchez-Serrano JJ (1991): Abscisic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. *Plant Cell* 3: 963-972
- Pendola S, Greenberg B (1975): Substrate-specific analysis of proteolytic enzymes in the larval midgut of *Calliphora vicina*. *Annals of the Entomological Society of America* 68: 341-345
- Perlak FJ, Oppenhuizen M, Gustafson K, Voth K, Sivasupramaniam S, Heering D, Carey B, Ihrig RA, Roberts JK (2001): Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA-early promises versus today's reality. *Plant Journal* 27: 489-501
- Pernas M, Sanchez-Mong R, Salcedo G (2000): Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Letters* 467(2-3): 206-210
- Perry JN, Devos Y, Arpaia S, Bartsch D, Ehlert C, Gathmann A, Hails RS, Hendriksen NB, Kiss J, Messéan A, Mestdagh S, Neemann G, Nuti M, Sweet JB, Tebbe CC (2012): Estimating the effects of Cry1F Bt-maize pollen on non-target Lepidoptera using a mathematical model of exposure. *Journal of Applied Ecology* 49: 29-37
- Pitre HN, Hogg DB (1983): Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. *Journal of the Georgia Entomological Society* 18: 187-194

- Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C (2004): Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology, Plant* 40(1): 1-22
- Puthoff DP, Smigocki AC (2005): Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genes regulated by sugar beet root maggot (*Tetanopsis myopaeformis*) infections. *Proceedings of the American Society of Sugar Beet Technologists* 33: 214–219
- Puthoff DP, Smigocki AC (2007): Insect feeding-induced differential expression of *Beta vulgaris* root genes and their regulation by defense-associated signals. *Plant Cell Reports* 26: 71–84
- Quilis J, Meynard D, Vila L, Avilés F X, Guiderdoni E, San Segundo B (2007): A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5: 537–553
- Radisky ES, Kwan G, Karen Lu CJ, Koshland De Jr (2004): Binding, proteolytic, and crystallographic analyses of mutations at the protease-inhibitor interface of the subtilisin BPN'/chymotrypsin inhibitor 2 complex. *Biochemistry* 43: 13648–13656
- Rai M, He C, Wu R (2009): Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. *Transgenic Research* 18(5): 787-799
- Rancour JM, Ryan CA (1968): Isolation of a carboxypeptidase B inhibitor from potatoes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 380-382
- Rao KV, Rathore KS, Hodges TK, Fu X, Stoger E, Sudhakar D, Williams S, Christou P, Bharathi M, Bown DP, Powell KS, Spence J, Gatehouse A, Gatehouse JA (1998): Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal* 15(4): 469–477



## 7. Lliteratura

- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000): Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12(5): 707-719
- Richardson M (1977): The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry* 16(2): 159-169
- Rogers BL, Pollock J, Klapper DG, Griffith IJ (1993): Sequence of the proteinase inhibitor cystatin homolog from the pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Gene* 133: 219-221
- Royo J, Leon J, Vancanneyt G, Albar JP, Rosahl S, Ortego F, Castanera P, Sánchez-Serrano JJ (1999): Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 1146-1151
- Ryan CA (1990): Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449
- Ryan CA (2000): The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 112-121
- Ryan SN, Liang WA, McManus MT (1998): A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry* 49: 957-63
- Saadati F, Bandani AR (2011): Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Journal of Insect Science* 11: 72
- Salama HS, Sharaby A (1985): Histopathological changes in *Heliothis armigera* infected with *Bacillus thuringiensis* as detected by electron microscopy. *Insect Science and its Application* 6: 503-511

