

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Aleksandar D. Cingel

**EKSPRESIJA GENA ZA INHIBITORE
CISTEINSKIH PROTEINAZA (*OCI* i *OCII*)
U TRANSFORMISANIM BILJKAMA
KROMPIRA (*Solanum tuberosum* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

MSc Aleksandar D. Cingel

**EXPRESSION OF CYSTEINE PROTEINASE
INHIBITOR GENES (*OCI* and *OCII*)
IN TRANSFORMED POTATO
(*Solanum tuberosum* L.) PLANTS**

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

Članovi komisije:

naučni savetnik dr Jelica Lazarević

Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

viši naučni saradnik dr Jovanka Miljuš-Đukić

Univerzitet u Beogradu
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo disertacije urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu

dr Slavici Ninković zahvaljujem na stručnoj pomoći, savetima, razumevanju, podršci i poverenju tokom proteklih 12 godina saradnje

dr Jelici Lazarević zahvaljujem na prenesenom znanju i pomoći prilikom analize digestivnih enzima insekata i sugestijama prilikom uobličavanja teksta disertacije

dr Ivani Momčilović zahvaljujem na prenesenom znanju u ovladavanju tehnikama imunološke detekcije antigenih proteina

Jeleni Savić zahvalan sam na nesebičnoj pomoći prilikom analiza rekombinantnih proteina i biotesta sa insektima

dr Snežani Milošević, dr Milani Trifunović, Tatjani Ćosić i Martinu Raspor zahvalan sam na pomoći prilikom analiza nukleinskih kiselina

dr Svetlani Radović i dr Jovanki Miljuš-Đukić zahvaljujem na sugestijama prilikom uobličavanja teksta disertacije

Nabilu Galawenji zahvaljujem na pomoći prilikom aklimatizacije biljaka

dr Branki Vinterhalter i dr Angelini Subotić, kao rukovodiocima projekata, zahvalan sam na podršci i razumevanju

zahvalan sam svim kolegama koji su mi poklonili svoje prijateljstvo i time me, kao ljudsko biće, učinili bogatijim

mojim roditeljima beskrajno hvala za neizmernu i nesebičnu pomoć koja nijednog trenutka nije izostala

To live and die with no regrets. This is my only religion.

Milarepa (1052-1136)

Ekspresija gena za inhibitore cisteinskih proteinaza (*OCI* i *OCII*) u transformisanim biljkama krompira (*Solanum tuberosum* L.)

REZIME

Kombinovanje ili “slaganje” različitih gena u transgenim biljkama radi postizanja uspješnije kontrole patogena i štetočina i/ili većeg prinosa predstavlja jednu od glavnih oblasti istraživanja savremene biotehnologije. Orizacistatini I i II (*OCI* i *OCII*), proteinazni inhibitori različitih specifičnosti, pokazali su potencijal u kontroli štetočina koje koriste cisteinske proteinaze za digestiju proteina. Da bi se pojačao njihov inhibicioni potencijal i, eventualno, povećala efikasnost ovih inhibitora u kontroli štetočina, oba cistatina su koekspimirana u transformisanim biljkama tri sorte krompira. “Slaganje” orizacistatinskih gena kod sorti Dragačevka i Dezire ostvareno je postupkom ko-transformacije i zabeležena je frekvencija kointegracije *OCI* i *OCII* gena od 20-22%. Kod sorte Jelica sekvencijalna re-transformacija se pokazala kao efikasniji pristup: frekvencija integracije *OCII* gena nakon re-transformacije *OCI*-transformisane linije iznosila je 91%. Istovremeno, “slaganje” dva orizacistatinska gena, bilo postupkom ko- ili re-transformacije, postignuto je upotrebom *nptII* gena kao jedinog selekcionog markera. Ekspresija *OCI* i *OCII* gena indukovana povređivanjem i akumulacija biološki aktivnih rekombinantnih *OCI* i *OCII* proteina potvrđena je kod svih analiziranih *OCI/OCII* transformisanih linija krompira. *OCI/OCII* linije krompira nisu ispoljavale značajna odstupanja od normalnog fenotipa, što ukazuje na nizak nivo somaklonalnih varijacija i odsustvo uticaja rekombinantnih *OCI* i *OCII* na metabolizam biljke domaćina.

Iako nije uticala na preživljavanje, ishrana larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) listovima krompira koji ekspimiraju oba orizacistatina imala je značajan uticaj na različite osobine performanse rasta i razvića larvi. Larve hranjene transformisanim listovima su se presvlačile ranije, i tokom L2 i L3 stupnja uvećavale masu do 29,7% brže i konzumirale listove do 29,1% brže u odnosu na one hranjene netransformisanim listovima. Istovremeno, larve na *OCI/OCII* listovima su do tri dana ranije dostizale maksimum mase i ranije “usporavale” sa ishranom ulazeći u prepupalnu fazu razvića. Uprkos povećanju performansi rasta i ishrane, pri istoj efikasnosti ishrane, L4 larve na transformisanim listovima nisu u potpunosti uspele da kompenzuju negativne efekte prisustva orizacistatina u hrani. U odnosu na larve hranjene netransformisanim listovima, maksimalna masa na kraju larvenog razvića i ukupan stepen oštećenja listova bili su do 19,4% i do 18,5% manji kod larvi krompirove zlatice hranjenih *OCI/OCII* transformisanim listovima krompira. Smanjenje mase larvi na *OCI/OCII* listovima dovelo je i do pojave adulta krompirove zlatice sa do 26,3% redukovanom telesnom masom. Analiza ukupne proteinazne

aktivnosti kod larvi krompirove zlatice pokazala je inicijalno smanjenje digestivnog kapaciteta L3 larvi do 56%, koje je praćeno inhibicijom specifične aktivnosti cisteinskih proteinaza do 62% (akutni efekat). Sa druge strane, pri hroničnoj ingestiji OCI/OCII listova krompira, ukupna i aktivnost cisteinskih proteinaza kod L3 larvi ne pokazuje značajna odstupanja od kontrolnog nivoa, ukazujući na kompenzatorne odgovore proteaza larvi na prisustvo rekombinantnih orizacistatina u ishrani. Uočene promene u ishrani, rastu i razviću larvi krompirove zlatice mogu biti tumačene kao regulatorni odgovor kojim se postiže maksimum telesne mase uprkos prisustvu rekombinantnih inhibitora. Time se pokreću složene interakcije između ishrane, digestivnih procesa i regulatornih mehanizama rasta i razvića koje mogu da kompenzuju potencijalno smanjenje adaptivne vrednosti usled ishrane transformisanim listovima.

Ključne reči: „slaganje“ gena; ko-transformacija; re-transformacija; krompir; inhibitori cisteinskih proteinaza; orizacistatin I; orizacistatin II; otpornost prema insektima; krompirova zlatica; kompenzatorni odgovori insekata.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj : 577.21:635.21(043.3)

**Expression of cysteine proteinase inhibitor genes (*OCI* and *OCII*)
in transformed potato (*Solanum tuberosum* L.) plants**

ABSTRACT

The combination or stacking different genes in transgenic plants to achieve disease and pest control and/or higher crop yield is one of a major method of contemporary biotechnology. Oryzacystatins I and II (*OCI* and *OCII*), inhibitors with different specificity, show potential in controlling pests that utilize cysteine proteinases for protein digestion. To strengthen this inhibitory range and, possibly, achieve an additive effect in the overall efficiency of these proteins against pests, both cystatins were co-expressed in three potato cultivars. Oryzacystatin genes pyramiding in Dragačevka and Desiree cultivars were achieved by co-transformation with *OCI* and *OCII* genes co-integration frequency of 20-22%. For Jelica cultivar sequential re-transformation was more efficient approach: *OCII* gene integration frequency following re-transformation of an *OCI*-expressing line was 91%. Additionally, pyramiding of different oryzacystatin genes, by co- or re-transformation approach, were achieved using the *nptII* gene as the only selection marker. Wounding induction of *OCI* and *OCII* gene transcripts and accumulation of biologically active *OCI* and *OCII* recombinant proteins was confirmed in all analyzed *OCI/OCII* transformed lines. *OCI/OCII* potato lines did not exhibit morphological abnormalities, indicating low level of somaclonal variation or interference of the recombinant *OCI* or *OCII* with host plant metabolism.

In the absence of significant mortality, feeding Colorado potato beetle larvae (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on *OCI/OCII*-expressing foliage had an impact on various aspects of the growth and developmental performances of larvae. Larvae feeding on transformed potato leaves tended to molt earlier and, especially during L2-L3 stages, gain weight up to 29.7% faster and consume leaf material up to 29.1% faster, compared to those on untransformed foliage. Larvae on *OCI/OCII* foliage were also reach maximum weight gained three days earlier and slow down earlier in preparation for pupation. Despite their faster growth and feeding, with similar efficiencies of conversion of ingested food, L4 larvae reared on transformed foliage were not compensating presence of the recombinant oryzacystatins in the diet. Compared to those on untransformed foliage, maximum weight gained and amount of foliage consumed were up to 19.4% and 18.5%, respectively, lower for the larvae fed on *OCI/OCII* potato foliage. Larval weight reduction on *OCI/OCII* foliage resulted in adult emergence with up to 26.3% reduced body mass. Analysis of total digestive proteinases activity showed initially, up to 56%, reduction in digestive capacity

of L3 potato beetle larvae, accompanied with inhibition of cysteine proteinase specific activity up to 62% (acute effect). However, by continual ingestion of OCI/OCII potato foliage total and cysteine proteinases specific activities were at control level, suggesting compensatory responses of larvae protease system to the presence of recombinant oryzacystatins in the diet. The observed alterations in larval feeding and growth performance can be interpreted as regulatory responses aimed at stabilizing the final body weight despite presence of the recombinant inhibitors. These changes can trigger complex interactions between feeding, food processing and growth regulatory mechanisms, which tend to compensate for the potential fitness loss caused by feeding on transformed foliage.

Key words: gene stacking; co-transformation; re-transformation; potato; cysteine proteinase inhibitors; oryzacystatin I; oryzacystatin II; insect resistance; Colorado potato beetle; insect compensatory response.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 577.21:635.21(043.3)

SADRŽAJ

| | strana |
|---|-----------|
| SKRAĆENICE | |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.) | 2 |
| 1.1.1. Poreklo i istorijat | 3 |
| 1.1.2. Proizvodnja krompira u Srbiji | 4 |
| 1.1.3. Propagacija | 4 |
| 1.1.4. Genetika krompira | 5 |
| 1.2. Konvencionalni metodi oplemenjivanja krompira | 5 |
| 1.3. Moderne metode oplemenjivanja krompira | 6 |
| 1.3.1. Uklanjanje virusa | 6 |
| 1.3.2. Mikropropagacija | 7 |
| 1.3.3. Regeneracija | 7 |
| 1.4. Genetičko inženjerstvo biljaka | 8 |
| 1.4.1. Transfer gena posredovan bakterijom <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 9 |
| 1.5. Genetičke transformacije krompira (<i>Solanum tuberosum</i> L.) | 12 |
| 1.5.1. Ciljevi biotehnologije krompira | 13 |
| 1.6. Krompirova zlatica <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say) | 15 |
| 1.6.1. Životni ciklus | 15 |
| 1.6.2. Kontrola širenja krompirove zlatice | 17 |
| 1.7. Odgovor biljaka na napad insekata | 19 |
| 1.8. Geni za povećanje otpornosti prema insektima | 21 |
| 1.8.1. Geni poreklom iz mikroorganizama | 22 |
| 1.8.2. Geni poreklom iz insekata i drugih animalnih izvora | 23 |
| 1.8.3. Geni poreklom iz viših biljaka | 23 |
| 1.9. Biljni proteinazni inhibitori | 24 |
| 1.9.1. Inhibitori serinskih proteinaza | 25 |
| 1.9.2. Inhibitori aspartatnih i metalo-proteinaza | 25 |
| 1.9.3. Inhibitori cisteinskih proteinaza | 25 |
| 1.9.4. Mehanizam delovanja biljnih PI | 27 |
| 1.9.5. Biljke transformisane genima za inhibitore proteinaza | 29 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1.10. | Adaptivne strategije insekata | 31 |
| 1.11. | Strategije “slaganja” gena | 33 |
| 1.11.1. | Ukrštanje kao metod “slaganja” transgena | 34 |
| 1.11.2. | Sekvencijalna transformacija | 35 |
| 1.11.3. | Ko-transformacija | 36 |
| 1.12. | Multitrofični uticaj PI-transgenih biljaka | 37 |
| 1.12.1. | Neciljni organizmi | 37 |
| 1.12.2. | Interakcije <i>in planta</i> | 39 |
| 1.13. | Perspektive | 39 |
| 2. | CILJEVI RADA | 42 |
| 3. | MATERIJAL I METODE | 43 |
| 3.1. | Biljni materijal | 43 |
| 3.2. | Hranljive podloge | 43 |
| 3.2.1. | Osnovna podloga | 43 |
| 3.2.2. | Podloge za indukciju kalusa i regeneraciju izdanaka | 43 |
| 3.3. | Indukcija kalusa i regeneracija izdanaka | 45 |
| 3.4. | Metode sterilizacije | 45 |
| 3.5. | Uslovi gajenja | 45 |
| 3.6. | Transformacija pomoću <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 46 |
| 3.6.1. | Konstrukti korišćeni za transformaciju | 46 |
| 3.6.2. | Podloge za rast bakterija | 47 |
| 3.6.3. | Ko-transformacija biljnog tkiva | 47 |
| 3.6.4. | Re-transformacija biljnog tkiva | 48 |
| 3.6.5. | Parametri regeneracije transformisanih izdanaka | 49 |
| 3.7. | Verifikacija uspešnosti transformacije | 49 |
| 3.7.1. | Izolacija genomske DNK | 49 |
| 3.7.2. | PCR amplifikacija | 50 |
| 3.8. | Verifikacija genske ekspresije | 52 |
| 3.8.1. | Izolacija RNK | 52 |
| 3.8.2. | RT-PCR analiza | 53 |
| 3.9. | Analiza rekombinantnih proteina | 55 |
| 3.9.1. | Izolacija proteina | 55 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 3.9.2. | SDS-PAGE i imunoblot | 56 |
| 3.9.3. | Kvantitativna analiza aktivnosti rekombinantnih proteina | 58 |
| 3.10. | Morfološke karakteristike transformisanih linija krompira | 59 |
| 3.11. | Biotest sa larvama krompirove zlatice | 59 |
| 3.11.1. | Dizajn biotesta | 60 |
| 3.11.2. | Parametri rasta i razvića insekata | 60 |
| 3.11.3. | Analiza podataka | 61 |
| 3.11.4. | Analiza proteolitičke aktivosti | 62 |
| 3.12. | Obrada podataka | 64 |
| | | |
| 4. | REZULTATI | 65 |
| 4.1. | Ko-transformacija sojevima <i>A. tumefaciens</i> koji nose <i>OCI</i> i <i>OCII</i> gen | 65 |
| 4.1.1. | Indukcija kalusa i regeneracija pupoljaka | 65 |
| 4.1.2. | PCR analiza potencijalnih ko-transformanata | 69 |
| 4.2. | Re-transformacija <i>OCI</i> transformisane linije sa <i>OCII</i> genom | 71 |
| 4.2.1. | Transformacija pomoću <i>A. tumefaciens</i> koji nosi <i>OCI</i> gen | 71 |
| 4.2.2. | Re-transformacija <i>OCI</i> linije sa <i>A. tumefaciens</i> koji nosi <i>OCII</i> gen | 72 |
| 4.2.3. | PCR analiza potencijalnih re-transformanata | 75 |
| 4.3. | RT-PCR analiza <i>OCI/OCII</i> linija krompira | 76 |
| 4.4. | Analiza rekombinantnih <i>OCI</i> i <i>OCII</i> proteina u transformisanim linijama krompira | 77 |
| 4.4.1. | Imunološka detekcija rekombinantnih <i>OCI</i> i <i>OCII</i> | 77 |
| 4.4.2. | Analiza inhibitorne aktivnosti rekombinantnih <i>OCI</i> i <i>OCII</i> | 78 |
| 4.5. | Morfološke karakteristike <i>OCI/OCII</i> linija krompira | 80 |
| 4.6. | Biotest sa larvama krompirove zlatice (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say) | 84 |
| 4.6.1. | Trajanje razvića | 89 |
| 4.6.2. | Parametri rasta larvi | 90 |
| 4.6.3. | Parametri ishrane larvi i stepen oštećenja listova | 95 |
| 4.6.4. | Analiza digestivnih proteinaza | 99 |
| 4.6.5. | <i>OCII</i> vs <i>OCI/OCII</i> | 99 |
| | | |
| 5. | DISKUSIJA | 102 |
| 5.1. | Ko-transformacija sojevima <i>A. tumefaciens</i> koji nose <i>OCI</i> i <i>OCII</i> gen | 106 |
| 5.2. | Re-transformacija <i>OCI</i> linije krompira sorte Jelica sa <i>OCII</i> genom | 109 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 5.3. | RT-PCR analiza OCI/OCII transformisanih linija krompira | 113 |
| 5.4. | Analiza rekombinantnih proteina | 115 |
| 5.5. | Morfološke karakteristike OCI/OCII linija krompira | 117 |
| 5.6. | Biotest sa larvama krompirove zlatice (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say) | 121 |
| 5.6.1. | Uticaj rekombinantnih OC na preživljavanje larvi krompirove zlatice | 123 |
| 5.6.2. | Trajanje razvića | 124 |
| 5.6.3. | Parametri rasta i ishrane larvi | 125 |
| 5.6.4. | Analiza digestivnih proteinaza | 128 |
| 5.6.5. | Krajnja telesna masa larvi i adulta krompirove zlatice | 132 |
| 6 | ZAKLJUČCI | 139 |
| 7 | LITERATURA | 141 |
| | BIOGRAFIJA AUTORA | 233 |
| | Prilog 1 – Izjava o autorstvu | |
| | Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije | |
| | Prilog 3 – Izjava o korišćenju | |

SKRAĆENICE

| | |
|-----------------|---|
| BAP | – 6-benzil-aminopurin |
| CIM | – podloga za indukciju kalusa |
| CTAB | – cetiltrimetilamonium bromid |
| DEPC | – diethyl pirocarbonat |
| DNK | – dezoksiribonukleinska kiselina |
| dNTP | – 2'-dezoksi-nukleozid-5'-trifosfat |
| GA ₃ | – gibberelna kiselina |
| MS | – hranljiva podloga po Murashige i Skoog-u (1962) |
| NAA | – 1-naftil-sirćetna kiselina |
| OCI | – orizacistatin I |
| OCII | – orizacistatin II |
| PCR | – reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PI | – inhibitor proteinaza |
| pin2p | – promotor proteaznog inhibitora II iz krompira |
| PMSF | – fenilmetilsulfonil florid |
| PVP | – polivinilpirolidon |
| RIM | – podloga za indukciju korenova |
| RNK | – ribonukleinska kiselina |
| SDS | – natrijum dodecil sulfat |
| SIM | – podloga za indukciju izdanaka |
| Tris | – trisaminometan |

1. UVOD

Nekontrolisana i učestala upotreba sintetičkih pesticida u poslednjih 50 godina dovela je do zagađenja okoline, razvijanja otpornosti insekata na pesticide, drastičnog smanjenja populacija korisnih insekata i, što je najvažnije, negativno je uticala na zdravlje ljudi kao i na druge organizme. Ekonomski troškovi hemijske kontrole i narušavanje prirodne sredine nametnuli su potrebu za bezbednijim i efikasnijim načinima kontrole štetočina u agronomski važnim ekosistemima.

Sa druge strane, biljke su, tokom koevolucije sa herbivornim insektima, razvile efikasne mehanizme zaštite sintetišući različite sekundarne metabolite i inhibitore enzima koji su toksični za insekte i patogene. Identifikacija ovih gena i poznavanje puteva njihove regulacije, zajedno sa razvojem molekularne biologije i biotehnologije, omogućilo je dobijanje transgenih biljaka povećane otpornosti prema štetočinama.

Ipak, u nekim slučajevima uspešnost kontrole štetočina i patogena pomoću jednog transgena je pokazala ograničeni uspeh obzirom da je evolucija adaptivnih strategija insekata dovela do pojave rezistentnosti. Od svih strategija za povećanje opsega zaštite biljaka i izbegavanje ili odlaganje pojave rezistentnosti među insektima - introdukcija i koekspresija nekoliko različitih transgena našla je najveću praktičnu primenu.

1.1. Krompir (*Solanum tuberosum* L.)

Klasifikacija:

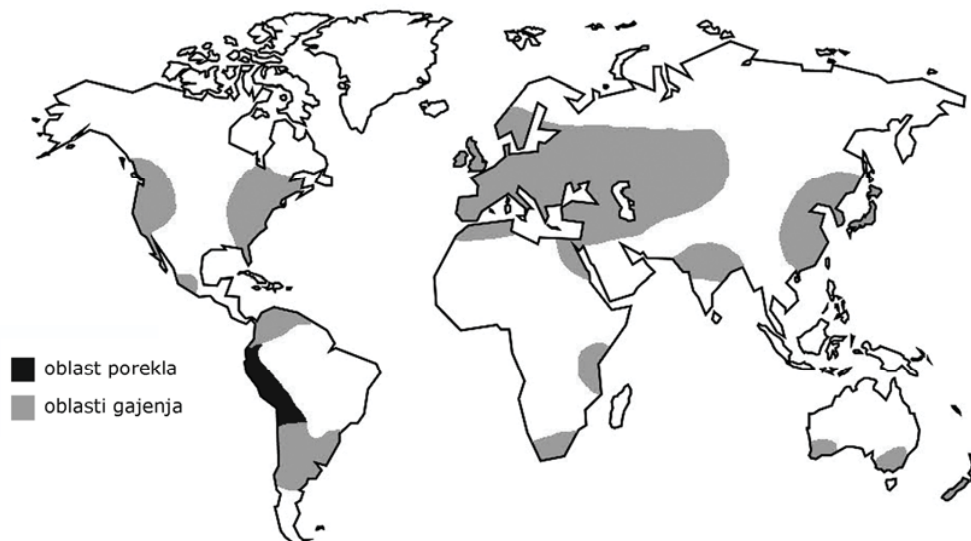
| | |
|----------|--|
| Carstvo | Plantae |
| Razdeo | Magnoliophyta |
| Klasa | Magnoliopsida |
| Podklasa | Asteridae |
| Red | Solanales |
| Familija | <i>Solanaceae</i> |
| Rod | <i>Solanum</i> L. |
| Vrsta | <i>Solanum tuberosum</i> L. (eng. <i>Irish potato</i>) |

Krompir je, od biljaka gajenih za ljudsku ishranu, jedan od najznačajnijih poljoprivrednih useva i nalazi se na četvrtom mestu po proizvodnji (posle pšenice, pirinča i kukuruza) i petom po površini zemljišta pod ovom kulturom (*FAOSTAT*, 2006). Iako je biljka hladnih i vlažnih klimatskih uslova, temperaturnog optimuma 15-20°C za većinu kultivara, danas se krompir uspešno gaji i u umerenim, suptropskim i tropskim regionima (Slika 1.1).

Za ljudsku ishranu, krtola je najznačajniji deo biljke i predstavlja odličan izvor ugljenih hidrata, minerala i vitamina. Čine je oko 80% vode i 20% organskih materija i ima visoku nutritivnu vrednost (oko 90 Kcal/100 gr sveže mase). Od organskih materija 85% je skrob a ostatak su proteini, koje čine više od 20 aminokiselina, a među njima 8 su esencijalne. Dobar je izvor vitamina kao što su niacin, riboflavin, tiamin i vitamin C, sadrži minerale kao što su kalcijum, gvožđe, fosfor, kalijum i sumpor, i bogata je antioksidantima koji se povezuju sa mnogim povoljnim uticajima na ljudsko zdravlje - uključujući smanjenje rizika od srčanih oboljenja, nekih tipova kancera i katarakte (*Brown*, 2005). Kao i gotovo sve *Solanaceae* krompir sadrži i izvesnu količinu toksičnih steroidnih glukoalkaloida (obično α -solanin i α -hakonin), koja je, za razliku od divljih vrsta krompira, kod komercijalnih kultivara na veoma niskom nivou i ne prelazi 2% (*Friedman*, 2006).

Značajni ekonomski gubici u proizvodnji krompira posledica su velikog broja patogena i štetočina: preko 60 vrsta insekata, oko 10 nematoda, 11 virusa, 6 bakterija i preko 20 gljivičnih patogena (*OCDE: Environmental Health and Safety Publications*, 1997).

Ukoliko nisu kontrolisani, oštećenja koja predatori i patogeni mogu naneti biljkama krompira, mogu biti toliko ozbiljna da uzrokuju potpuni gubitak prinosa.



Slika 1.1. Oblasti gajenja krompira. Krompir se najviše konzumirao u Evropi, Severnoj Americi i bivšim Sovjetskim Republikama do 1990-tih, kada su potrošnja i proizvodnja naglo porasle u zemljama Azije, Afrike i Latinske Amerike. Danas, Evropa i Azija predstavljaju najveće proizvođače krompira, sa više od 80% svetske produkcije, a Azija potroši skoro polovinu svetskih zaliha krompira. Krompir se gaji u preko 150 zemalja i preko bilion ljudi u svetu jede krompir (<http://www.potato2008.org/>). Slika je preuzeta sa <http://www.biologie.uni-hamburg.de> i adaptirana.

1.1.1. Poreklo i istorijat

Krompir potiče iz regiona južnoameričkih Anda, verovatno sa teritorije današnje Bolivije, Čilea i Perua, gde se gaji unazad najmanje 2000 godina (Smith, 1977). Naziv krompir (eng. *potato*) vodi poreklo od haićanske reči *batata*, naziva za slatki krompir (*Ipomea batatas*). I španski i engleski istraživači su sredinom XVI veka u Evropu doneli lokalni južnoamerički kuitivar Andigenu (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), koja se smatra pretkom današnjeg krompira (*Solanum tuberosum* ssp *tuberosum*; Solomon & Barker, 2001). Početkom XVII veka počinje uzgajanje krompira u Engleskoj i Irskoj, da bi danas krompir postao jedan od najznačajnijih useva u svetskoj proizvodnji hrane. U Srbiju krompir je doneo Dositej Obradović 1804. godine.

1.1.2. Proizvodnja krompira u Srbiji

Agroekološki uslovi u našoj zemlji povoljni su za proizvodnju krompira tako da se krompir nalazi među vodećim ratarskim kulturama u Srbiji. Ipak, u poređenju sa, na primer, Holandijom ili Italijom, naša proizvodnja je za 4-10 puta manja. Razlozi za to su nizak nivo agrotehnike, pošto se krompir kod nas uglavnom gaji na manjim parcelama, kao i izostavljanje navodnjavanja ove kulture (navodnjava se 1% zemljišta pod krompirom). Sortiment proizvodnje je, takođe, nepovoljan. U proizvodnji se nalazi oko 10 inostranih sorti od kojih sorta Dezire zauzima u pojedinim godinama i do 80% površine. I semenarstvo je na niskom nivou, i zadovoljava oko 5% potreba. Preostale površine se uglavnom zasejavaju semenskim krompirom lošeg ili neproverenog kvaliteta, čiji je potencijal 30-50% ispod genetskog potencijala zdravog semenskog krompira. Krompir se u našoj zemlji najviše troši za ljudsku ishranu, a samo se 3-4% preradi u prehrambene proizvode. Srbija se retko, izuzev kada su rodne godine, pojavljuje kao izvoznik krompira, ali se zato sve češće pojavljujemo kao njegov uvoznik. Problem proizvodnje dovoljnih količina za domaće potrebe može se prevazići sadnjom kvalitetnog semena otpornog prema raznim stetocinama što bi, uz adekvatnu agrotehniku, obezbedilo porast prinosa približan razvijenim zemljama. Time bi se stvorili i uslovi za razvoj industrijske prerade krompira i izvoz.

1.1.3. Propagacija

Komercijalni i najzastupljeniji metod propagacije krompira jeste propagacija vegetativnim putem, odnosno putem krtole. Za razliku od propagacije preko pravog semena, koje poseduje visoku varijabilnost, propagacija preko semenskih krtola daje visoku uniformnost biljaka. Takođe, za mnoge komercijalne kultivare, koje karakteriše sterilnost, to je ujedno i jedini način razmnožavanja. Propagacija vegetativnim putem istovremeno je i način za prenos bolesti sa jedne generacije na drugu. Virusne, bakterijske i glivične bolesti donose velike ekonomske gubitke, pa je količina hemijskih sredstava za njihovu kontrolu (pesticidi/fungicidi) u gajenju krompira, na godišnjem nivou, veća nego za bilo koji drugi usev. Danas, ovi troškovi postaju ograničavajući

faktor u proizvodnji krompira, koja je u poslednje tri dekade zabeležila rast veći nego bilo koja druga gajena biljna vrsta.

1.1.4. Genetika krompira

Krompir poseduje serije nivoa ploidije, čija je osnova haploidni broj 12, počev od diploida ($2n=24$), pa do heksaploida ($6n=72$). Varijacije uključuju ne samo divlje sorte centranog dela Južne Amerike, Meksika i južnog dela Severne Amerike već i mnoštvo lokalnih kultivara gajenog krompira, kao i veliki broj hibrida komercijalnih i divljih sorti (Ross, 1986). Komercijalni kultivari su autotetraploidi ($2n=4x=48$), sa 4 seta sličnih alela (Hawkes, 1994), a njihova selekcija za važne poligenske osobine je usmeravana ka što većoj heterozigotnosti. Tako, na primer, bujnost i prinos autotetraploida su visoko zavisni od diverziteta genskih lokusa (Bingham, 1983; Hermsen, 1984; Bonierbale i sar. 1993). Genetičke studije i ukrštanje krompira su, usled tetrasomatičkog modela nasleđivanja, naporan posao (Carputo i sar. 2010), dodatno otežan različitim nivoima sterilnosti i samo- ili unakrsnoj- inkompatibilnosti (Gopal & Khurana, 2006).

1.2. Konvencionalni metodi oplemenjivanja krompira

Počev od 1800-te pa do danas, ukrštanje krompira, usled genetičke kompleksnosti i poliploidije, težak je i dugotrajan posao. U poređenju sa drugim kulturama, konvencionalni metodi ukrštanja nisu baš uspešni: dobijanje novog varijeteta zahteva 12-15 godina rada a rezultat su obično samo jedna ili dve linije sa željenim karakteristikama. Takođe, teško je dalje predvideti da li će nove linije biti komercijalno uspešne ili ne. Ipak, neke od njih, kao npr. *Bintje* u Holandiji i *Russet Burbak* u USA, dominiraju tržištem u poslednjih 80 godina. Istovremeno, iako divlje vrste i komercijalne sorte krompira, zajedno, predstavljaju izvor germplazme raznovrsniji nego za bilo koji drugi usev (Hanneman, 1989; Peloquin i sar. 1989; Hawkes, 1990) kao rezultat klonalne propagacije, “siromašna” genetička baza različitih sorti krompira dodatno otežava klasični pristup oplemenjivanja (Bradshaw & Mackay, 1994). I

uspešnost ukrštanja sa divljim srodnicima (*Solanum demissium*, *S. berthaultii*, *S. chacoense*, *S. polyadenium*, itd) koji predstavljaju izvore gena za otpornost na insekte i patogene ili gena za kvalitet tubera (*Hanneman*, 1989; *Spooner & Bamberg*, 1994; *Jansky*, 2000) je niska: mnoge hibridne sorte - usled znatnog smanjenja otpornosti posle nekoliko generacija, visokog nivoa alkaloida, neodgovarajućeg prinosa ili kvaliteta tubera - nisu komercijalizovane. Povrh svega, i inhibicija fertiliteta, koja kod krompira uključuje nekoliko različitih nuklearnih i citoplazmatičnih mehanizama (*Luu i sar.* 2000; *Santini i sar.* 2000; *Phumichai & Hosaka*, 2006), predstavlja ogromnu prepreku u njegovom ukrštanju.

1.3. Moderne metode oplemenjivaja krompira

Tehnike *in vitro* svoju primenu su našle u unapređenju proizvodnje krompira u svrhu mikropropagacije, eliminacije patogena, produkcije semena bez bolesti i konzervacije germplazme. Takođe, primena tehnika kulture tkiva može smanjiti vreme potrebno za dobijanje novog kultivara krompira sa više od 10 na 3-5 godina (*Struik & Wiersema*, 1999). Danas su metode biotehnologije kao što je genetički inženjering, oruđa koja mogu prevazići nedostatke klasičnih metoda ukrštanja i omogućiti dobijanje biljaka krompira sa željenim osobinama, a pritom, ne menjajući ostale "elitne" osobine polaznih varijeteta.

1.3.1. Uklanjanje virusa

Standardni metod za uklanjanje virusa za biljke kod kojih se propagacija odvija uglavnom vegetativnim putem je termoterapija kombinovana sa kulturom meristema. Na ovaj način, mogu se uspešno eliminisati mnogi virusi krompira (*Smith & Mellor*, 1970; *Šip*, 1972; *Faccioli*, 2001). Kulturom meristema dobijeni su semenski tuberi krompira bez mnogih virusa (npr. PLRV, PVX, PVY, PVA, PVM, PVS), čiji je prinos dvostruko, ili više, veći (*Nagib i sar.* 2003).

1.3.2. Mikropropagacija

Mikropropagacija je produkcija genetički uniformnih biljaka u kulturi *in vitro*. Krompir je među prvim vrstama gajenih biljaka uveden u kulturu *in vitro*, pre više od pola veka (*Stewart & Caplin*, 1951). Za mikropropagaciju krompira koristi se metod kulture pojedinačnog (ili više) nodusa, na kome se, na odgovarajućoj hranljivoj podlozi, pojavljuju izdanci. Protokoli mikropropagacije krompira generalno ne zahtevaju upotrebu biljnih regulatora rastenja, kulture izdanaka se spontano ožiljavaju, a indeks multiplikacije je visok (*Hussey & Stacey*, 1981; *Amirouche* i sar. 1985; *Miller et al.* 1985). Biljke dobijene od zdravog materijala, obično kulturom meristema, održavane i umnožavane metodama kulture tkiva, služe kao “banka” klonova za dalju komercijalnu i eksperimentalnu primenu.

1.3.3. Regeneracija

Uobičajeni vid regeneracije krompira je indirektna organogeneza, koja podrazumeva dve faze: dediferencijaciju i organogenezu. Regeneracija biljaka krompira u kulturi *in vitro* postiže se u jednom koraku, koristeći istu hranljivu podlogu za sve faze regeneracije (*Jarett* i sar. 1980; *Ahloowalia* i sar. 1982; *Kikuta & Okazawa*, 1982; *Keil* i sar. 1989; *Iapichino* i sar. 1991; *Hussain* i sar. 2005) ili pomoću dvostepene procedure - gde se na prvoj hranljivoj podlozi inicira formiranje kalusa, a na drugoj formiranje pupoljaka. Dvostepena procedura je superiornija od one u jednom koraku (*Webb* i sar. 1983; *Cingel* i sar. 2009) i, posebno ako predstavlja pre-transformacionu optimizaciju protokola regeneracije, metod je koji se najčešće koristi. Indukcija kalusa obično zahteva kombinaciju auksina i citokinina u hranljivoj podlozi, a za regeneraciju izdanaka najpovoljnija je kombinacija citokinina i giberelina (*Webb* i sar. 1983; *Wheeler* i sar. 1985; *Park* i sar. 1995; *Yaddav & Sticklen*, 1995; *Hansen* i sar. 1999; *Yee* i sar. 2001). Regenerativni potencijal krompira je fenomen prevashodno zavisan od genotipa i regeneracija različitih varijeteta daleko je od rutine i obično zahteva dodatne optimizacije u smislu izbora tipa polaznog eksplantata i količine i kombinacije regulatora rastenja. Tako, na primer, za istu kombinaciju regulatora rastenja i tip

eksplantata efikasnost regeneracije različitih sorti krompira se može kretati od 97% do 0% (*Wheeler* i sar. 1985; *Hansen* i sar. 1999).

Somatska embriogeneza takođe može biti put regeneracije kod krompira (*De Garcia & Martinez*, 1995; *Seabrook & Douglass*, 2001; *JayaSree* i sar. 2001; *Vargas* i sar. 2005; *Sharma & Millam*, 2004; *Sharma* i sar. 2007), ali, ipak, ovaj metod zahteva dodatna istraživanja pre nego što postane podesna opcija regeneracije.

1.4. Genetičko inženjerstvo biljaka

Tri decenije nakon početnog uspeha (*Herrera-Estrella* i sar. 1982), produkcija genetički transformisanih biljaka još uvek zauzima centralno mesto u eksperimentalnom izučavanju i biotehnologiji biljaka. Kombinacija genetičkog inženjeringa sa konvencionalnim programima oplemenjivanja omogućila je uvođenje korisnih osobina, pod kontrolom jednog ili više gena, u komercijalne biljke na jedan brži i ekonomski isplativiji način. Genetičkom manipulacijom povećan je prinos useva usled porasta otpornosti transgenih linija na abiotički stres, štetočine i patogene, a manipulacijom metaboličkih puteva postignuto je povećanje nutritivne ili industrijske vrednosti transgenih biljaka. Takođe, dizajnirane su “fabrike” biljnih ćelija koje proizvode visoke količine vakcina i različitih farmakološki značajnih jedinjenja, nutrienata ili drugih korisnih supstanci.

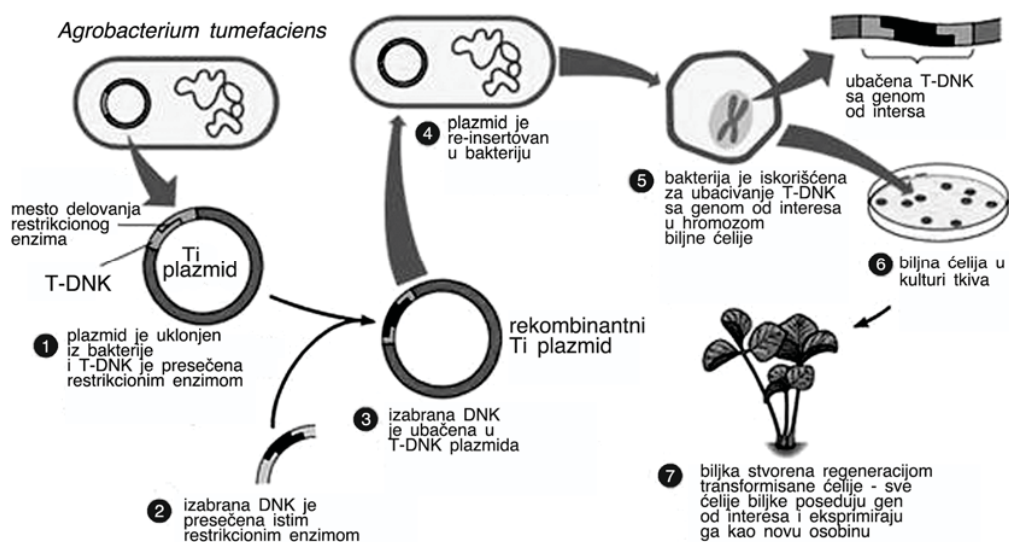
Iako danas postoje mnogobrojne metode za dobijanje transgenih biljaka, kao što su biolistička metoda (*Christou*, 1995; *Breitler* i sar. 2002), elektroporacija (*Shimamoto* i sar. 1989; *Salmenkallio-Marttila* i sar. 1995) transformacije pomoću PEG/lipozoma (*Sawahel*, 2001; *Daveya* i sar. 2005), silikon karbida (*Frame* i sar. 1994; *Nagatani* i sar. 1997), mikroinjektiranje hloroplasta (*Jones-Villeneuve* i sar. 1995; *Holm* i sar. 2000) ili transformacije *in planta* (*Bent*, 2000; *Trieu* i sar. 2000) - svaka sa svojim prednostima i nedostacima - transfer gena pomoću agrobakterija je ostao najrasprostranjeniji i “omiljeni” metod za introdukciju heterologih gena u genom biljaka (*Lorence & Verpoorte*, 2004; *Barampuram & Zhang*, 2011).