- Sánchez-Serrano J, Schmidt R, Scell J, Willmitzer L (1986): Nucleotide sequence of proteinase inhibitor I1 encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. *Molecular and General Genetics* 203: 15-20
- Sane VA, Nath P, Aminuddin N, Sane PV (1997): Development of insect-resistant transgenic plants using plant genes: Expression of cowpea trypsin inhibitor in transgenic tobacco plants. *Current Science* 72: 741-747
- Schnepf HE, Whitley HR (1981): Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78: 2893-2897
- Schoonhoven LM, Jermy T, van Loon JJA (1998): *Insect-plant biology. From physiology to evolution.* Chapman and Hall, London, p: 31-32
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm I (1998): Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology* 16(4): 168-175
- Schwachtje J, Baldwin IT (2008): Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiology* 146: 845-851
- Senthilkumar R, Cheng CP, Yeh KW (2010): Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology Journal* 8: 65-75
- Shade RE, Schroeder HE, Pueyo JJ, Tabe LM, Murdock LL, Higgins TJV, Chrispeels MJ (1994): Transgenic pea seeds expressing the amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Biotechnology* 12: 793-796
- Sharma HC (2001): Cotton bollworm/legume pod borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (*Noctuidae*: Lepidoptera): biology and management. *Crop Protection Compendium.* Commonwealth Agricultural Bureau International Oxon, UK. p: 72
- Shukle RH, Murdock LL, Gallun RL (1985): Identification and partial characterization of a major gut proteinase from larvae of the Hessian fly,

- 
- Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: *Cecidomyiidae*). Insect Biochemistry 15: 93–101
- Siebertz B, Logemann J, Willmitzer L, Schell J (1989): *cis*-Analysis of the wound-inducible promoter *wun1* in transgenic tobacco plants and histochemical localization of its expression. The Plant Cell 1: 961-968
- Silva FCBL, Alcazar A, Mecedo LLP, Oliveira AS, Macedo FP, Abreu LRD, Santos EA, Sales MP (2006): Digestive enzymes during development of *Ceratitidis capitata* (Diptera: *Tephritidae*) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36: 561- 569
- Sin SF, Chye ML (2004): Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. Planta 219: 1010–1022
- Smigocki AC, Ivic-Haymes SD, Campbell LG, Boetel MA (2006): A sugarbeet root maggot (*Tetanops myopaeformis* Roder) bioassay using *Beta vulgaris* L. seedlings and *in vitro* propagated transformed hairy roots. Journal of Sugar Beet Research 43: 1–14
- Smigocki AC, Puthoff DP, Ivic-Haymes S, Zuzga S (2007): A *Beta vulgaris* proteinase inhibitor gene (*BvSTI*) regulated by sugar beet root maggot feeding on moderately resistant F1016 roots. American Society of Sugar Beet Technologists Proceedings 34: 143-150
- Smigocki A, Campbell L, Larson R, Wozniak C (2008a): Sugar Beet. In: Kole C, Hall TC editors. Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Sugar, Tuber and Fiber Crops. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p: 59-96
- Smigocki AC, Ivic-Haymes SD, Puthoff DP, Zuzga S (2008b) Recent advances in functional genomics for sugar beet (*Beta vulgaris* L.) improvement: progress in determinating role of *BvSTI* in pest resistance in roots. Sugar Tech 10: 91-98

## ***7. Lliteratura***

- Smigocki AC, Ivic-Haymes SD, Zuzga S, Savić J (2009): Insect resistance to sugar beet pests mediated by *Beta vulgaris* proteinase inhibitor transgene. 35<sup>th</sup> American Society of Sugar Beet Technologist Proceedings. <http://assbt/proceedings.org/SecBandE.htm>
- Sneh B, Schuster S (1981): Recovery of *Bacillus thuringiensis* and other bacteria from larvae of *Spodoptera littoralis* Boisid. previously fed on *B. thuringiensis*-treated leaves. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 295-303
- Snyder GW, Ingersoll JC, Smigocki AC, Owens LD (1999): Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthetic gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Plant Cell Reports* 18: 829-834
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999): The involvement of cysteine protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11: 431-443
- Spates GE, Harris RL (1984): Reduction of fecundity, egg hatch, and survival in adult horn flies fed protease inhibitors. *The Southwestern Entomologist* 9(4): 399-403
- Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS (2006): Structural and functional diversities in Lepidopteran serine proteases. *Cellular and Molecular Biology Letters* 11: 132-154
- Steffens R, Fox FR, Kassell B (1978): Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae, *Ostrinia nubilalis* (Huebner). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(1): 170-174
- Stratmann JW, Ryan CA (1997): Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 11085-11089