1.4.1. Transfer gena posredovan bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je patogen koji kod biljaka izaziva pojavu tumora (eng. *crown gall disease*) kao rezultat transfera, integracije i ekspresije posebnog seta T-DNK gena (eng. *transfer-DNA*, T-DNA), koji se nalaze na Ti (eng. *tumor-inducing*) plazmidu (Chilton, 2001; Binns, 2002). Geni virulentnosti (*vir* geni), smešteni na Ti plazmidu, indukuju se specifičnim signalima biljke i pokreću “mašineriju” Vir proteina koji ugrađuju T-DNK u genom domaćina. Uklanjanje bakterijskih gena unutar T-DNK ne sprečava transfer T-DNK u biljnu ćeliju, ali bakterija gubi sposobnost izazivanja tumora. Zamenom T-DNK gena koji su odgovorni za izazivanje tumora, drugim, izabranim sekvencama DNK, “razoružani” *A. tumefaciens* postaje idealno “vozilo” za prenos željenih gena. Kokultivacija biljnog tkiva sa “razoružanom” agrobakterijom dovodi do transformacije pojedinih biljnih ćelija, koje potom, mogu regenerisati celu transgenu biljku (Slika 1.2). *Agrobacterium* je jedini poznati organizam sposoban za potpuni transfer DNK između carstava živog sveta, transformišući uglavnom biljke ali, isto tako i druge eukariotske vrste, poput kvasaca (Bundock i sar. 1995; Van Attikum & Hooykaas, 2003), gljiva (Groot i sar. 1998; Gouka i sar. 1999) i ljudskih ćelija (Kunik i sar. 2001).

U većini sistema transformacije selektivni marker gen je integrisan u genom biljaka zajedno sa genom od interesa, kako bi se transformisane ćelije razdvojile od onih netransformisanih. Ovo je neophodno jer tokom transformacije samo malobrojne ćelije biljke prihvataju integraciju strane DNK, dok većina ostaje netransformisana - pa je, bez selekcije, verovatnoća identifikacije transgenih linija uzuzetno niska. Obično, kondiciono dominantni gen - koji nema uticaja na rast ili morfologiju biljke jer, najčešće, ostaje prisutan u genomu biljke nakon transformacije - koristi se kao selektivni marker. Većina selektivnih markera kodiraju proteine koji omogućavaju otpornost na antibiotike ili herbicide (Herrera-Estrella i sar. 1983; Bevan i sar. 1983). Ovi marker geni, poreklom iz mikroorganizama, istovremeno predstavljaju izvor strahovanja i poteškoća javnog prihvatanja i komercijalizacije transgenih biljaka (Goldstein et al. 2005). Ovi problemi se mogu rešiti biološki bezbednim i po okolinu neškodljivim selektivnim markerima (Sundar & Sakthivel, 2008; Wei i sar 2012), ali ipak, u većini sistema transfera gena, otpornost na antibiotike je zbog visoke efikasnosti najčešći

metod selekcije. Eliminacija “tradicionalnih” marker gena iz genoma biljaka nakon selekcionarne faze transformacije trenutno predstavlja važan pravac razvoja biotehnologije biljaka (Natarajan & Turna, 2007; Darbani i sar. 2007; Ramana Rao i sar. 2011). Istovremeno, i razvijanje novih selektivnih markera (Ferradini i sar. 2011b) i direktno dobijanje transformisanih biljaka bez marker gena (Liu i sar. 2011) i dalje su atraktivne oblasti istraživanja molekularne biologije biljaka.



Slika 1.2. Šematski prikaz transfera gena pomoću *Agrobacterium tumefaciens*. Slika je preuzeta sa <http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org> i adaptirana.

Postizanje željene ekspresije introdukovano, stranog gena u biljnoj ćeliji još uvek predstavlja izazov. Nivo ekspresije gena, jednim delom, funkcija je promotora pripojenog kodirajućem regionu gena. Upotreba najpopularnijeg promotora u istraživanjima molekularne biologije biljaka, 35S promotora mozaičnog virusa karfiola (eng. *cauliflower mosaic virus*, CaMV), obično dovodi do konstitutivne produkcije transgenog proteina u količini $\leq 1\%$ od ukupnih proteina. Stvaranje “pojačanog” 35S CaMV promotora (Fang i sar. 1989) ili drugih “super-promotora” (Ni i sar. 1995) može omogućiti i stostruko povećanje ekspresije u odnosu na onu koja se može postići sa 35S CaMV. Sa druge strane, mogućnost “utišavanja” gena povezana sa snažnom konstitutivnom ekspresijom kao i narastanje pitanja o biološkoj bezbednosti transgenih organizama, posebno u slučaju gena koji kodiraju produkte za povećanje otpornosti biljaka, nameću potrebu za postizanjem odgovarajućeg nivoa ekspresije gena samo u

pojednim delovima biljke - i prostorno i vremenski. Razvoj tkivno specifičnih i inducibilnih promotora za transgenu ekspresiju može zadovoljiti ove zahteve (*Potenza i sar. 2004*). Stoga, promotori koji vode ekspresiju transgena mogu biti deo rešenja kojim bi se minimalizovao potencijalno štetan uticaj transgenih biljaka na, na primer, korisne ili ne-ciljne organizme, a lokalizovana i ciljana genska ekspresija istovremeno može zadovoljiti regulative i umanjiti bojazni o biološkoj bezbednosti transgenih biljaka (*Kaiser, 2000; Taylor & Hefle, 2002*).

Ne postoji opšti protokol transfera gena u biljni genom. Svaka biljna vrsta i tip biljnog tkiva zahteva pažljivu karakterizaciju optimalnih uslova za transfer gena kako bi se postigla reproduktivnost i visoka efikasnost ekspresije transgena. Regeneracija cele biljke iz transformisane ćelije zahteva manipulaciju u uslovima kulture *in vitro*. Primenom različitih regulatora raste biljna ćelija se može vratiti u stanje totipotentnosti, a totipotentne ćelije koje su uspešno integrisale transgen mogu se, pod selektivnim uslovima, usmeriti na proliferaciju i regeneraciju. Ovaj sistem pokazuje visoku specifičnost u odnosu na genotip tako da je mnoge biljne vrste ili varijetete unutar iste vrste teško “navesti” na dediferencijaciju, embriogenezu ili regeneraciju. Istovremeno, transgene biljke dobijene u kulturi tkiva, osim osobine unete insercijom željenog gena, mogu ispoljiti i dodatna fenotipska i genotipska odstupanja od “roditeljskih” osobina. Ove varijacije mogu nastati usled mutacija indukovanih samom kulturom tkiva, insercijom transgena, plejotropnim efektom transgena ili kombinacijom ovih fenomena (*Wilson i sar. 2006*). Ovim poteškoćama, dodatno, doprinose i dva glavna “neprijatelja” transfera genetičkih informacija: velika varijabilnost nivoa ekspresije heterologne DNK i postepeno gubljenje ekspresije transgena - fenomen koji je označen kao utišavanje gena. Ove pojave se prevazilaze stvaranjem velikog broja transgenih linija u početnim fazama transformacije, od kojih se selektuje nekoliko linija sa željenim fenotipom i visokom i stabilnom ekspresijom transgena. Takođe, razvoj protokola transformacije koji zaobilaze ili minimalizuju potrebu za kulturom tkiva može umanjiti učestalost pojave netipičnih transgenih biljaka (*Hansen i sar. 1999; Lorence & Verpoorte, 2004*).

1.5. Genetičke transformacije krompira (*Solanum tuberosum* L.)

Krompir je jedan od malobrojnih useva prirodno osetljiv na infekciju agrobakterijama, pa i prvi izveštaji o generisanju transgenih biljaka krompira posredstvom *Agrobacterium*-a (Ooms i sar. 1983, 1986, 1987; Horsch i sar. 1984; An i sar. 1986) datiraju sa samog početka "ere transformacije biljaka". Počev od tada, pa do današnjih dana, transformacija pomoću agrobakterija je ostala vodeći metod za integraciju gena u genom krompira.

Da bi sistem genetičke transformacije bio efikasan nije dovoljan samo podesan mehanizam za transfer heterologne DNK, već je neophodno razviti i brz i efikasan protokol regeneracije biljaka. Kokultivacija agrobakterija sa segmentima listova (An i sar. 1986; De Block, 1988; Sheerman & Bevan, 1988; Tavassa i sar. 1988; Visser i sar. 1989b; Douches i sar. 1998a,b; Rochasosa i sar. 1989; Wenzler i sar. 1989), indermodija (Visser i sar. 1989b; Newell i sar. 1991; Beaujean i sar. 1998) ili tubera (Sheerman & Bevan, 1988; Hoekema i sar. 1989) doveli su do uspešnog generisanja transgenih biljaka krompira. Većina od navedenih protokola transformacije/regeneracije su genotip-specifični i stoga nisu efikasni za sve kultivare, što je ograničilo njihovu upotrebu. Yadav i Sticklen (1995) su razvili visoko efikasan protokol regeneracije krompira za odsečke listova, koji je našao primenu u transformacionim procedurama usled adaptibilnosti različitim genotipovima krompira (Douches i sar. 1998b; Li i sar. 1999; Coombs i sar. 2002; Felcher i sar. 2003). Noviji protokoli ukazuju da eliminacija dediferencijacije ili skraćivanje kalusne faze može povoljno uticati na stopu regeneracije i smanjiti pojavu somaklonalnih varijacija, kojima je krompir prilično podložan (Gustafson i sar. 2006). Takođe, istraživanja uslova kulture *in vitro* koji utiču na transfer gena - tip eksplantata, pretretmani, gustina bakterijskih ćelija, vreme kokultivacije i izbor regulatora rasteinja - dovela su do usavršavanja protokola transformacije krompira (Kumar, 1995; Trujillo i sar. 2001; Barrell i sar. 2002; Banerjee i sar. 2006; Heeres i sar. 2006).

Uprkos širokoj upotrebi i opštoj primenljivosti, transformacija agrobakterijama je kod krompira, zapravo, redak događaj - koji se, pod neselektivnim uslovima, kreće između

0.2% i 4.5% od ukupnog broja regenerisanih izdanaka (*De Vetten* i sar. 2003). Selektivni marker gen za neomicin fosfotransferazu (*nptII*; *Bevan* i sar. 1983), koji transformisanom tkivu pruža otpornost na kanamicin i druge, njemu srodne antibiotike, je najčešće korišćen sistem selekcije za transformaciju krompira. Upotrebom ovog selektivnog gena efikasnost transformacije krompira može preći 80% (*Beaujean* i sar. 1998; *Cingel* i sar. 2010). Alternativno, geni koji pružaju otpornost na herbicide mogu biti korišćeni kao selekcionni marker prilikom transformacije krompira (*Andersson* i sar. 2003). Biološki bezbedni sistemi selekcije zasnivaju se na introdukciji sposobnosti korišćenja izvora ugljenika koje normalno biljka ne metaboliše i koji se akumulira do inhibitornog ili toksičnog nivoa. Tako je za krompir razvijen selekcionni sistem zasnovan na konverziji manoze (*Thorbjornsen* i sar. 2002; *Rung* i sar. 2004) ili na, na primer, detoksifikaciji 2-deoksiglukoze (*Kunze* i sar. 2001). Transgeni krompir bez marker gena je dobijen transformacijom pod neselektivnim uslovima i PCR metodom korišćenom za identifikaciju transgenih linija (*De Vetten* i sar. 2003).

1.5.1. Ciljevi biotehnologije krompira

U suštini, ciljevi biotehnologije biljaka nisu različiti od onih kojima teži klasično oplemenjivanje. Kod krompira oni se, grubo, mogu podeliti na strategije koje povećavaju prinos i kvalitet krtola, gde spada i produkcija jedinjenja za medicinsku, nutritivnu ili industrijsku upotrebu i na strategije povećanja otpornosti na biotički i abiotički stres gde spada i otpornost na insekte.

Razvoj kultivara krompira otpornih na insekte može značajno smanjiti upotrebu hemijskih insekticida u kontroli kako insekata koji služe kao vektori za viruse tako i onih koji napadajući listove i tubere smanjuju prinos. Kloniranje insekticidnih gena iz *Bacillus thuringiensis* (*cry* geni), njihov transfer i ekspresija u biljkama je opšte prihvaćena strategija razvijanja otpornosti na ciljnog insekta (*Bradley* i sar. 1995). Transgene linije krompira koje ekspimiraju *cryIII*A delta-endotoksin iz *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* pokazale su značajno povećanu otpornost na krompirovu zlaticu (*Adang* i sar. 1993; *Perlak* i sar. 1993), a *Bt*-transgeni kultivari krompira, među kojima su

dominirali *NewLeaf* varijeteti *Monsanto* korporacije (St. Louis, MO), komercijalizovani su u USA počev od 1996. Tako je GM krompir postao jedan od prvih useva koji se uobičajeno počeo koristiti za ljudsku ishranu. Potom, otpornost na krompirovu zlaticu kombinovana je sa otpornošću na viruse i komercijalni kultivari krompira *NewLeafPlus* i *NewLeafY* su se našli na tržištu 1998. Dodatna otpornost na viruse je donela dobrobit proizvođačima semena, a komercijalni uzgajivači su dobili veći prinos i smanjenje potrebe za insekticidima (*Thornton*, 2003). Iako komercijalno i agronomski uspešni, *NewLeaf* varijeteti povučeni su sa tržišta 2001, kada je deo industrije prerade krompira, usled javne zabrinutosti, prestao koristiti genetički modifikovane sirovine (*Kaniewski & Thomas*, 2004). Ekspresijom nekoliko različitih cry *Bt*-proteina postignuta je otpornost na *Phthorimaea operculella*, moljca tubera, glavne štetočine krompira u tropskim i suptropskim oblastima (*Douches* i sar. 1998b; *Mohammed* i sar. 2000; *Davidson* i sar. 2002a,b, 2004; *Meiyalaghan* i sar. 2005, 2006a,b; *Hagh* i sar. 2009; *Jacobs* i sar. 2009; *Kumar* i sar. 2010) i na *Helicoverpa armigera* (*Chakrabarti* i sar. 2000a). Ekspresija cry proteina obično vodi ka otpornosti prema ciljnom i njemu bliskim vrstama insekata, dok je uvođenje hibridnog delta endotoksina omogućilo istovremenu otpornost krompira na štetočine iz redova i Coleoptera i Lepidoptera (*Naimov* i sar. 2003). Strategije povećanja otpornosti nisu ograničene samo na ekspresiju bakterijskih endotoksina: ekspresijom proteaznih inhibitora (*Gatehouse* i sar. 1996; *Bell* i sar. 2001), lektina (*Down* i sar. 1996; *Gatehouse* i sar. 1997, 1999; *Birch* i sar. 1999) ili drugih insekticidnih proteina (*Cooper* i sar. 2009) dobijene su transgene linije krompira povećane otpornosti na neke od štetočina krompira. I drugi faktori otpornosti, kao što su glandularne trihome i leptinski glikoalkaloidi, mogu povećati nivo otpornosti, posebno ako se kombinuju sa odgovarajućim *Bt* genima (*Coombs* i sar. 2002; *Cooper* i sar. 2004; *Estrada* i sar. 2007).

1.6. Krompirova zlatica *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

Klasifikacija:

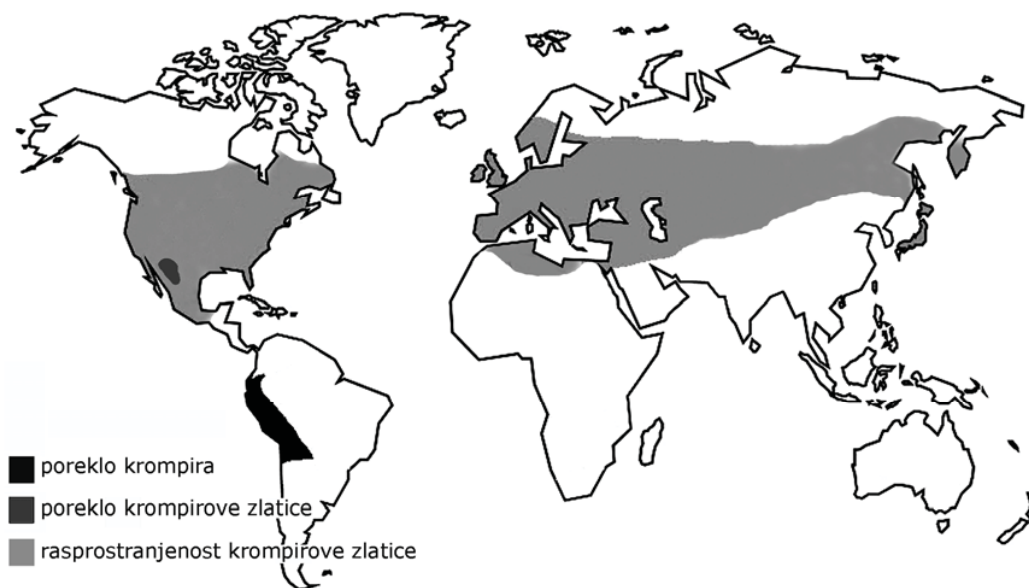
| | |
|----------|---|
| Carstvo | Animalia |
| Razdeo | Arthropoda |
| Klasa | Insecta |
| Podklasa | Pterygota |
| Red | Coleoptera |
| Familija | Chrysomelidae |
| Rod | <i>Leptinotarsa</i> |
| Vrsta | <i>decemlineata</i> (eng. <i>Colorado Potato Beetle</i> , CPB) |

Krompirovu zlaticu je otkrio T. Nuttall 1811, a T. Say je opisao 1824. godine. Iako nosi naziv *Colorado Potato Beetle*, insekt vodi poreklo iz centralnog Meksika, i prvobitno se hranio “divljim” biljkama roda *Solanum* (*S. rostratum* Dunal, *S. elaeagnifolium* Cavanilles, *S. angustifolium* Miler), da bi pre više od 150 godina osnovu ishrane prebacio na komercijalne kultivare krompira, što je, najpre, omogućilo ekspanziju insekta po Severno američkom kontinentu, a u prvoj polovini XX veka i po Evropi i Aziji (Slika 1.3).

Krompirova zlatica je oligofagni insekt. Danas, pored gajenih sorti krompira koje su glavni izvor hrane, opseg domaćina insekta obuhvata i plavi patlidžan i paradajz, kao i neke nekomercijalne *Solanaceae* (npr. beladona, bunika i tatula) u Evropi i Americi. Lokalne populacije insekta pokazuju sposobnost prilagođavanja opsega domaćina na dostupne biljke roda *Solanum*. Takođe, insekt se može hraniti i biljkama koje ne pripadaju familiji *Solanaceae* i koje se ne smatraju njegovim domaćinom (*Capinera*, 2001).

1.6.1. Životni ciklus

U zavisnosti od geografske širine, klime i količine hrane, krompirova zlatica može imati jednu (severne klimatske zone), dve ili tri (umerne klimatske zone), pa i do četiri (suptropske zone) generacije godišnje.



Slika 1.3. Geografska rasprostranjenost krompirove zlatice *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Trenutna geografska rasprostranjenost krompirove zlatice, glavne štetočine krompira severne hemisfere, obuhvata najmanje 14 miliona km², a insekt se, u Evropi i Aziji, veoma uspešno dalje širi na Istok i Sever prateći zone gajenja krompira i predstavlja potencijalnu pretnju gajenju krompira u Latinskoj Americi. Slika je adaptirana prema Fritz Geller-Grimm-u iz 2003 godine sa <http://de.academic.ru>.

Studije pokazuju da je vreme razvića jedne generacije, od jajeta do adulta, najmanje 21 dan pri temperaturnom optimumu od 25° do 30°C (Ferro i sar. 1985). Donja temperaturna granica embrionalnog razvića je 11,5 °C, a za larvene stadijume i lutke 9-11°C. Embrionalno razviće, u zavisnosti od temperature i vlažnosti, traje 4-9 dana. Nakon izleganja, larva se gotovo neprekidno hrani lišćem, pauzirajući jedino u toku presvlačenja. Razviće larve, u zavisnosti od temperature traje 2-3 nedelje. Obuhvata 4 stupnja, između kojih se larva presvlači. Larve prvog stupnja ostaju grupisane na mestu piljenja, hraneći se najpre ostacima jaja, a potom i listovima. Tokom drugog stupnja one se šire po biljci. Treći i četvrti stupanj prelaze na susedne biljke, nanoseći biljkama značajna oštećenja. Nekontrolisan, insekt može potpuno obrstiti biljke krompira, tako da produkcija tubera izostane.

Potpuno razvijena larva četvrtog stupnja se ukopava nekoliko cm u zemlju, ulazi u prepupalni stadijum koji traje najmanje koliko i četvrti larveni. Zatim sledi stadijum lutke, gde se, u toku 5-7 dana, lutka transformiše u adulta, završavajući metamorfozu.

Mladi adulti, zatim, izlaze iz zemlje i intenzivno se hrane tokom 6-20 dana. Ukoliko listovi nisu dostupni imago se može hraniti bilo kojim delom biljke krompira, uključujući i tuber. Insekti potom ulaze u dijapauzu, ili se, pre toga, pare i ženke polažu jaja za narednu generaciju. Parenje je višestruko i poligamno. Većina ženki, u toku 4-5 nedelja, u skupinama od 20 - 60, ukupno položi od 500 - 1000 jaja na naličje listova (*Peferoen i sar. 1981*).

Hibernalna dijapauza je izazvana kratkim danom krajem avgusta ili početkom septembra. Dostupnost i kvalitet hrane i temperatura su, takođe, faktori koji mogu indukovati dijapauzu (*De Wide i sar. 1981*). Na severnim geografskim širinama insekti se ukopavaju u zemlju, najčešće do oko 20 cm dubine, a ponekad i do 50 cm (*Lashomb i sar. 1984*), gde prezimljuju, dok u južnim delovima Severne Amerike adulti dijapauzu provode na površini zemlje (*Hsiao, 1985*). I Evropske i Američke populacije insekata pokazuju značajne geografske varijacije u indukciji dijapauze (*De Wide i sar. 1981; Hsiao, 1981*). Čak i unutar jedne populacije, pri optimalnim uslovima ishrane, mogu postojati ogromne varijacije u pogledu dijapauze i reprodukcije: insekti mogu ostati u dijapauzi dve ili više zima (*Biever i sar. 1990*) ili mogu imati više od jedne dijapauze (*Peferoen i sar. 1981*). Ženka, gotovo uvek, oplođena ulazi u hibernalnu dijapauzu tako da na proleće, krajem maja ili početkom juna, kada je temperatura zemljišta iznad 14°C, izlazi iz hibernacije i polaže jaja (*Ferro i sar. 1991*). Izlazak adulta nakon hibernacije nije sinhronizovan i može trajati tokom 1,5-2 meseca, usled nejednakog zagrevanja zemljišta i različite dubine ukopavanja insekata.

1.6.2. Kontrola širenja krompirove zlatice

Raznolikost i fleksibilnost životnog ciklusa, u zavisnosti od geografskog područja, kao i unutar lokalnih populacija, opseg domaćina i plastičnost odgovora na biotičke i abiotičke faktore krompirovoj zlatici daju status “superštetočine”. Insekt uzrokuje velike gubitke u prinosu krompira (često veće od 30%) i patlidžana, a nešto manje u slučaju paradajza. Potencijalno je opasan i za duvan, crvenu slatku i ljutu papriku, jagode i neke druge komercijalne *Solanaceae*.

Prva masovna upotreba hemijskih insekticida u agrikulturi bila je upravo za suzbijanje krompirove zlatice. Hemijska kontrola je bila efikasna sve do 1950-tih kada je insekt razvio otpornost na DDT (Hare, 1990). Počev od tada, insekt je vrlo brzo razvijao otpornost na različite klase novih insekticida koji su se sve učestalije primenjivali. Danas se, u razvijenim zemljama, najmanje 590000 kg aktivnih supstanci insekticida troši godišnje na kontrolu krompirove zlatice, a insekt pokazuje rezistentnost na sve registrovane sintetičke insekticide (Forgash i sar. 1985; Wegorek, 2002; Whalon i sar. 2007). Zato se poslednjih dekada, u okviru Programa integralne zaštite (eng. *Integrated Pest Management*, IPM), sve više pažnje usmerava ka biološkim, mehaničkim, biohemijskim i tradicionalnim metodama kontrole. Kombinacija ovih metoda predstavlja pokušaj da se na ekonomičniji, a po okolinu i ljudsko zdravlje bezbedniji način, obezbedi alternativa sintetičkim insekticidima.

Preventivne i biološke metode kontrole insekta podrazumevaju rotaciju useva (usev se sadi na istu površinu svake 4. godine) i teritorijalnu izolaciju površina pod krompirom (ili patlidžanom i paradajzom), defolijaciju biljaka krompira pre žetve i uklanjanje svih tubera sa polja. Takođe, sadnja useva *Solanaceae* u blizini šuma, livada i pašnjaka može obezbediti i prirodne neprijatelje krompirove zlatice.

Od prirodnih neprijatelja krompirove zlatice specijalizovani entomofagi žive jedino na Severno-američkom kontinentu. Introdukcija jednog od najvažnijih prirodnih neprijatelja krompirove zlatice, insekta *Perillus bioculatus* (Heteroptera: Pentatomidae) u Evropu nije dala očekivane rezultate (Jermy, 1980). U Evropi i Aziji poznate su neke polifagne predatorske, kao i parazitske vrste koje napadaju larve i jaja krompirove zlatice, među koleopterama, heliopterama, neuropterama, dipterama i himenopterama. Međutim gustina populacije ovih insekata na površinama pod krompirom nije dovoljna za značajniju kontrolu krompirove zlatice a nedovoljno znanje o njima dodatno ograničava mogućnost njihove upotrebe (O'Neil i sar. 2005; Greenstone i sar. 2010). Sađenje odgovarajućih pokrovnih biljaka između zasada krompira, može prirodnim neprijateljima krompirove zlatice obezbediti stanište i zajedno sa redukcijom upotrebe

pesticida širokog spektra povećati gustinu njihove populacije na površinama pod krompirom.

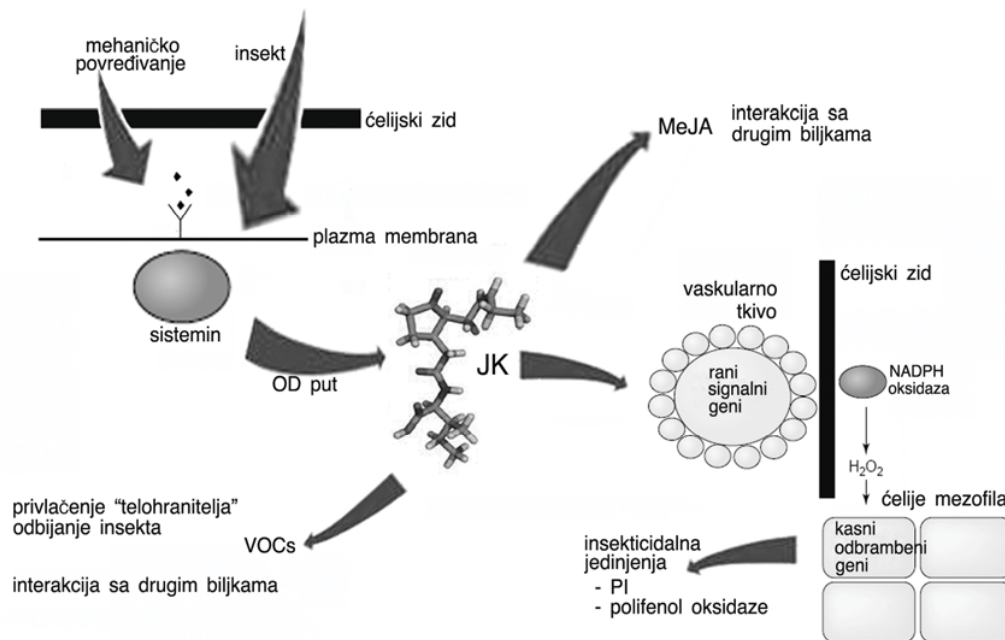
Toksini iz *Bacillus thuringiensis* (Bt), kao bioracionalni insekticidi, se trenutno najviše (više od 90% od svih biopesticida) koriste u programima kontrole krompirove zlatice (npr. M-One™, Novodor™). Konjukcija Bt sa drugim antifidantima smanjuje potrebnu koncentraciju endotoksina i, istovremeno, povećava njegovu efikasnost. Mikrospore gljivičnog patogena *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) su našle komercijalnu primenu kao biopesticid (npr. Mycotrol®) efikasan u kontroli krompirove zlatice (Lacey i sar. 1999). I mikrospore parazita *Nosema scripta* (Microsporida: Nosematidae) pokazuju potencijal u kontroli ovog insekta (Bauer & Pankratz, 1993).

Bosiljak, žalfija, mirođija i buhač - biljke koje se tradicionalno koriste za kontrolu insekata - mogu delovati kao repelenti. Tako, na primer, buhač, zasađen među biljkama krompra, od 60 do 100% smanjuje populaciju krompirove zlatice (Panasiuk, 1984). Insekticidi biljnog porekla, npr. limonoidi (Liu i sar. 1990; Mendel i sar. 1991; Murray i sar. 1995) i terpenoidi (Kaethner, 1992; Gonzalez-Coloma i sar. 1995; Ortego i sar. 1995), mogu istovremeno imati i toksični i repelentni efekat na krompirovu zlaticu. Zbog složenosti hemijske strukture mnogih antifidanata, sinteza ovih jedinjenja za komercijalnu upotrebu može biti ekonomski neisplativa, a njihovo prihvatanje od strane proizvođača usporeno, jer ova jedinjenja, u poređenju sa sintetičkim insekticidima, nemaju izraženi efekat "akutne smrtnosti".

1.7. Odgovor biljaka na napad insekata

Biljke poseduju bogat arsenal odgovora na napad herbivora, koji se mogu kategorisati kao direktna i indirektna odbrana i tolerancija (Kessler & Baldwin, 2001). Interakcija biljka-herbivora, na prostornoj skali, odigrava se kako na nivou biljke koja je napadnuta, tako i na nivou celokupne biljne zajednice a uključuje i "saveznike" biljaka iz populacije insekata.

I ishrana herbivora i mehaničko povređivanje, u kratkom vremenskom roku, indukuju odbrambeni odgovor koji je lokalizovan na mestu povrede i istovremeno obuhvata celu biljku. Sistemski odgovor posredovan je mobilnim signalima, koji mogu biti električne (Wildon i sar. 1992; Herde i sar. 1999), hidraulične (Malone & Alarcon, 1995) i/ili hemijske (Ryan, 2000) prirode. Kod paradajza proteinazni inhibitori (PI) su indukovani signalima koji se prostiru i kroz ksilem i kroz floem (Rhodes i sar. 1999), a ekspresija *pin2* (PI II) gena indukovana povređivanjem može biti posredovana električnim signalima, čija je propagacija povezana se signalnim putem abscisinske kiseline (Herde i sar. 1999). Oligopeptid sistemin je najbolje verifikovani primarni mobilni signal povređivanja kod *Solanaceae* (Orozco-Cardenas i sar. 1993; McGurl i sar. 1994; Ryan, 2000). Vezujući se za receptore ćelijske plazma membrane sistemin pokreće složenu signalnu kaskadu koja, preko jasmonske kiseline (JK) reguliše ekspresiju odbrambenih gena (Slika. 1.4).



Slika 1.4. Signalni put odgovora biljaka na povređivanje. Rani događaji detektovani nakon povređivanja uključuju promene fluksa jona preko plazma membrane, promene koncentracije Ca⁺ u citoplazmi, lokalno povećanje ROS (eng. *reactive oxygen species*, ROS: O₂ i H₂O₂) i promene fosforilacije proteina (De Bruxelles & Roberts, 2001). Ove promene vode ka generisanju signala koji regulišu ekspresiju odbrambenih gena: sistemin se oslobađa u vaskularni sistem i pokreće oktadekanoidni (OD) put biosintetize jasmonske kiseline (JK), koja aktivira gene signalnog puta u vaskularnim tkivima (rani geni). Rezultat je oslobađanje H₂O₂, koji kao sekundarni “glasnik” inicira ekspresiju odbrambenih gena (kasni geni), kao što su PI geni, u ćelijama mezofila (De Bruxelles & Roberts, 2001; Orozco-Cardenas i sar. 2001). Slika je adaptirana prema Ferry i saradnicima (2004).

Biljka razlikuje napad insekata i čisto mehančko povređivanje: nivo porasta JK indukovanog povređivanjem je multiplikovan u slučaju ishrane insekta. Pored indukcije direktne odbrane (sinteza PI i drugih odbrambenih jedinjenja) herbivore indukuju i indirektni vid odbrane biljke - sintezu isparljivih organskih jedinjenja (eng. *volatile organic compounds*, VOCs). Ovaj fenomen je povezan sa elicitorima u pljuvački insekata (*Frey* i sar. 2000; *Shen* i sar. 2000; *Schittko* i sar. 2001; *Halitschke* i sar. 2001) i jedna grupa VOCs deluje odbijajuće na herbivore, a druga privlači "telohranitelje" biljke - predatore i parazitoide insekta koji se hrani biljkom (*Dicke & Van Loon*, 2000; *De Moraes* i sar. 2001; *Halitschke* i sar. 2001; *Kessler & Baldwin*, 2002). Herbivorom indukovana VOCs emisija takođe može pokrenuti transkripciju odbrambenih gena kod susednih, nenapadnutih, biljaka (*Arimura* i sar. 2000; *Dicke* i sar. 2003; *Baldwin* i sar. 2006; *Kost & Heil*, 2006).

Napad herbivore najčešće izaziva istovremeno preplitanje nekoliko signalnih puteva - puteve JK, salicilne kiseline (SK) i etilena (*Reymond & Farmer*, 1998), čija interakcija dodatno oblikuje odgovor biljke prema vrsti napada (*Genoud & Metraux*, 1999; *Walling*, 2000; *De Vos* i sar. 2005).

Počev od prvog jasnog dokaza da su PI deo prirodnog odbrambenog odgovora biljke na napad insekta (*Green & Ryan*, 1972), napredak u razumevanju indukcije i mehanizama njegove regulacije, uporedo sa razvojem molekularne biologije i identifikacijom insekticidnih jedinjenja, doveo je do razmatranja potencijalne eksploatacije endogenih mehanizama otpornosti biljka za zaštitu komercijalnih useva.

1.8. Geni za povećanje otpornosti prema insektima

Sekundarni metaboliti biljaka koji pokazuju pesticidna svojstva podeljeni su u dve velike kategorije (*Gatehouse*, 1991): ne-proteinski metaboliti (alkaloidi, terpenoidi, neproteinske aminokiseline, izoflavonoidi, tanini, glukozinati, cijanidni glukozidi) i proteinski antimetaboliti (inhibitori proteinaza, inhibitori α -amilaza, lektini i arceni). Ukupan broj poznatih sekundarnih metabolita biljaka, nastalih kao evolutivni odgovor

na predatore i patogene, iznosi oko 200000 i to je, najverovatnije, tek deo svih koji postoje u prirodi (De Luca & St Pierre, 2000; Chehab i sar. 2008). Usled metaboličke cene sinteze sekundarnih metabolita svaka biljna vrsta proizvodi samo manji broj, ali jedinstvenu kombinaciju, ovih jedinjenja. Kako se, sa druge strane, skoro svaka vrsta insekata, koevoluirajući sa biljkama, specijalizovala adaptacijom na antimetabolite domaćina - introdukcija novih insekticidnih gena poreklom iz biljaka, kao i onih iz mikroorganizama ili animalnog porekla, postala je strategija povećanja otpornosti gajenih biljaka (Schuler i sar. 1998).

1.8.1. Geni poreklom iz mikroorganizama

Geni za kristalne proteine, prisutni u *Bacillus thuringiensis* (*Bt cry* geni) su prvi insekticidni geni introdukovani u transgeni biljku (Vaecck i sar. 1987), a počev od 1996, neke od *Bt*-transgenih biljaka, kao što su kukuruz, pamuk, krompir i pirinač su komercijalizovane (Krattiger, 1997). Identifikovano je više od 400 *cry* gena (Crickmore i sar. 2007), specifično toksičnih prema različitim redovima insekata. Biljke koje eksprimiraju *Bt*-toksine ne zahtevaju dodatnu aplikaciju hemijskih insekticida, a *Bt*-toksini ne pokazuju negativan uticaj na sisare i ptice ili je on minimalan (Goldberg & Tjaden, 1990). U humanom digestivnom sistemu *Bt*-proteini se ponašaju kao svaki drugi dijetarni protein i ne predstavljaju značajan rizik za ljudsko zdravlje (Mendelsohn i sar. 2003).

Osim *cry* nijedan drugi insekticidni gen nije “doživeo” komercijalnu primenu u transgenim biljkama. Najbliži komercijalizaciji su *vip* geni iz *B. thuringiensis* i *B. cereus* (Estruch i sar. 1996). Identifikovano je više od 50 *Vip* proteina (Crickmore i sar. 2007), a neki od njih pokazuju snažno insekticidno dejstvo prema nekoliko glavnih štetočina kukuruza i pamuka (Estruch i sar. 1996; Fang i sar. 2007). U Australiji *Vip*-pamuk je dobio licencu za ograničeno i kontrolisano gajenje (Crothers, 2006). I neki drugi mikrobijalni geni, na primer, *choM*, gen za holesterol-oksidadzu iz streptomiceta (Corbin i sar. 2001) i *tcdA* gen iz *Photobacterium luminescens* (Liu i sar. 2003), eksprimirani u biljkama pokazali su snažno insekticidno dejstvo.

1.8.2. Geni poreklom iz insekata i drugih animalnih izvora

Transgene biljke koje ekspimiraju gene za hitinaze (*Ding i sar. 1998a*), insekatske ili animalne proteazne inhibitore (*Thomas i sar. 1994, 1995; Christeller et al. 2002*), neuropeptide (*Rao i sar. 1996; Fitches i sar. 2002*) mogu imati agronomski potencijal u kontroli štetočina. Tako, na primer, avidin, biotin-vezujući protein iz belanceta kokošijeg jajeta, ekspimiran u kukuruzu, duvanu ili jabuci (*Kramer i sar. 2000; Burgess i sar. 2002; Markwick i sar. 2003*), pokazuje insekticidno dejstvo. Zbog relativno širokog spektra delovanja i zahvaljujući činjenici da je avidin u ljudskoj ishrani prisutan u nekoliko puta većoj koncentraciji nego u transgenim biljkama, u bliskoj budućnosti se može očekivati komercijalizacija avidin-transgenih useva (*Kereša i sar. 2008*).

1.8.3. Geni poreklom iz viših biljaka

Geni koji kodiraju proteinske antimetabolite, proteinazne inhibitore, inhibitore α -amilaze i lektine intezivno su korišćeni za transformaciji biljaka radi postizanja povećane otpornosti na insekte. Iako je nivo ekspresije ovih jedinjenja približan onom kod Bt-proteina, usled hroničnog, antinutritivnog dejstva, efekat u kontroli insekata je znatno slabiji (*Gatehouse, 1997*).

Inhibitori α -amilaze poreklom iz pšenice i pasulja, prisutni u veštačkoj dijeti, pokazali su toksičan efekat prema različitim insektima iz reda koleoptera i lepidoptera (*Gatehouse et al. 1986; Moreno & Chrispeels, 1989; Gutierrez i sar. 1993; Suzuki i sar. 1993*). Ovi nalazi su ohrabрили ekspresiju gena inhibitora - posebno α -AI-1 gena iz pasulja - koji je transgenom grašku i pirinču obezbedio visok nivo otpornosti na štetočine zrna (*Shade i sar. 1994; Morton i sar. 2000; Ignacimuthu & Arockiasamy, 2006; De Sousa-Majer i sar. 2007*). Toksičan efekat različitih lektina je pokazan za insekte redova Coleoptera i Lepidoptera (*Czalpa & Lang, 1990*), Diptera (*Eisemann i sar. 1994*), Homoptera (*Powell i sar. 1993*) i Hemiptera (*Yao i sar. 2003*). Lektin iz visibabe (*Galanthus nivalis* aglutinin, GNA) ekspimiran u duvanu, krompiru i pšenici, iako nije imao značajniji uticaj na preživljavanje, doveo je do smanjenja performansi ciljnih inskata (*Hilder i sar.*

1995; Down i sar. 1996; Stoger i sar. 1999), a lektin iz listova crnog luka sprečio je kolonizaciju transgene indijske slačice (Hossain i sar. 2006).