- Supuran CT, Scozzafava A, Clare BW (2002): Bacterial protease inhibitors. *Medical Care Research and Review* 22(4): 329-72
- Tabashnik BE, Carriere Y, Dennehy Y, Morin S, Sisterson MS, Roush RT, Shelton AM, Zhao J (2003): Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field. *Journal of Economic Entomology* 96: 1031-1038
- Tamhane VA, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS (2007): Diverse forms of Pin-II family proteinase inhibitors from *Caspicum annuum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Gene* 403: 29-38
- Taylor BH, Young RJ, Scheuring CF (1994): Induction of a proteinase inhibitor II-class gene by auxin in tomato roots. *Plant Molecular Biology* 23: 1005-1014
- Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, Deshpande V, Sainani M, Ranjekar P, Gupta G, Birah A, Rani S, Kachole M, Giri AP, Gupta V (2003): Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 63(6): 643-652
- Theurer JC, Blickenstaff CC, Mahrt GC, Doney DL (1982): Breeding for resistance to the sugarbeet root maggot. *Crop Science* 22: 641-645
- Truitt CL, Wei HX, Pare PW (2004): A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell* 16: 523-532
- Urwin PE, McPherson MJ, Atkinson HJ (1998): Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 204: 472-479
- Vaeck M, Reynaerts A, Hoftey H, Jansens S, DeBeuckleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J (1987): Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 327: 33-37

- Valdebouze P, Bergeron E, Gaborit T, Delort-Laval J (1980): Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. *Canadian Journal of Plant Science* 60: 695-701
- Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF, Inze D (2001): The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414
- van Dam NM, Hadwich K, Baldwin IT (2000): Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Oecologia* 122: 371-379
- van de Ven WTG, LeVesque CS, Perring TM, Walling LL (2000): Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *Plant Cell* 12(8): 1409-1424
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR (1990): Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299
- Van der Vyver C, Schneiderei J, Driscoll S, Turner J, Kunert K, Foyer CH (2003): Oryzacin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 1: 101-112
- Van Rie J, McGaughey WH, Johnson DE, Bamett BD, Van Mellaert H (1990): Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74
- Voelckel C, Baldwin IT (2004): Generalist and specialist lepidopteran larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles. *Ecology Letters* 7: 770-775
- Voelckel C, Baldwin IT (2004): Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints

- and a distinct imprint from stress combinations. *The Plant Journal* 38: 650–663
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004): New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11
- Waldron C, Wegrich LM, Merlo PAO, Walsh TA (1993): Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Molecular Biology* 23: 801-812
- Wang HY, Huang YC, Chen SF, Yeh KW (2003): Molecular cloning, characterization and gene expression of a water deficiency and chilling induced proteinase inhibitor I gene family from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) leaves. *Plant Science* 165: 191–203
- Wang M, Sun X, Tan D, Gong S, Meijer J, Zhang J (2009): The two non-functional myrosinase genes *TGG3* and *TGG6* in *Arabidopsis* are expressed predominantly in pollen. *Plant Science* 177(4): 371–375
- Wang SJ, Lan YC, Chen SF, Chen YM, Yeh KW (2002): Wound-response regulation of the sweet potato *sporamin* gene promoter region. *Plant Molecular Biology* 48: 223–231
- Wang XL, He RF, He GC (2005): Construction of suppression subtractive hybridization libraries and identification of Brown Planthopper-induced genes. *Journal of Plant Physiology* 162: 1254-1262
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S (2011): Herbivore-induced resistance in different groundnut germplasm lines to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: *Noctuidae*). *Acta Physiologiae Plantarum* 34(1): 343-352
- Watson L, Dallwitz MJ (1992): *The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval*. Version: 14th December 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>