1.9. Biljni proteinazni inhibitori

Proteinazni inhibitori (PI) su grupa biljnih zaštitnih proteina koji učestvuju u reakciji na uslove stresa kao što su napad herbivora i patogena, mehaničke ozlede, UV ili temperaturni stres (Richardson, 1980; Ryan, 1990; Koiwa i sar. 1997). Mogu imati i druge funkcije - od tkivno specifične regulacije endogenih proteinaza (Brzin & Kidric, 1995), posebno u skladišnim organima kao što su seme ili tuber, pa do regulacije procesa programirane ćelijske smrti (Solomon i sar. 1999). U biljnim tkivima PI obično čine manje od 1% ukupnih solubilnih proteina, dok u semenu nekih biljaka njihova zastupljenost može biti i do 10%. Opisano je oko 500 PI izolovanih iz oko 130 biljnih vrsta (De Leo i sar. 2002). Većina potiče iz tri velike familije: *Leguminosae*, *Solanaceae* i *Gramineae* (Richardson, 1991) i prema tipu proteinaza koje inhibiraju (Tabela 1.1) klasifikovane su na serinske, cisteinske, aspartatne i inhibitore metaloproteinaza (De Leo i sar. 2002; Lawrence & Koundal, 2002).

Tabela 1.1. Klasifikacija proteinaza prema aminokiselinskom ostatku u aktivnom centru enzima (Bode & Huber, 1992).

| klasa proteinaza | aktivni centar | pH optimum | proteinaza |
|------------------|----------------|------------|--|
| serinska | Ser; His | 7 - 9 | Tripsin, Himotripsin, Elastaza, Katepsin G |
| cisteinska | Cys | 4 - 9 | Papain, Ficin, Bromelain, Ananin, Katepsin B, C, H, K, L, O, S i W |
| aspartatna | Asp | ispod 5 | Katepsin D i E, Renin, Pepsin |
| metalo | metalni jon | 7 - 9 | Karboksipeptidaze A i B, Aminopeptidaze |

1.9.1. Inhibitori serinskih proteinaza

Inhibitori serinskih proteinaza su univerzalno prisutni u carstvu biljaka i broj poznatih ili delimično okarakterisanih PI ove klase je ogroman. Dve najbolje opisane familije serinskih PI su *Bowman-Birk* (Suzuki i sar. 1987; Mulvenna i sar. 2005; Lin i sar. 2006) i *Kunitz* (Plunkett i sar. 1982; Park i sar. 2005; Ledoigt i sar. 2006; Azarkan i sar. 2006). *Bowman-Birk* inhibitori obično poseduju dva homologna domena, kojima, nezavisno i istovremeno, mogu interagovati sa istim ili različitim serinskim proteinazama (*Birk*, 1985; Raj i sar. 2002), dok *Kunitz* tip inhibitora pored serinskih može inhibirati i druge klase proteinaza (*Ritonja* i sar. 1990; Gruden i sar. 1997; Laing & McManus, 2002). Ostali serinski PI svrstani su u serpinsku, tikvinu, cerealnu/ α -amilaza, slačicinu, krompirovu I i II i druge familije (Haq i sar. 2004; Habib & Khalid, 2007).

1.9.2. Inhibitori aspartatnih i metalo-proteinaza

Inhibitori aspartatnih proteinaza su nedovoljno proučena klasa PI delimično usled slabe zastupljenosti među biljkama. Inhibitori katepsina D iz paradajza (*Werner* i sar. 1993) i tubera krompira (*Mares* i sar. 1989; *Ritonja* i sar. 1990) su jedini dobro okarakterisani proteinski inhibitori ove klase. Biljne inhibitore metalo-proteinaza predstavlja familija metalo-karboksipeptidaza iz paradajza i krompira (*Graham & Ryan*, 1981; *Hass & Ryan* 1980, 1983).

1.9.3. Inhibitori cisteinskih proteinaza

Super-familiju cisteinskih PI čine proteini funkcionalno i evolutivno srodni sa prvim opisanim inhibitorom cisteinskih proteinaza iz belanceta kokošijeg jajeta (eng. *chicken egg white cystatin*, CEWC; *Colella* i sar. 1989). Široko rasprostranjeni među mikroorganizmima, biljkama i životinjama - na osnovu molekularne strukture, podeljeni su u četiri familije - i označeni kao cistatini (*Oliveira* i sar. 2003). Animalni cistatini svrstani su u prve tri (stefinska, cistatinska i kininogenska) familije, a četvrta familija

cistatina - fitocistatini - obuhvata gotovo sve poznate inhibitore cisteinskih proteinaza biljnog porekla. Većina njih su mali jednonlančani peptidi (Tabela 1.2.) sa jednim domenom, veličine 12-16 kDa, izuzev multicistatina izolovanog iz tubera krompira (*Walsh & Strickland, 1993; Waldrom i sar. 1993*) i cistatina iz listova paradajza (*Botler, 1993; Wu & Haard, 2004*) koji poseduju do osam cisteinskih domena. Pored visoko konzerviranog motiva (QxVxG) centralnog segmenta (*Arai i sar. 1991*), inhibitorski kapacitet fitocistatina vezan je i za G-ostatak u N-terminalnom regionu inhibitora (*Urwin i sar. 1995a*) i PW motiv ka C-terminalnom kraju peptida (*Abe i sar. 1988*). Ova tri konzervirana regiona omogućavaju interakciju fitocistatina sa cisteinskim proteinazama papainske familije (*Turk i sar. 1997*).

Tabela 1.2. Fitocistatini

| biljka | inhibitor | kDa | autor |
|----------------------------|------------------|------------|---------------------------------|
| <i>Heliantus annuus</i> | Sca | 9 | <i>Kouzuma i sar. 1996.</i> |
| | Scb | 11 | |
| <i>Persea americana</i> | - | 11 | <i>Kimura i sar. 1995.</i> |
| <i>Daucus carrot</i> | EIP18 | 18 | <i>Ojima i sar. 1997.</i> |
| | EICC | - | |
| <i>Oryza sativa</i> | OC I | 12 | <i>Abe i sar. 1987.</i> |
| | OC II | 11.8 | <i>Kondo i sar. 1990.</i> |
| <i>Vigna unguiculata</i> | - | 10.7 | <i>Fernandes i sar. 1993.</i> |
| <i>Solanum tuberosum</i> | PMC | 87 | <i>Waldron i sar. 1993.</i> |
| <i>Glycine max</i> | - | 26 | <i>Misaka i sar. 1996.</i> |
| seme kukuruza | - | 18 | <i>Abe i sar. 1992.</i> |
| <i>Castanea sativa</i> | CsC | 11.2 | <i>Pernas i sar. 1998.</i> |
| <i>Wisteria floribunda</i> | WCPI-3 | 15.7 | <i>Hirashiki i sar. 1990.</i> |
| kivi | KCPI | 11 | <i>Rassam & Laing, 2004</i> |
| <i>Phaseolus mungo</i> | PMC I | 19 | <i>Sharma i sar. 2006</i> |
| | PMC II | 17 | |

Cistatini regulišu cisteinske proteinaze u različitim biološkim sistemima: kontrolišu procese razvića biljaka i tolerantnost na sušu i nisku temperaturu (*Kumar i sar. 1999; Gaddour i sar. 2001; Corre-Menguy i sar. 2002; Belenghi i sar. 2003; Diop i sar. 2004; Martinez i sar. 2005b; Massonneau i sar. 2005; Valdes-Rodriguez i sar. 2007*). Geni koji kodiraju cistatine regulisani su signalima stresa kao što su mehaničko povređivanje, ishrana insekta ili metaboliti odbrambenih signalnih puteva biljaka (*Bolter, 1993; Bolter & Jongsma, 1995; Botella i sar, 1996; Jacinto i sar. 1998; Pernas i sar. 2000; Girard i sar. 2007*). Neki od cistatina inhibiraju digestivne cisteinske proteinaze insekata i nematoda (*Liang i sar. 1991; Zhao i sar. 1996; Azzouz i sar. 2005; Kiggundu i sar. 2010*),

deluju protiv gljivičnih patogena biljaka (*Pernas i sar. 1999; Soares-Costa i sar. 2002; Yang & Yeh, 2005; Christova i sar. 2006*) i povećavaju otpornost biljaka na viruse (*Chen i sar. 1993*).

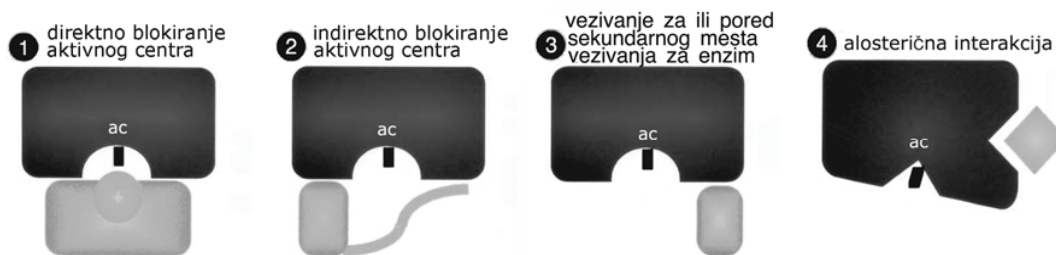
Orizacistatin I (OCI; OsCYS1; *Abe i sar. 1987*) i orizacistatin II (OCII; OsCYS2; *Kondo i sar. 1990*), izolovani iz pirinča *Oryza sativa*, prvi su dobro definisani cistatini biljnog porekla. Kao i cistatini iz familije I ne poseduju disulfidne veze; po aminokiselinskoj sekvenci su srodni familiji II animalnih cistatina - ali je genomska organizacija orizacistatina različita od životinjskih (*Kondo i sar. 1990*). Iako OCI i OCII poseduju značajnu homologiju aminokiselinske sekvence (oko 55%), pokazuju različitu inhibitornu specifičnost za cisteinske proteinaze: OCI inhibira papain efikasnije nego katepsin H, dok je OCII efikasniji za katepsin H. Sa druge strane, ni OCI ni OCII ne pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost za katepsin B ili katepsin L (*Kondo i sar. 1990; Michaud i sar. 1994a*).

Svaki od orizacistatina, kako OCI tako i OCII, eksprimiran u transgenim biljkama, pokazuje potencijal u kontroli nematoda (*Urwin i sar. 1995b; Vain i sar. 1998; Samac & Smigocki, 2003; Lilley i sar. 2004*) i insekata (*Leple i sar. 1995; Ribeiro i sar. 2006; Ninković i sar. 2007*) koji koriste cisteinske proteinaze za digestivnu hidrolizu. Takođe dokumentovana je i protektivna uloga transgenog OCI u uslovima abiotičkog stresa (*Van der Vyver i sar. 2003; Demirevska i sar. 2010*). Istovremeno, zbog odsustva cisteinskih proteinaza u humanom digestivnom sistemu ne očekuje se potencijalno negativan uticaj transgenih cistatina u ljudskoj ishrani (*Arai & Abe, 2000; Atkinson i sar. 2004*).

1.9.4. Mehanizam delovanja biljnih PI

Mehanizam inhibicije se zasniva na formiranju stabilnog kompleksa, veoma niske disocijacione konstante, PI sa ciljnom proteazom. Kompleks enzim-inhibitor je obično dodatno “zaključan” disulfidnim vezama, tako da i nakon eventualne hidrolize, inhibitor ostaje vezan za enzim (*Walker i sar. 1998*), potpuno ili delimično blokirajući, ili menjajući aktivni centar enzima (Slika 1.5).

Mehanizam antimetaboličkog delovanja biljnih PI na insekte još uvek nije u potpunosti rasvetljen i, usled visoke specifičnosti PI, pretpostavlja se da različiti tipovi PI imaju i različite mehanizme delovanja (*Carlini i sar. 2002; Amirhusin i sar. 2007*). Najjednostavniji model podrazumeva direktni anti-digestivni efekat usled inhibicije proteolize (*Reese, 1983*). Drugi, opšte prihvaćeniji model, zasniva se na kompenzaciji gubitka proteolitičke aktivnosti - hiperprodukciji proteinaza - koja preusmeravajući potrošnju aminokiselina redukuje njihovu dostupnost za rast i razviće insekta (*Broadway & Duffey, 1986*) što, pored smanjenja performansi, u nekim slučajevima može imati i letalan ishod. PI mogu narušiti i procese poput presvlačenja, sinteze neuropeptida, vodnog balansa i enzimske regulacije (*Shukle i sar. 1985; Bolter, 1993; Marchetti i sar. 2000; Haq i sar. 2004*) i direktno interferirati sa reproduktivnim procesima insekata (*Rahbe i sar. 2003; Azzouz i sar. 2005*).



Slika 1.5. Mehanizmi inhibicije proteinaza. Svi PI, stvarajući sterične smetnje, sprečavaju pristup supstrata do katalitičkog centra proteinaze (ac). Serinski PI, oponašajući supstrat, direktno blokiraju aktivni centar enzima (1); Cisteinski PI se vezuju u blizini ac i indirektno blokiraju pristup sustratu (2); u nekim slučajevima, kao što su inhibitori trombina, mesto vezivanja PI je na takvoj udaljenosti od ac da sprečava hidrolizu samo većih supstrata (3); alosterični mehanizam nije uobičajen za PI, ali neki zimogeni serinskih proteinaza pokazuju ovakav način inhibicije (4). Slika je preuzeta od *Bode & Huber-a (2000)* i adaptirana.

1.9.5. Biljke transformisane genima za inhibitore proteinaza

Nakon početne opservacije *Mickel & Standish*-a (1947) o uticaju sojinih PI na larve *Tribolium castaneum*, brojne studije, kako *in vitro* tako i *in vivo*, potvrdile su toksičnost biljnih PI za određene vrste insekata. Time su PI geni postali izvanredni “kandidati” za inženjering otpornosti na insekte, a prva generisana PI-transgena biljka, duvan sa *Vigna unguiculata* CpTI inhibitorom tripsina (*Hilder et al.* 1987), pokazala je povećanu otpornost na nekoliko predstavnika različitih redova insekata. Do sada, mnoštvo PI gena koji kodiraju produkte sa pesticidnim svojstvima je identifikovano, klonirano i okarakterisano (*Usuf i sar.* 2001; *Lawrence & Koundal,* 2002; *Shyu i sar.* 2004; *Rivard i sar.* 2007; *Lemaux,* 2008; *Zhu-Salzman i sar.* 2008; *Savić & Smigocki,* 2012), a heterologna ekspresija nekih od PI gena obezbedila je povećanu otpornost transgenih biljaka na ciljne insekte (Tabela 1.3).

Dokumentovana je i aktivnost heterolognih PI protiv nematoda (*Atkinson i sar.* 1995, 2003, 2004; *Urwin i sar.* 1995b, 1997, 2000, 2001; *Cai i sar.* 2003; *Cowgill & Atkinson,* 2003; *Samac & Smigocki,* 2003), gljivičnih patogena (*Lorito i sar.* 1994, 1998; *Joshi i sar.* 1998; *Soares-Costa i sar.* 2002; *Martinez i sar.* 2003, 2005a; *Yang & Yeh,* 2005) i virusa (*Gutierrez-Campos i sar.* 1999; *Cipriani i sar.* 2001). Takođe, postoje podaci o mogućnosti farmakološke primene biljnih PI u prevenciji tumora (*Birk,* 1993; *Kennedy,* 1994), protiv virusnih bolesti (*Aoki i sar.* 1995) i kod inflamatornih i alergijskih procesa (*Abdel-Meguid,* 2000). Ne samo da ne postoje podaci o škodljivom ili toksičnom efektu na sisare (*Schulke & Murdock,* 1983; *Pusztai i sar.* 1992) već biljni PI, pre, povećavaju nutritivnu vrednost hrane (*Ryan,* 1989) što ih čini pogodnim izborom za razvoj transgenih biljaka povećane otpornosti. Ipak, iako su poslednje dve dekade istraživanja dovela do generisanja velikog broja transgenih biljaka sa PI genima, do sada, nijedna nije komercijalizovana (*Macedo & Freire,* 2011). Jedan od razloga je, svakako, uspešnost “akutnog efekta” Bt-transgenih biljaka, koji donosi stepen zaštite od preko 95% (*Gatehouse,* 2008). Drugi je potencijalna evolutivna sposobnost insekata da prevaziđu PI inhibiciju digestivne proteolize.

Tabela 1.3. PI-transgene biljke povećane otpornosti prema insektima.

| inhibitor proteinaza | transgena biljka | ciljni insekt | autor |
|--|-------------------------|---|--------------------------|
| inhibitor tripsina (CpTI) iz <i>Vigna unguiculata</i> (S) | duvan | <i>Heliothis virescens</i> | Hilder i sar. 1987 |
| | duvan | <i>Spodoptera litura</i> | Sane i sar. 1997 |
| | jagoda | <i>Otiorhynchus sulcatus</i> | Graham i sar. 1997 |
| | pirinač | <i>Sesamia inferens</i> | Xu i sar. 1996 |
| | krompir | <i>Lacanobia oleracea</i> | Gatehouse i sar. 1997 |
| | pamuk | <i>Helicoverpa armigera</i> | Li i sar. 1998 |
| | kupus | <i>Pieris rapae</i> | Fang i sar. 1997 |
| | <i>Ipomea batatas</i> | <i>Cyclas formicarius</i> | Newell i sar. 1995 |
| | karfiol | <i>Pieris rapae</i> | Lu i sar. 2005 |
| | pšenica | <i>Sitotroga cerealella</i> | Bi i sar. 2006 |
| PIN2 krompira i paradajza (S) | duvan | <i>Manduca sexta</i> | Jonson i sar. 1989 |
| | duvan | <i>Chrysodeixis eriosoma</i> | McManus i sar. 1994 |
| | pirinač | <i>Sesamia inferens</i> | Duan i sar. 1996 |
| | topola | <i>Plagiodera versicolora</i> | Klopfenstein i sar. 1997 |
| | pirinač | <i>Chilo suppressalis</i> | Bu i sar. 2006 |
| SKTI, Kunitz inhibitor tripsina iz soje (S) | duvan | <i>Spodoptera litura</i> | McManus i sar. 1999 |
| | pirinač | <i>Nilaparvata lugens</i> | Lee i sar. 1999 |
| | <i>Ipomea batatas</i> | <i>Cyclas spp</i> | Cipriani i sar. 1999 |
| PtdKTI5, PtKTI2 (S) | <i>A. thaliana</i> | <i>Plutella xylostella</i> | Chen i sar. 2012 |
| KTI3, C-II, PI-IV (S) inhibitor tripsina iz duvana (S) | krompir, duvan | <i>Spodoptera litoralis</i> | Marcheti i sar. 2000 |
| | duvan | <i>Manduca sexta</i> | Zavala i sar. 2004 |
| | | <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Spodoptera litura</i> | Srinivasan i sar. 2009 |
| BTI-CMe, inhibitor tripsina iz ječma (S) | pirinač | <i>Sitophilus oryzae</i> | Alfonso-Rubi i sar. 2003 |
| | duvan | Lepidoptera | Carbonero i sar. 1993 |
| | pšenica | <i>Spodoptera litoralis</i> <i>Sitotroga</i> <i>cerealella</i> | Altpeter i sar. 1999 |
| <i>Nicotiana glauca</i> PI (S) | grašak | <i>Plutella xylostella</i> | Charity i sar. 1999 |
| | jabuka | <i>Epiphyas postvittana</i> | Maheswaran i sar. 2007 |
| PI iz heljde (S) | duvan | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | Khadeeva i sar. 2009 |
| <i>Ipomea batata</i> TI (S) | duvan | <i>Spodoptera litura</i> | Yeh i sar. 1997 |
| | karfiol | <i>Plutella xylostella</i> | Ding i sar. 1998b |
| <i>Brassica juncea</i> TI (S) | duvan | <i>Spodoptera litura</i> | Mandal i sar. 2002 |
| MTI-2 iz slačice (S) | <i>A. thaliana</i> | <i>Spodoptera litoralis</i> | De Leo i sar. 2001 |
| | uljana repica | <i>Spodoptera litoralis</i> | De Leo & Gallerani, 2002 |
| MPI iz kukuruza (S) | pirinač | <i>Chilo suppressalis</i> | Vila i sar. 2005 |
| CCI iz kukuruza (C) | pirinač | <i>Sitophilus zeamais</i> | Irie i sar. 1996 |
| OC I iz pirinča (C) | topola | <i>Chrisomela tremulae</i> | Leple et al. 1995 |
| | krompir | <i>Leptinotarsa decemlineata</i> | Lecardonnell i sar. 1999 |
| | uljana repica | <i>Myzus persicae</i> | Rahbe i sar. 2003 |
| OC II iz pirinča (C) | lucerka | <i>Phytodecta fornicata</i> | Ninković i sar. 2007 |
| <i>A. thaliana</i> PI (C) | <i>Populus alba</i> L. | <i>Chrysomela populi</i> | Delladone i sar. 2001 |

Inhibitori serinskih proteinaza: (S), inhibitori cisteinskih proteinaza: (C).

1.10. Adaptivne strategije insekata

Kao rezultat evolutivne “trke u naoružanju” insekti su razvili mnogobrojne strategije prevazilaženja antinutritivnih odbrambenih mehanizama biljaka - počev od izbegavanja delova biljke sa visokim sadržajem zaštitnih jedinjenja (Zangerl, 1990; Paschold i sar. 2007), detoksifikacije (Scott & Wen, 2001) pa do akumulacije i korišćenja biljnih toksina za vlastitu odbranu (Nishida, 2002). Insekti mogu i da “presreću” signalne puteve indukovane odbrane biljaka, koristeći, na primer, JK kao signal za indukciju vlastitih enzima za detoksifikaciju (Li i sar. 2002); da ih “ometaju” - bilo da zaražavajući biljku sa virusima ili bakterijama aktiviraju SK signalni put, koji utišava JK put akumulacije sekundarnih metabolita (Maleck & Dietrich, 1999; Paul i sar. 2000) ili da jedinjenjima u pljuvački inhibiraju signalne puteve biljke (Musser i sar. 2002; Bede i sar. 2006). Tako, na primer, inhibitorna komponenta pljuvačke larvi krompirove zlatice smanjuje ekspresiju PI gena (*pin1* i *pin2*) paradajza (Lawrence i sar. 2007).

Proteinazni inhibitori su važna hemijska “linija” odbrane biljaka koju insekti prevazilaze različitim mehanizmima. Iako su geni za sve 4 mehanističke klase proteinaza prisutni u genomu mnogih insekata, a digestivni “rezervoar” insekata sadrži enzime koji hidrolizuju proteine različitim katalitičkim mehanizmima - njihova zastupljenost je, u normalnim uslovima, minorna u odnosu na glavnu klasu digestivnih proteinaza (Xu i sar. 2005; Vinokurov i sar. 2006). Tako se, na primer, kod Lepidoptera i Diptera digestivna proteoliza uglavnom zasniva na serinskim proteinazama, kod Hemiptera na cisteinskim, dok Coleoptera imaju širi opseg dominantnih proteinaza (Haq i sar. 2004). U okviru dominantne klase proteinaza insekti najčešće koriste nekoliko funkcionalno i strukturno različitih proteinaza (Gruden i sar. 2004; Oliveira-Neto i sar. 2004; Srinivasan i sar. 2006) i, kao rezultat koevolucije, teže da digestivne procese baziraju na proteinazama neosetljivim na PI koji su prirodno prisutni kao deo odbrane biljke-domaćina (Gatehouse, 2002). Kada se krompirova zlatica hrani listovima krompira u njima se, kao odgovor, sintetiše visok nivo PI. Ovi inhibitori u crevima insekata aktiviraju proteaze koje, iako pripadaju papainskoj familiji cisteinskih proteinaza, pokazuju izuzetno nisku specifičnost prema inhibitorima papaina (Gruden i sar. 2004) i ne mogu biti inhibirane nativnim cisteinskim PI krompira, pa čak i kada su oni dodatno indukovani (Bolter &

Jongsma, 1995). Pored toga, jedna grupa digestivnih enzima krompirove zlatice pokazuje sposobnost hidrolize PI i kombinacijom ovih strategija insekt prevazilazi prirodni odbrambeni mehanizam biljke krompira (*Gruden* i sar. 2003, 2004).

Kada je novi, transgeni PI eksprimiran u biljci, usled raznolikosti digestivnog profila insekatskih vrsta, otpornost na sve štetočine se retko postiže, a stepen otpornosti biljke određen je nivoom ekspresije transgena, njegovom aktivnošću prema proteinazama i, u velikoj meri, adaptivnim kapacitetom insekta (*De Leo* i sar. 2001). Inhibitorski opseg PI je obično ograničen na proteaze jedne mehanističke klase, dok jedan deo proteaznog kapaciteta insekta ostaje neinhibiran (*Barrett*, 1994). Zapravo, usled neprestanog prilagođavanja insekta na native PI, inhibitorski potencijal heterolognih PI je često ograničen samo na nivo porodice digestivnih proteaza insekta (*Michaud* i sar. 1995a; *Visal* i sar. 1998). Neinhibirane proteaze mogu kompenzovati inhibiranu proteolitičku funkciju (*Jongsma & Bolter*, 1997) i/ili ugroziti strukturni integritet transgenog PI (*Michaud*, 1997; *Giri* i sar. 1998; *Yang* i sar. 2009). Dodatno, kada je izazvan heterolognim PI insekt poseže ka protivmerama kojima nadoknađuje gubitak digestivne funkcije povećanjem brzine unosa hrane (*De Leo* i sar. 1998; *Cloutier* i sar. 2000; *Abdeen* i sar. 2005; *Steppuhn & Baldwin*, 2007) i/ili prilagođavanjem digestivnog profila indukcijom PI-neosetljivih klasa ili izoformi enzima (*Mazumdar-Leighton & Broadway*, 2001; *Brunelle* i sar. 2004; *Ahn* i sar. 2004, 2007). Utvrđeno je da insekti poseduju oko 1020 različitih proteaza (*Bown* i sar. 1997) koje su regulisane na različite načine i od kojih deo ne može biti inhibiran nijednim od biljnih PI (*Broadway*, 1997). Iz ovih razloga direktna digestivna inhibicija, jednim transgenim PI, može imati ograničeni uspeh ili, u nekim slučajevima, rezultat drugačiji od očekivanog (*Girard* i sar. 1998a,b; *Cloutier* i sar. 1999, 2000; *Zhu-Salzman* i sar. 2003a; *Ahn* i sar. 2004, 2007; *Oppert* i sar. 2005).

Nekoliko različitih pristupa pokazalo je potencijal u borbi sa mehanizmima kojima insekti prevazilaze inhibiciju jednim PI: dizajniranje izmenjenih inhibitora čije usmerene mutacije omogućavaju vezivanje za proteaze neosetljive na native PI (*Urwin* i sar. 1995b; *Kiggundu* i sar. 2006; *Goulet* i sar. 2008), potraga za multifunkcionalnim PI izvan biljnog carstva (*Gruden* i sar. 1998; *Kondrak* i sar. 2005), inženjering hibridnih

inhibitora koji pokrivaju više klasa proteinaza (*Outchkourov* i sar. 2004; *Brunelle* i sar. 2005) ili istovremena ekspresija dva ili više insekticidnih jedinjenja ili PI, različite specifičnosti ili mehanizma delovanja. Od svih strategija za izbegavanje ili odlaganje pojave rezistentnosti među insektima, poslednje navedena - kombinovanje transgena - našla je najveću praktičnu primenu (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Transgene biljke sa povećanom otpornošću na insekte koje ekspimiraju dva ili više insekticidna gena.

| Insekticidni gen | transgena biljka | ciljni insekt | autor |
|--|--------------------------|---|--------------------------|
| <i>Cry1Ac + Cry2Ab</i> | pamuk | <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Spodoptera exigua</i> <i>Helicoverpa zea</i> | Stewart i sar. 2001 |
| <i>Cry1Ac + Cry1C</i> | brokoli | <i>Plutella xylostella</i> | Cao i sar. 2002 |
| <i>Cry1Ac + Cry1Ie</i> | duvan | <i>Helicoverpa armigera</i> | Lian i sar. 2008 |
| <i>Cry1Ac + CpTI</i> | duvan | <i>Helicoverpa armigera</i> | Zhao i sar. 1999 |
| <i>Cry1Ac + CpTI</i> | pirinač | <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> | Han et al. 2006, 2007 |
| <i>Cry1Ac + CpTI</i> | pirinač | <i>Chilo suppressalis</i> <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> | Li i sar. 2004a |
| <i>Cry1Ac + CpTI</i> | pirinač | <i>Chilo suppressalis</i> | Liu i sar. 2005 |
| <i>Cry1Ac+ lektin (Pta)</i> | <i>Isatis indigotica</i> | <i>Plutella xylostella</i> <i>Myzus persicae</i> | Xiao i sar. 2012 |
| <i>Bt + inhibitor (Sck)</i> | tripsina pamuk | <i>Helicoverpa armigera</i> | Guo i sar. 2007 |
| <i>Cry1Ac + Cry2A + lektin (gna)</i> | pirinač | <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> <i>Scirpophaga incertulas</i> <i>Nilaparvata lugens</i> | Maqbool i sar. 2001 |
| lektin (<i>gna</i>)+ inhibitor tripsina (<i>sbt</i>) | pirinač | <i>Nilaparvata lugens</i> <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> | Li i sar. 2005 |
| Sporamin+Taro cistatin | duvan | <i>Helicoverpa armigera</i> | Senthilkumar i sar. 2010 |

1.11. Strategije “slaganja” gena

Kako je većina agronomski važnih osobina poligenske prirode, pred biotehnologiju biljaka postavili su se zahtevi istovremene manipulacije sa više gena, više introdukovanih osobina ili više produkata gena. Isto tako, manipulacija putevima sekundarnog metabolizma biljaka (*Dixon* i sar. 1994; *Robins et al.* 1994) i produkcija farmaceutski značajnih jedinjenja (*Hiatt* i sar. 1989) zahtevala je uvođenje i ekspresiju

više gena. Povećanje otpornosti na štetočine i bolesti, kombinacijom transgenih produkata sa različitim načinom delovanja, obezbeđuje trajniju i efikasniju zaštitu (Honee i sar. 1999). Stoga, savremeni razvoj genetičkog inženjeringa biljaka usmeren je ka integraciji više transgena u genom biljaka i njihovoj koordinisanoj ekspresiji, a strategije “slaganja” ili “slepljivanja” gena (eng. *gene stacking*; *gene pyramiding*) postale su jedan od vodećih pristupa savremene biotehnologije biljaka (Halpin, 2001, 2005; Francois i sar. 2002; Halpin & Boerjan, 2003; Dafny-Yelin & Tzfira, 2007; Douglas & Halpin, 2010). Zastupjenost komercijalnih GM useva koji nose dve ili tri transgene osobine je u neprestanom porastu: u USA 37% od GM useva nosi tolerantnost na herbicide i/ili višestruku otpornost na insekte, dok 68% transgenog kukuruza i 78% transgenog pamuka poseduje “slepljene” osobine (James, 2007).

1.11.1. Ukrštanje kao metod “slaganja” transgena

Klasičnim metodama ukrštanja različitih transgenih roditeljskih linija, od kojih svaka nosi po jedan heterologni gen od interesa, dobija se potomstvo (25% u slučaju da su roditeljske linije hemizigotne za transgen, ili 100% za homozigotne transgene linije) koje poseduje oba heterologna gena. Brojni su primeri uspešnosti ovog pristupa u povećanju otpornosti na predatore i patogene (Zhu i sar. 1994; Cao i sar. 2002; Datta i sar. 2002; Zhao i sar. 2003), abiotički stres (Wei i sar. 2011), uvođenju novih biosintetskih puteva (Bizily i sar. 2000) ili u manipulaciji procesa kao što su biosinteza lignina i sazrevanje plodova (Chabannes i sar. 2001; Pinçon i sar. 2001; Abbott i sar. 2002; Powell i sar. 2003).

Glavna prednost ukrštanja je tehnička jednostavnost. Potrebno je jedino preneti polen jednog roditelja na reproduktivne organe drugog, uz predostrožnost da ne dođe do samooprašivanja. Druga prednost je da se u transgenoj populaciji potencijalnih roditelja mogu izabrati one linije sa optimalnom ekspresijom svakog od transgena i, potom, ukrstiti. Ukrštanje poseduje i neke nedostatke: procedura je prilično dugotrajna, posebno ako je potrebno kombinovati više od dva transgena uzastopnim ukrštanjem. Transgeni će kod dobijenih linija uvek biti smešteni na različitim hromozomskim lokusima, što može da oteža dalje ukrštanje preko konvencionalnih metoda. Takođe, ukrštanje nije

primenjivo za heterozigotne biljke koje se umnožavaju vegetativnim putem (npr. višegodišnje vste voća, krompir i mnoge ukrasne vrste) jer se poželjna heterozigotna priroda narušava rekombinacijom tokom mejoze (Gleave i sar. 1999).

1.11.2. Sekvencijalna transformacija

Uzastopna transformacija, ponovljena transformacija ili re-transformacija je definisana kao ponovljena insercija transgena u biljni genom. Nakon uvođenja prvog heterolognog gena, drugi gen se uvodi novom transformacijom u biljke dobijene prvom transformacijom, treći gen narednom transformacijom i tako dalje. Na ovaj način postignuta je manipulacija metaboličkih puteva (Lapierre i sar. 1999; Rosati i sar. 2003), ponovo uspostavljena fertilnost (Hird i sar. 2000; Bisht i sar. 2007), povećana otpornost transformisanih biljaka na abiotički stres (Jobling i sar. 2002) i kombinovana otpornost na virusne, bakterijske ili gljivične patogene (Chan i sar. 2005; Rivero i sar. 2012).

Re-transformacija je sistem slaganja gena nezavisan od seksualnog ukrštanja. Zato, ovim metodom više transgena može biti inkorporisano i u heterozigotne biljke koje se propagiraju vegetativnim putem. Nasuprot ukrštanju, re-transformacijom se zadržava željeni genotip i izbegnuta je mogućnost gubljenja korisnih osobina biljaka usled rekombinacija. Glavni nedostatak integracije transgena ponovljenom insercijom je dugotrajnost postupka i potreba za različitim selekcionim markerom za svaku novu transformaciju. Nasuprot velikom broju korisnih gena koji se mogu introdukovati, mali broj selektivnih markera ima praktičnu primenu (Ebinuma i sar. 1997). Najčešće korišćeni selektivni marker geni su oni koji pružaju otpornost na antibiotike ili herbicide: higromicin fosfotransferaza (*hpt*) iz *Escherichia coli* omogućava otpornost na higromicin B, *E. coli* neomicin fosfotransferaza (*nptII*) omogućava otpornost prema kanamicinu ili genticinu i *Streptomyces hygroscopicus* acetiltransferaza (*bar*) daje otpornost na fosfotricin (Yoder i sar. 1994).

1.11.3. Ko-transformacija

Ko-transformacija je definisana kao istovremena introdukcija više gena od interesa. Introdukovani geni, prilikom ko-transformacije mogu da se nalaze ili na istom plazmidu (eng. *single-plasmid co-transformation*) ili na odvojenim plazmidima (eng. *multiple-plasmid co-transformation*). Najcitiraniji primer uspešnosti ovog pristupa je introdukcija kompletnog biosintetskog puta β -karotena u endosperm pirinča, pomoću *Agrobacterium*-posredovanog transfera gena, kombinacijom ko-transformacija tipa jedan- i više-plazmida (Ye i sar. 2000). Ko-transformacijom su, takođe, dobijene biljke povećane otpornosti na štetočine i patogene (Jongedijk i sar. 1995; Jach i sar. 1995; Maqbool i sar. 2001; Maruthasalam i sar. 2007; Sridevi i sar. 2008; Chen i sar. 2009; Jha & Chattoo, 2009; Zhu i sar. 2010), prema abiotičkom stresu (Zhang i sar. 2008; Faize i sar. 2011) i postignuta je kontrola složenih metaboličkih puteva (Slater i sar. 1999; Poirier i sar. 2000; Yu i sar. 2003).

Najveća prednost koju donosi ko-transformacija je mogućnost introdukcije više transgena jednim postupkom transformacije, za razliku od uzastopne re-transformacije koja zahteva ponavljanje transformacionih postupaka. Ko-transformacija, ipak donosi i neke tehničke poteškoće. Za pristup jedan-plazmid glavno ograničenje može biti združivanje plazmida sa višestrukim genskim kasetama. Standardni transformacioni vektori za to nisu podesni usled postojanja heksanukleotidnih restrikcionih mesta koja su često prisutna i u sekvencama koje se inseruju u vektor. Takođe, i nakon konstrukcije višestrukih ekspresionih genskih kaset, najčešće više ih nije moguće zameniti ili ukloniti, u jednom koraku kloniranja, zbog prisustva restrikcionih mesta na neželjenim lokacijama. Zato su mnoge istraživačke grupe dizajnirale različite vektore za transformaciju biljaka koji dozvoljavaju lakše združivanje više plazmida ili ekspresionih kaset (Hajdukiewicz i sar. 1994; McCormac i sar. 1997; Goderis i sar. 2002; Thomson i sar. 2002; Lin i sar. 2003).

Ko-transformacija sa više plazmida poseduje očiglednu prednost jer je konstituisanje ekspresionih kaset na nezavisnim plazmidima tehnički lakše (Komari i sar. 1996). Na ovaj način i do 13 gena se istovremeno može insertovati u genom biljaka (Chen i sar.

1998). Prilikom ko-transformacije sa više plazmida, različite T-DNK su često integrisane u isti genski lokus (*De Block* i sar. 1991; *Grevelding* i sar. 1993; *Denis* i sar. 1995; *De Neve* i sar. 1997). Ovaj fenomen može biti prednost kada je koekspresija transgena poželjna ili kada se transgene linije dalje koriste za ukrštanje, ali je nepoželjan kada je cilj eliminacija selektivnog marker gena.

1.12. Multitrofični uticaj PI-transgenih biljaka

Proteazni inhibitori su potencijalna “dopuna” Bt-toksinima za razvijanje biljaka povećane otpornosti na insekte, ali njihova ograničena specifičnost prema proteolitičkim enzimima kao i sveprisutnost fizioloških procesa u živim organizmima koji se baziraju na aktivnosti proteinaza, nameću pitanja o njihovom, potencijalnom indirektnom uticaju na agroekosisteme.

1.12.1. Neciljni organizmi

Snažan pesticidni efekat biljaka otpornih na insekte može indirektno uticati na adaptivnu vrednost neciljnih organizama kao i na njihovu organizaciju u prirodi. Poznati su primeri indirektnog uticaja Bt-transgenih biljaka na predatore i parazite artropoda preko “lošeg kvaliteta” ciljnog insekta usled ingestije rekombinantnog Bt-toksina (*Marvier* i sar. 2007; *Naranjo* i sar. 2009). Takođe, prisustvo neciljne sekundarne štetočine može biti povećano usled nedostatka kompeticije sa ciljnom štetočinom, kao što je povećanje populacije krompirovih mušica na *Newleaf* Bt-krompiru koji je visoko otporan na krompirovu zlasticu (*Cloutier* i sar. 2008). Ipak, uobičajeno gledište je da su sporedni efekti Bt-transgenih biljaka zanemarljivi usled visoke funkcionalne specifičnosti toksina, koncentracije koja je u biljnim tkivima ispod praga potrebnog za ozbiljnije nuspojave i ograničene trajnosti Cry proteina u prirodnim ekosistemima (*Marvier* i sar. 2007; *Wolfenbarger* i sar. 2008; *Naranjo* i sar. 2009).