## ***7. Lliteratura***

- Whalon M, Mota-Sanchez D, Hollongworth RM, Duynslager L (2008): Arthropod pesticide resistance database, <http://www.pesticideresistance.org>. Cited February 2008
- Wilhite SE, Elden TC, Puizdar V, Armstrong S, Smigocki AC (2000): Inhibition of aspartyl and serine proteinases in the midgut of sugarbeet root maggot with proteinase inhibitors. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 229–233
- Williamson VM, Hussey RS (1996): Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8: 1735-1745
- Winterer J, Bergelson J (2001): Diamondback moth compensatory consumption of protease inhibitor-transformed plants. *Molecular Ecology* 10: 1069-1074
- Wolfson JL, Murdock LL (1990): Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology* 16(4): 1089-1102
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Leon J, Fitzsimmons KC, Levine EB, Raskin I, Shah DM (1997): Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. *Plant Physiology* 115(2): 427-435
- Xu D, McElroy D, Thoraburg RW, Wu R (1993): Systemic induction of a potato pin 2 promoter by wounding methyl jasmonate and abscisic acid in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology* 22: 573-588
- Xu D, Xue Q, McElroy D, Mawal Y, Hilder VA, Wu R (1996): Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Molecular Breeding* 2: 167-173
- Xu ZF, Qi WQ, Ouyang XZ, Yeung E, Chye ML (2001): A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. *Plant Molecular Biology* 47: 727–738
- Yang L, Fang Z, Dicke M, van Loon JJ, Jongsma MA (2009): The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2)



to overcome host plant defence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 55-61

Yeh KW, Lin MI, Tuan SJ, Chen YM, Lin CY, Kao SS (1997): Sweet potato (*Ipomea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance to *Spodoptera litura*. *Plant Cell Reports* 16: 696-699

Yevtushenko DP, Sidorov VA, Romero R, Kay WW, Misra S (2004): Wound-inducible promoter from poplar is responsive to fungal infection in transgenic potato. *Plant Science* 167: 715-724

Zhao JZ, Cao J, Li YX, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM (2003): Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology* 21: 1493-1497

Zhu-Salzman K, Koiwa H, Salzman RA, Shade RE, Ahn JE (2003): Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12: 135-145

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Savić (rođ. Atanacković) rođena je 12. 6. 1977. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1996. godine na studijskoj grupi Biologija. Diplomirala je u maju 2004. godine i stekla zvanje diplomiranog biologa.

Jelena Savić je tokom školske 2005-2006 bila zaposlena kao asistent u nastavi na Katedri za fiziologiju biljaka, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od januara 2006. godine radi kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, a od 2010. godine radi na istom mestu kao istraživač-saradnik.

Od septembra 2008. do septembra 2009. godine Jelena Savić je bila na naučnom usavršavanju u Laboratoriji za molekularnu patologiju biljaka, Centra za istraživanja u poljoprivredi, Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland).

Jelena Savić je angažovana na nacionalnom projektu „Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste“ (ON173015). U prethodnom periodu bila je angažovana na još dva nacionalna projekta: TR31049 - Razvoj i primena proteinskih markera u odabiru sorti krompira otpornih prema visokim temperaturama (2010–2012) i 143026B - Regulacija morfogenezskih procesa i sekundarnog metabolizma i genetičke transformacije biljaka u kulturi *in vitro* (2006–2010). Jelena Savić je bila angažovana i na nekoliko međunarodnih projekata: BIVEP - Balkan *in vitro* Depot of Endangered Plants (2008), SCOPES - Priming of heat and drought tolerance in potato (2009-2012), kao i na Biletaralnom naučnoistraživačkom projektu između Republike Srbije i Republike Slovenije (2008).

Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Srpskog biološkog društva i Federacije evropskih društava za biljnu biologiju (FESPB).