Direktni, nenamerni, uticaj drugih pesticidnih proteina kao što su lektini ili proteazni inhibitori, još je verovatniji, usled postojanja “meta” njihove aktivnosti kod većine organizama u prirodi (Malone & Burgess, 2000; O’Callaghan i sar. 2005). Pored toksičnog efekta na ciljnog insekta, rekombinantni inhibitori proteinaza mogu direktno uticati na digestivne procese proteolize kod polinatora, simbionata i neciljnih fitofagnih insekata i/ili indirektno, preko plena ili domaćina koji se hrani transgenom biljkom, ugroziti ekološku funkciju njegovih prirodnih neprijatelja i parazita. Kao i u slučaju Bt-toksina, neznatan uticaj PI transgenih biljaka zabeležen je na predatore, parazitoide ili sekundarne fitofagne insekte (Cowgill i sar. 2002, 2004; Graham i sar. 2002; Cowgill & Atkinson, 2003; Bell i sar. 2003; Bouchard i sar. 2003a,b; Ferry i sar. 2003, 2005; Mulligan i sar. 2006; Simoes i sar. 2008; Burgess i sar. 2008; Konrad i sar. 2008, 2009). Ipak, sa druge strane, dokumentovani su i negativni (Bell i sar. 2001; Ferry i sar. 2005), kao i pozitivni (Ashouri i sar. 2001a,b) uticaji. Inhibitorni efekat PI i kompenzatorni odgovor nekih predatora nakon ishrane plenom koji se hranio transgenim materijalom ukazuje na direktan uticaj PI i na narednom trofičkom nivou. Tako, na primer, Hemiptera *Perillus bioculatus* kada se hrani larvama krompirovih zlatica sa OCI-transgenog krompiira, digestivnu inhibiciju rekombinantim OCI, unetim preko plena, kompenzuje sekrecijom proteinaza neosetljivih na inhibitor (Bouchard i sar. 2003a,b). Ipak, iako OCI ne utiče na preživljavanje *P. bioculatus*, može negativno uticati na fertilitet i odložiti ovipoziciju, smanjiti masu jaja i procenat piljenja (Overney i sar. 1998). Istovremeno, ingestija OCI ima i pozitivan efekat na performansu *P. bioculatus*: povećava stopu izlovljavanja larvi krompirove zlatice (Ashori i sar. 1998). Ovi podaci, paralelno sa ilustracijom sposobnosti adaptacije insekata višeg trofičkog nivoa, ukazuju na kretanje rekombinantnog PI duž lanca ishrane i značaj analiza prostorne dinamike interakcije enzim-inhibitor. Neočekivani pozitivan uticaj OCI na sekundarnu herbivoru i njenog parazitoida (Ashouri i sar. 2001a,b) dodatno usložnjava celu sliku i usmerava ka mogućim, PI indukovanim, plejotropnim promenama biljke domaćina.

1.12.2. Interakcije *in planta*

Proteinaze učestvuju u gotovo svim biohemijskim procesima biljaka, što nameće pitanje o mogućem uticaju heterologne ekspresije PI na proteolitičke procese i na balans proteinaza/inhibitor u transgenim PI-biljkama. Neznatan uticaj PI na fenotip transgenih biljaka, zasnovan na makroskopskim pokazateljima kao što su brzina rasta, dijametar izdanka ili broj listova, pokazan je u nekim slučajevima (*Brunelle* i sar. 2004; *Rivard* i sar. 2006; *Badri* i sar. 2009), a u poslednje vreme je sve više podataka o značajnom uticaju i na metaboličkom nivou. Pored pesticidnog efekta, konstitutivna akumulacija cistatina *in planta*, može biti povezana sa odlaganjem cvetanja (*Gutierrez-Campos* i sar. 2001), inhibicijom (*Belenghi* i sar. 2003) ili pozitivnom regulacijom (*Munger et al.* 2010) patogen-inducibilnog odgovora biljaka, povećanju stabilnosti fotosintetičkog aparata u uslovima abiotičkog stresa (*Van der Vyver* i sar. 2003; *Zhang* i sar. 2008; *Demirevska* i sar. 2010) ili povećanju količine proteina u listovima (*Prins* i sar. 2008). Značajan metabolički uticaj na sadržaj proteina zabeležen je i za serinske ili aspartatne PI (*Badri* i sar. 2009; *Goulet* i sar. 2010), kao i uticaj serinskih PI na povećanje tolerancije abiotičkog stresa (*Huang* i sar. 2007; *Shan* i sar. 2008; *Srinivasan* i sar. 2009). Pozitivni plejotropni uticaj, predstavljajući agronomski korisne osobine, otvara nove mogućnosti upotrebe PI ali, istovremeno, nameće i nova pitanja o uticaju ovih metaboličkih efektor na biljni ekosistem.

1.13. Perspektive

Oslanjanje na hemijsku kontrolu dovelo je do oko 7470 zabeleženih slučajeva otpornosti insekata na pojedine pesticidne produkte (*Whalon* i sar. 2008), a otpornost na Bt-toksin je dokumentovana za 17 vrsta insekata (*Huang* i sar. 1999). Iako je uticaj PI u povećanju otpornosti često ograničen u odnosu na sintetičke pesticide ili Bt-toksin, ovi sveprisutni regulatori proteolitičkih enzima su, i dalje, potencijalni kandidati za razvijanje transgenih biljaka otpornih na insekte. Poslednjih godina, vršena su obimna ispitivanja transgenih linija pirinča koje ekspimiraju serinske PI, pre njihove, eventualne, šire upotrebe u kontoli insekata iz reda Lepidoptera (*Deka & Barthakur*, 2010).

Trajniji i značajniji nivo kontrole štetočina - dizajniranjem i otkrivanjem novih potentnih inhibitora, multifunkcionalnih i hibridnih PI, usklađivanjem dejstva i povećanjem opsega inhibicije njihovim “slaganjem”, uporedo sa strategijama postizanja visokog nivoa ekspresije - može se očekivati i u budućnosti. U 2010 godini 148,1 miliona ha je bilo pod GM usevima, od kojih 32,3 miliona ha su uzimali usevi sa “slepljenim” osobinama. Ko-ekspresija dva gena je najvećim delom donosila otpornost na insekte i herbicide, a koekspresija tri gena na herbicide i dve insekatske štetočine (*ISAAA*, 2010). U narednom periodu predviđa se povećanje obradivih površina pod transgenim usevima sa “slepljenim” osobinama, kao i razvijanje novih generacija komercijalnih biljaka sa više introdukovanih transgena (*Taverniers* i sar. 2008). Varijeteti kukuruza koji nose do pet korisnih gena već su dobili autorizaciju za komercijalni uvoz, industrijsku preradu i proizvodnju namirnica u SAD, EU, Filipinima, Japanu, Koreji, Meksiku i Južnoj Africi (*Paul* i sar. 2012). Iako su do danas ukrštanje transgenih linija, re-transformacija, transformacija sa multigenkim kasetama i ko-transformacija, kao glavni pristupi “slaganja” transgena, doživeli mnoga tehnička poboljšanja, unapređenje metoda za ko-transformaciju pomoću jednog plazmida, prevazilaženje ograničenog kapaciteta vektora i povećanje stabilnosti velikih genskih konstrukata sa višestruko ponovljenim elementima, verovatno će biti aktivne oblasti istraživanja biotehnologije biljaka (*Douglas & Halpin*, 2010).

Sa druge strane, uticaj nativnih biljnih PI, kao što su CpTI ili OCI, na neciljne organizme je dokumentovan, ali postoji malo podataka o “nenamernim” posledicama ekspresije novih generacija inhibitora sa snažnijim uticajem na proteinaze štetočina, hibridnih inhibitora ili kombinovanog uticaja nekoliko različitih insekticidnih proteina. Izazov, svakako, predstavlja pronalaženje onih varijanti inhibitora koji pokazuju povećanu aktivnost prema ciljnim proteinazama herbivore a smanjenu aktivnost prema proteinazama biljke domaćina ili proteinazama korisnih insekata. Dodatno, iako prisustvo transgenih cistatina u ljudskoj ishrani, usled nepostojanja ciljnih digestivnih enzima, ne bi trebalo da izazove javnu zabrinutost - ekspresija snažnih aspartatnih i serinskih PI širokog spektra, može podstaći mnoga pitanja u budućnosti.

Povećanje otpornosti na štetočine i bolesti, poboljšanje nutritivne ili industrijske vrednosti gajenih biljaka, kao i sinteza terapijskih produkata metodama bioinženjeringa, danas može obezbediti brz, ekonomičan i po okolinu "prijateljski" pristup oplemenjivanja useva. Da bi se iskoristile ove mogućnosti potrebno je unaprediti postojeće i razviti nove pristupe manipulacije sa više gena kako bi se došlo do održivijih i "čistijih" transgenih tehnologija. Tehnički napredak u ovoj oblasti predstavlja glavni izazov sa kojim se suočava biotehnologija 21-og veka.

2. CILJEVI RADA

1. Utvrđivanje efikasnog postupka za “slaganje” dva heterologna gena u genom domaćih sorti krompira Dragačevka i Jelica, kao i kontrolne sorte Dezire, pomoću dva soja *Agrobacterium tumefaciens*, od kojih svaki bakterijski soj nosi po jedan orizacistatinski gen, *OCI* ili *OCII*.
2. Dobijanje biljaka krompira kod kojih su, genetičkom transformacijom, introdukovana oba orizacistatinska gena.
3. Karakterizacija ekspresije oba orizacistatinska gena kod *OCI/OCII* transformisanih linija krompira.
4. Ispitivanje potencijala *OCI/OCII* transformisanih biljaka u kontroli glavne štetočine lisne mase biljaka krompira, krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

U ovom radu su korišćene dve domaće sorte krompira, *Solanum tuberosum* L. cv. Jelica i cv. Dragačevka, selekcionisane u Centru za krompir u Guči, kao i holandska sorta *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree (PKB INI Agroekonomski institut, Beograd), odomaćena u našoj zemlji. Kulture *in vitro* ovih sorti uspostavili su *Vinterhalter* i saradnici (1997) iz izbojaka krtola, pre skoro 20 godina.

Kulture su održavane putem regeneracije izdanaka iz odsečaka nodusa sa po jednim bočnim pupoljkom na osnovnoj MS podlozi (*Murashige* i *Skoog*, 1962) bez regulatora rasteња.

3.2. Hranljive podloge

3.2.1. Osnovna podloga

Osnovna hranljiva podloga za gajenje kultura *in vitro* (MS podloga) sadržala je mineralne soli po *Murashige* i *Skoog*-u (1962) i vitamine po *Linsmaier* i *Skoog*-u (1965), kao i organske komponente prikazane u Tabeli 3.1.

3.2.2. Podloge za indukciju kalusa i regeneraciju izdanaka

Za regeneraciju izdanaka iz odsečaka listova, prilikom ko-transformacije i re-transformacije, korišćene su hranljive podloge sa različitim kombinacijama regulatora rasteња koje su pokazale visoku efikasnost u indukciji kalusa i regeneraciji pupoljaka kod domaćih sorti krompira Dragačevka i Jelica (*Cingel* i sar. 2009; 2010).

Tabela 3.1. Komponente osnovne MS (*Murashige & Skoog*, 1962) hranljive podloge.

| Makro elementi | mg/l | Kompleks gvožđa | mg/l |
|--|-------------|---------------------------------------|---------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650.0 | NaEDTA x 2H ₂ O | 37.2 |
| KNO ₃ | 1900.0 | FeSO ₄ x 7H ₂ O | 27.8 |
| CaCl ₂ x 4H ₂ O | 440.0 | Vitamini | mg/l |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 370.0 | B1 | 0.1 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.0 | B6 | 0.5 |
| Mikro elementi | mg/l | Nikotinska kiselina | 0.5 |
| MnSO ₄ x 4H ₂ O | 22.300 | Glicin | 2.0 |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 8.600 | Organske komponente | gr/l |
| H ₃ BO ₃ | 6.200 | Inozitol | 0.1 |
| KJ | 0.830 | Saharoza | 30.0 |
| NaMoO ₄ x 2H ₂ O | 0.250 | Agar | 6.0 |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | 0.250 | | |
| CoCl ₂ x 6H ₂ O | 0.025 | | pH 5.8 |

Podloga za indukciju kalusa (eng. *Callus Induction Medium*, CIM), prema Webb-u i saradnicima (1983): MS sa 3% saharoze, 2 mg/l BAP and 0,2 mg/l NAA. Selektivni CIM (sCIM), korišćen u eksperimentima transformacije sa *Agrobacterium tumefaciens*, sadržao je sledeće antibiotike: kanamicin (Sigma) 75 mg/l - za selekciju transformisanog biljnog tkiva i cefotaksim (Tolycar[®], Jugoremedija) 500 mg/l - za uklanjanje kultura bakterija nakon inokulacije biljnog tkiva.

Podloga za indukciju izdanaka (eng. *Shoot Induction Medium*, SIM), prema Visser-u i saradnicima (1989b): MS sa 1,5% saharoze, 2 mg/l BAP and 5 mg/l GA₃. Selektivni SIM (sSIM) sadržao je 75 mg/l kanamicina i 300 mg/l cefotaksima

Podloga za indukciju korenova (eng. *Root Induction Medium*, RIM): MS sa 3% saharoze, bez regulatora rastjenja. Selektivni RIM (sRIM) sadržao je 100 mg/l kanamicina i 300 mg/l cefotaksima.

Sve selektivne podloge (sCIM, sSIM i sRIM) korišćene prilikom transformacije pomoću *Agrobacterium tumefaciens* koji nosi *OCI* gen sadržale su 50 mg/l kanamicina i 300 mg/l cefotaksima.

3.3. Indukcija kalusa i regeneracija izdanaka

Kao polazni materijal za indukciju kalusa korišćeni su listovi biljaka starih 4 nedelje koje su gajene *in vitro*. Odsecci listova, veličine $\sim 0,5 \text{ cm}^2$, postavljani su tako da je gornja lisna ploča bila u kontaktu sa hranljivom podlogom. Eksplantati su gajeni u petri kutijama sa po 25 ml hranljive podloge.

Proceduru regeneracije iz odsečaka listova činila su tri koraka:

- indukcija kalusa na CIM podlozi u periodu od 2 nedelje
- regeneracija izdanaka iz kausa na SIM podlozi
- ožiljavanje izdanaka na RIM podlozi

Za dalje umnožavanje i rast kultura izdanaka korišćeni su odsecci nodusa sa po jednim bočnim pupoljkom koji su gajeni na 40 ml MS podloge bez regulatora rastenja u bočicama zapremine 100 ml, zatvorenim šivenim zapašaćima od vate i gaze. Kulture su prenošene na svežu podlogu svakih 5-6 nedelja.

3.4. Metode sterilizacije

Hranljive podloge, instrumenti za rad i laboratorijsko posuđe sterilisani su prema standardnim procedurama kulture biljnih ćelija, tkiva i organa *in vitro*. Svi eksperimenti su rađeni sa sterilnim biljnim materijalom i priborom u komori sa sterilnim protokom vazduha.

3.5. Uslovi gajenja

Kulture *in vitro* su rasle u klimatizovanoj sobi u standardnim uslovima:

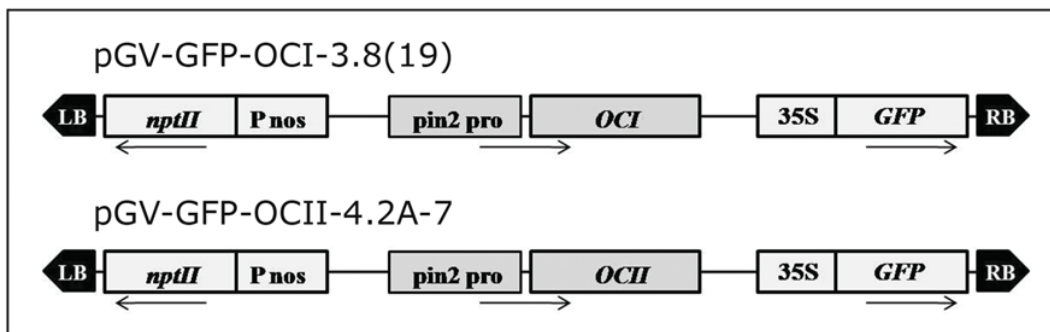
- temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$
- bela fluorescentna svetlost jačine $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$
- svetlosni režim dugog dana (16h svetlosti i 8h mraka)

Ožiljene *in vitro* biljke, stare 3 nedelje, prenošene su u podlogu od humusa, treseta i peska (1:1:1) na kojoj su gajene u stakleniku na temperaturi od 25-28°C.

3.6. Transformacija pomoću *Agrobacterium tumefaciens*

3.6.1. Konstrukti korišćeni za transformaciju

Za transformaciju krompira korišćena su dva različita soja *A. tumefaciens*, AgGV-GFP4.2A-7 i AgGV-GFP3.8(19), konstituisana u laboratoriji Dr Ann Smigocki (USDA-ARS-Plant Molecular Pathology Laboratory, Beltsville, USA). U pitanju je *Agrobacterium* soj EHA101 koji nosi plazmide pGV-GFP-OCI-3.8(19) sa 35S-GFP, pin2p-OCI i nos-npt II genima i pGV-GFP-OCII-4.2A-7 sa 35S-GFP, pin2p-OCII i nos-npt II genima (Slika 3.1).



Slika 3.1. Šematski prikaz T-DNK plazmida pGV-GFP-OC. **LB** (*left border*) – leva granična sekvenca; **RB** (*right border*) – desna granična sekvenca; **Pnos-nptII** – npt II gen pod kontrolom nopalin sintetaznog promotora (Pnos), kodira neomicin fosfotransferazu; **pin2pro-OCI** – cDNK *OC I* gena poreklom iz pirinča pod kontrolom pin2p promotora (proteinazni inhibitor II iz krompira) kodira orizacistatin I, inhibitor cisteinskih proteinaza specifično aktivan prema papainu; **pin2pro-OCII** - cDNK *OC II* gena poreklom iz pirinča pod kontrolom pin2p promotora kodira orizacistatin II, inhibitor cisteinskih proteinaza specifičan za katepsin H; **35S-GFP** – GFP reporter gen pod kontrolom 35S promotora, kodira zeleno-fluorescirajući protein (eng. *green fluorescent protein*, GFP).

3.6.2. Podloge za rast bakterija

Sojevi *Agrobacterium tumefaciens* korišćeni u eksperimentima gajeni su na standardnoj YEB podlozi za gajenje bakterija (*Van Larebeke* i sar. 1977), čiji sastav je prikazan u Tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Komponente (mg/l) YEB podloge za gajenje bakterija.

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Mesni ekstrakt | 5,0 |
| Ekstrakt kvasca | 1,0 |
| Pepton | 5,0 |
| Saharoza | 5,0 |
| Agar | 15,0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,5 |
| | pH 7,2 |

Bakterije su rasle u petri kutijama sa po 25 ml YEB medijuma i 50 µg/ml kanamicina, u termostatu na temperaturi od 28°C do pojave prvih kolonija (24-48h). Petri kutije sa izraslim bakterijama čuvane su na 4°C. Bakterije su svakih mesec dana presejavane na svežu podlogu. Tokom dužeg vremenskog perioda bakterijske kulture su čuvane u glicerolu na -70°C. Glicerolske kulture predstavljaju 1:1 (v:v) smešu sterilnog glicerola i prekonoćne bakterijske suspenzije.

Za inokulaciju biljnog materijala korišćene su bakterijske suspenzije, pravljene prenošenjem jedne bakterijske kolonije sa petri kutije u 5 ml tečnog YEB medijuma i inkubiranjem 24h na 28°C. Na ovaj način je dobijana bakterijska suspenzija standardne gustine 5×10^8 bakterija/ml.

3.6.3. Ko-transformacija biljnog tkiva

Ko-transformacija je rađena prema proceduri za transformaciju domaćih sorti krompira Dragačevke i Jelice pomoću *A. tumefaciens* (*Cingel* i sar. 2010), uz dodatne optimizacije.

Inokulacija je vršena potapanjem odsečaka listova u 5 ml 1:1 (v:v) smeše bakterijskih suspenzija AGV-OCI i AGV-OCII optičkih gustina $\sim 0,6$ (A_{600}). Nakon 5-10 minuta inkubacije eksplantati su prosušeni na filter papiru i prebačeni na CIM podlogu. Posle kokultivacionog perioda od 5 dana, eksplantati inokulisani sa *A. tumefaciens* su isprani u vodenom rastvoru cefotaksima (1 gr/l), prosušeni na filter papiru i prenešeni na selektivnu CIM podlogu. Kalus indukovan na selektivnoj CIM podlozi je, nakon 2 nedelje, isecan sa eksplantata i prebačen na selektivnu SIM podlogu. Nakon 4 nedelje, regenerisani izdanci (po jedan nasumično izabran sa svake kalusne mase) su prebačeni na selektivnu RIM podlogu. Pojedinačni ožiljeni izdanci su označeni kao zasebne, potencijalno transformisane linije i, putem kulture jednonodalnih odsečaka, umnoženi su na MS podlozi bez regulatora rastjenja, sa dodatkom 300 mg/l cefotaksima. Nakon 3 subkulture antibiotik je izostavljen iz podloge.

Kontrolni odsecci listova su podvrgnuti istoj proceduri ali bez inokulacije i gajeni su na odgovarajućim podlogama koje nisu sadržale antibiotike.

3.6.4. Re-transformacija biljnog tkiva

Kao polazna linija za re-transformaciju krompira sorte Jelica izabrana je transgena OCI linija 21 (OCI-21), koja je pokazivala normalan fenotip i visoki nivo ekspresije *OCI* gena. OCI-21 dobijena je transformacijom sa pGV-GFP-OCI-3.8(19) prema protokolu koji su opisali *Cingel* i saradnici (2010).

Re-transformacija je vršena potapanjem odsečaka OCI-21 transformisanih listova u bakterijsku suspenziju soja *A. tumefaciens* AGV-OCII. Svi naredni koraci bili su isti kao i za postupak ko-transformacije. Kao kontrola, odsecci listova originalne sorte Jelica i OCI-21 linije su podvrgnuti istoj proceduri ali bez inokulacije i gajeni su na odgovarajućim podlogama koje nisu sadržale antibiotike.

3.6.5. Parametri regeneracije transformisanih izdanaka

U eksperimentima ko-transformacije i re-transformacije na kontrolnim i inokulisanim odsečcima listova praćeni su sledeći parametri:

- broj odsećaka listova sa kalusom
- broj kalusa sa pupoljcima
- broj regenerisanih izdanaka
- broj ožiljenih izdanaka

3.7. Verifikacija uspešnosti transformacije

Integracija heterologih gena u genom krompira verifikovana je PCR analizom genomske DNK. DNK je izolovana iz listova netransformisanih biljaka krompira i kanamicin-rezistentnih transformanata starih 4 nedelje gajenih *in vitro*.

3.7.1. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK korišćena za PCR analizu izolovana je po metodi *Zhou* i saradnika (1994). U pitanju je standardna ekstrakciona procedura sa CTAB-om koja uključuje upotrebu NaCl za uklanjanje polisaharida i PVP-a za uklanjanje fenola tokom prečišćavanja DNK.

Sastav pufera i rastvora:

- Ekstrakcioni pufer: 2,0% (w/v) CTAB, 20mM (v/v) NaEDTA, 100mM (v/v) TRIS-HCl (pH 8,0), 1,4M (v/v) NaCl, 1,0% (w/v) PVP i 0,5% (v/v) β -merkaptetanola dodatog neposredno pre upotrebe pufera
- Hloroform:izoamilalkohol 24:1 (v/v)
- 4M NaCl
- TE pufer: 10mM (v/v) TRIS-HCl (pH 8,0) i 1mM (v/v) EDTA (pH 8,0)
- RNaza A (10mg/ml)

Ekstrakcija DNK: 100-150 mg biljnog materijala je pomoću tečnog azota, mehanički usitnjeno u avanima. Prah je prebačen u sterilne ependorf tubice zapremine 1,5 ml i dodato je 600 µl ekstrakcionog pufera. Sadržaj je izmešan invertovanjem i inkubiran 20 min na 56°C. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi u svaku ependorf tubicu dodato je po 600 µl hloroform:izoamilalkohola, izmešano invertovanjem i centrifugirano 10 min na 20000 g na sobnoj temperaturi. Supernatant je prebačen u nove ependorf tubice a hloroformska ekstrakcija je još jednom ponovljena. 500 µl vodene faze je invertovanjem pomešano sa 250 µl 4M NaCl i, nakon dodavanja 750 µl hladnog izopropanola, smeša je inkubirana 30 min na 4°C. Sadržaj je, potom, centrifugiran 5 min na 8000 g na sobnoj temperaturi. Supernatant je odstranjen, a talog ispran dodavanjem 1ml hladnog 70% etanola. Nakon centrifugiranja pod istim uslovima, etanol je odliven, a talog osušen u laminar komori. Resuspendovan je dodavanjem 200 µl TE pufera i inkubiran preko noći na 4°C. Rastvor je, potom, tretiran RNazom (1 µl RNaze na 100 µl rastvora DNK) i inkubiran 30 min na 37°C. Nakon toga, hloroformska ekstrakcija je još jednom ponovljena, smeša je centrifugirana 10 min na 13000 g na sobnoj temperaturi i 100 µl gornje faze je prebačeno u nove ependorf tubice. Uzorci DNK su čuvani na 4°C.

Kvalitet izolovane DNK analiziran je elektroforezom u agaroznom gelu. Koncentracija izolovane DNK određena je spektrofotometrijski (Agilent 8453), prema apsorbanci na talasnoj dužini od 260 nm (A_{260}), prema formuli: [ukupna DNK] ($\mu\text{g/ml}$) = $50 \times A_{260} \times$ razblaženje

3.7.2. PCR amplifikacija

Za PCR analizu korišćen je *AmpliTaq Gold[®] PCR Kit* (Applied Biosystems). Svaku pojedinačnu PCR reakciju, zapremine od 25 µl, činile su komponente prikazane u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Komponente (μ l) pojedinačne PCR reakcije.

| | |
|-----------------------------------|-------|
| H ₂ O | 15,50 |
| 10xPCR pufer | 2,50 |
| dNTP (10mM) | 1,50 |
| prajmer 1 (5 μ M) | 1,25 |
| prajmer 2 (5 μ M) | 1,25 |
| Taq DNK polimeraza (5 U/ μ l) | 0,50 |
| DNK (100 ng/ μ l) | 2,50 |

Prajmeri za amplifikaciju fragmenta od približno 1000 bp iz kodirajućeg regiona pin2-*OCI* gena:

F pin2: 5'- GGC TCC TCC GTC CAA TTA TA -3'

R *OCI*: 5'- ATC GAC AGG CTT GAA CTC CT -3'

Prajmeri za amplifikaciju fragmenta od 800 bp iz kodirajućeg regiona pin2-*OCII* gena:

F pin2: 5'- GGC TCC TCC GTC CAA TTA TA -3'

R *OCII*: 5'- GGT GGC GTC GTC GAG GGG -3'

Uslovi PCR reakcije: 1 ciklus denaturacije od 5 min na 95°C, 35 ciklusa: denaturacija 1 min na 95°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C (*OCI*) ili na 53°C (*OCII*) i ekstenzija 2 min na 72°C, 1 ciklus finalne ekstenzije od 10 min na 72°C. PCR reakcija se odvijala u termocikleru (Techne, Genius).

Prajmeri korišćeni za amplifikaciju fragmenta od približno 390 bp koji pokriva sekvencu *virG* gena:

F *virG*: 5' - GCC GAC AGC ACC CAG TTC AC - 3'

R *virG*: 5' - CCT GCC GTA AGT TTC ACC TCA CC - 3'.

Uslovi PCR reakcije: 1 ciklus denaturacije od 5 min na 95°C, 35 ciklusa: denaturacija 1 min na 95°C, vezivanje prajmera 1 min na 60°C i ekstenzija 2 min na 72°C, 1 ciklus finalne ekstenzije od 10 min na 72°C.

3.8. Verifikacija genske ekspresije

Ekspresija orizacistatinskih gena verifikovana je RT-PCR analizom kod netransformisanih biljaka krompira i PCR pozitivnih transformanata. Listovi biljaka gajenih *in vitro*, stari 4 nedelje, povređeni su zasecanjem makazama 3-4 puta sa svake strane lista, a RNK je izolovana 0h (nepovređeni listovi), 6h i 24h nakon povređivanja listova.

3.8.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK korišćena za RT-PCR analizu izolovana je po metodi koju su opisali *Gašić* i saradnici (2004) uz manje modifikacije. Metod uključuje ekstrakcionu proceduru pomoću CTAB-a, kao i upotrebu PVP-a za uklanjanje fenola i LiCl za taloženje RNK tokom njenog prečišćavanja.

Sastav pufera i rastvora:

- Ekstrakcioni pufer: 2,0% (w/v) CTAB, 25mM (v/v) EDTA, 100mM (v/v) TRIS-HCl (pH 8,0), 2,0M (v/v) NaCl, 2,0% (w/v) PVP, 0,5 g/l spermidina i 0,5% (v/v) β -merkaptotetanol dodatog neposredno pre upotrebe pufera
- Hloroform:izoamil alkohol 24:1 (v/v)
- 7,5M LiCl
- 3,0M Na-acetat (pH 5,5)
- 70% (v/v) etanol

Svi rastvori su pripremani sa vodom koja je tretirana 0,1% (v/v) DEPC-om

Ekstrakcija RNK: 100-150 mg biljnog materijala je pomoću tečnog azota, mehanički usitnjeno u avanima, homogenizovano u 650 μ l ekstrakcionog pufera i prebačeno u sterilne, slobodne od RNK ependorf tubice zapremine 1,5 ml. Homogenat je mešan na vorteksu 30s i, potom, inkubiran 15 min na 60°C. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi u svaku ependorf tubicu dodato je po 650 μ l hloroform:izoamil alkohola, smeša je vorteksovana 30s i centrifugirana 10 min na 10000 g na 4°C. Supernatant je prebačen u nove ependorf tubice a hloroformska ekstrakcija je još jednom ponovljena. 500 μ l

vodne faze je invertovanjem pomešano sa 1/3 zapremine hladnog 7,5M LiCl i smeša je inkubirana preko noći na 4°C. Rastvor je, potom, centrifugiran 30 min na 12000 g na 4°C. Supernatant je odstranjen, a talog ispran dodavanjem 1 ml 70% etanola, pa zatim osušen u laminar komori 5 min. Talog je resuspendovan u 100 µl DEPC vode i, nakon dodavanja 1/10 zapremine Na-acetata i 1/4 zapremine 70% etanola, inkubiran je 90 min na -70°C. Sadržaj je, potom, centrifugiran 30 min na 12000 g na 4°C. Supernatant je odliven, a talog ispran etanolom i nakon 10 min sušenja u laminaru, resuspendovan je dodavanjem 50 µl DEPC vode. Uzorci RNK su čuvani na -70°C.

Integritet ukupne RNK verifikovan je elektroforezom. Koncentracija izolovane RNK određena je spektrofotometrijski, prema apsorbanci na talasnoj dužini od 260 nm (A_{260}), prema formuli: [ukupna RNK] ($\mu\text{g/ml}$) = $40 \times A_{260} \times \text{razblaženje}$

3.8.2. RT-PCR analiza

Tretman DNazom je vršen u reakcionoj smeši zapremine 10 µl sa komponentama prikazanim u Tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Komponente (μl) pojedinačne reakcije tretmana DNazom.

| | |
|--|------|
| H ₂ O | 5,75 |
| 10 x pufer za DNazu (Fermentas) | 1,00 |
| DNaza (Fermentas, 5 U/ μl) | 1,00 |
| RNaze inhibitor (Fermentas, 40U/ μl) | 0,25 |
| RNK (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 2,00 |

Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1 µl EDTA (Fermentas) i inkubiranjem 10 min na 65°C.

Reverzna transkripcija (RT) vršena je pomoću *GeneAmp[®] Gold RNA PCR Reagent Kit*-a (Applied Biosystems). Svaka pojedinačna RT reakcija, zapremine od 20 µl, sadržala komponente prikazane u Tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Komponente (μl) pojedinačne reakcije reverzne transkripcije.

| | |
|---|-----|
| H ₂ O | 4,7 |
| 5 x pufer | 4,0 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,0 |
| dNTP (10 mM) | 2,0 |
| DTT (100 mM) | 2,0 |
| oligo-DT | 0,5 |
| RNAase inhibitor (20 U/ μl) | 0,5 |
| MultiScribe® transkriptaza | 0,3 |
| RNK (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 4,0 |

Reakciona smeša je inkubirana 10 min na 25°C, a reakcija je prekinuta inkubacijom 12 min na 42°C.

PCR reakcijom je umnožena cDNK dobijena reverznom transkripcijom. Svaka pojedinačna PCR reakcija, zapremine od 25 μl , sadržala je komponente prikazane u Tabeli 3.6.

Tabela 3.6. Komponente (μl) pojedinačne PCR reakcije nakon reverzne transkripcije.

| | |
|--|-------|
| H ₂ O | 7,50 |
| 5x pufer | 3,00 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,75 |
| dNTP (10 mM) | 1,00 |
| prajmer 1 (5 μM) | 1,25 |
| prajmer 2 (5 μM) | 1,25 |
| Taq DNK polimeraza (5 U/ μl) | 0,25 |
| cDNK | 10,00 |

Prajmeri korišćeni za amplifikaciju fragmenata od 282 bp iz kodirajućeg regiona *OCI* gena:

F *OCI*: - GAC GGA GGG CCG GTG CTT -3'

R *OCI*: 5'- ATC GAC AGG CTT GAA CTC CT -3'

Prajmeri korišćeni za amplifikaciju fragmenata od 312 bp iz kodirajućeg regiona *OCII* gena:

F *OCII*: 5'- GAG GAG GCG CAG AGC CAC -3'

R *OCII*: 5'- GGT GGC GTC GTC GAG GGG -3'

Uslovi PCR reakcije: 1 ciklus denaturacije od 5 min na 95°C, 40 ciklusa: denaturacija 1 min na 95°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C (*OCT*) ili na 53°C (*OCTI*) i ekstenzija 2 min na 72°C, 1 ciklus finalne ekstenzije od 10 min na 72°C.

Elektroforeza DNK, RNK i PCR produkata vršena je prema standardnoj proceduri (*Sambrook* i sar. 1989) u 1,5% agaroznom gelu, u 1xTBE puferu sa 0,5 µg/ml etidijumbromida, pri konstantnom naponu od 74 V (aparatus za horizontalnu elektroforezu BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Gelovi su fotografisani na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA). PCR i RT-PCR analize su ponovljene po tri puta.

3.9. Analiza rekombinantnih proteina

Akumulacija rekombinantnih orizacistatina analizirana je imunoblot metodom, a biološka aktivnost akumuliranih rekombinantnih proteina verifikovana je analizom inhibicije cisteinske proteinaze papaina. Listovi 2 meseca starih netransformisanih i transformisanih aklimatizovanih biljaka su povređeni zasecanjem makazama 3-4 puta sa svake strane lista, izbegavajući glavne lisne nerve. Proteini su izolovani 24h nakon mehaničkog povređivanja listova.

3.9.1. Izolacija proteina

Solubilni proteini su izolovani korišćenjem vodenog rastvora pufera niske jonske jačine bez redukujućih agenasa i uz dodatak PVP-a za uklanjanje fenola, prema *Michaud* i *Vrain*-u (1998). Pošto su cistatini iz pirinča termostabilni, u ekstrakciju je uključen i dodatni korak prečišćavanja zagrevanjem.

Sastav ekstrakcionog pufera:

100mM kalijum-fosfatni pufer (pH 6,5) sa 1mM (v/v) EDTA, 1mM (v/v) PMSF i 1,0% (w/v) PVP.

Ekstrakcija proteina: 24h nakon povređivanja, listovi su, pomoću tečnog azota, mehanički usitnjeni u avanima i homogenizovani u ekstrakcionom pufera u odnosu 1:1 (w:v). Homogenat je prečišćen centrifugiranjem 15min na 14000 g i temperaturi od 4°C. Solubilna frakcija je, potom, dodatno prečišćena zagrevanjem 10 min na 80°C i hlađenjem na 4°C a precipitirani, termolabilni materijal je uklonjen centrifugiranjem 10 min na 12000 g i temperaturi od 4°C. Supernatant je, liofilizovanjem proteina i njihovim ponovnim rastvaranjem, ukoncentrovan 10 puta. Sadržaj proteina u rezultujućoj solubilnoj frakciji određen je standardnom procedurom po *Bradford*-u (1976). Ovako dobijeni, delimično prečišćeni, proteinski ekstrakt je kao izvor rekombinantnih OCI i OCII čuvan na -70°C.

3.9.2. SDS-PAGE i imunoblot

Razdvajanje proteina je izvršeno denaturišućom SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel*) elektroforezom u 15% poliakrilamidnom razdvajajućem gelu (*Laemmli* 1970). Nakon transfera proteina sa gela na nitroceluloznu membranu blotovi su procesuirani prema *Momčilović* i *Ristić*-u (2007). Za detekciju antigenih proteina korišćen je metod pojačane hemiluminiscencije (eng. *Enhanced Chemiluminescence*, ECL).

Sastav pufera za SDS-PAGE:

- 2x pufer za uzorke (eng. *Sample Buffer*, SB): 62mM (v/v) Tris-HCl (pH 6,5), 2,5% (w/v) bromfenol plavo, 2,0% (w/v) SDS, 10,0% (v/v) glicerol i 0,5% (v/v) β-merkaptetanol dodat neposredno pre upotrebe pufera.
- Pufer za elektroforezu (eng. *Running Buffer*): 25mM (w/v) Tris, 192mM (w/v) glicin, 0,1% (w/v) SDS.

Sastav pufera za transfer na membranu:

- *Transfer Buffer*: 25mM (w/v) Tris i 192mM (w/v) glicin.

Sastav pufera i rastvora za imunoblot:

- TBS (eng. *Tris Buffered Saline*): 20mM (w/v) Tris (pH 7,5) i 0,1M (w/v) NaCl.
- T-TBS (eng. *Tris Tween Buffered Saline*): TBS sa 0,1 % (v/v) Tween 20.
- 5% (w/v) i 10% (w/v) rastvor nemasnog mleka u prahu (eng. *Non Fat Dry Milk*, NFDM) u T-TBS puferu.

- Detekcioni ECL reagens: 43,4µl 90mM p-kumarne kiseline, 100 µl 250mM 3-amino ftalidrazida (luminol) i 14,2 µl 12% H₂O₂ u 10 ml 100mM TRIS-HCl (pH 8,5).

Primarno antitelo: poliklonsko anti-OCI antitelo, (poklon Dr Lise Jouanin, INRA, Versai, France; *Leple* i sar. 1995), koje reaguje sa oba cistatina iz pirinča, usled međusobne homologije (55–78%) aminokiselinskih sekvenci (*Kondo* i sar. 1990).

Sekundarno antitelo: kozje anti-zečje IgG antitelo konjugovano sa peroksidazom iz rena (IgG-HRP, product No. A0545, Sigma Aldrich).

SDS-PAGE elektroforeza: Uzorci su pripremani mešanjem ekstrakta proteina sa 2xSB u odnosu 1:1 (v:v) i inkubirani su 4 min na 95°C. Nakon hlađenja do 4°C, uzorci su centrifugirani 4 min na 10000 g i nanošeni su na gel u količini koja je ekvivalentna zapremini u kojoj se nalazi 50µg proteina. Proteini su razdvojeni elektroforezom pomoću *Mini-Protein II sistema* (Bio-Rad) u *Running Buffer-u*, u trajanju od 90 min pri konstantnom naponu od 150V. Za određivanje molekulske mase proteina korišten je obojeni proteinski marker opsega 10-260 kDa (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, 10-260 kDa*, Fermentas).

Transfer proteina sa gela na PVDF membrane (Bio-Rad) vršen je u *Transfer Buffer-u*, korišćenjem Bio-Rad transfer sistema, na 80V u trajanju od 90 min.

Imunološka detekcija: Membrane su, nakon transfera proteina, “blokirane“ inkubiranjem u 10% rastvoru NFDm na 4°C preko noći. Nakon ispiranja u T-TBS-u (2x10min) membrane su inkubirane sa primarnim antitelom razblazenja 1:1000 (v:v) u 5% NFDm rastvoru, 2h na sobnoj temperaturi. Potom su ispirane u T-TBS-u (2x1min, 3x10min) i inkubirane sa sekundarnim antitelom razblazenja 1:20000 (v:v) u 5% NFDm rastvoru, 2h na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja u T-TBS membrane su inkubirane 5 min u ECL detekcionom reagensu i izložene filmu (Kodak X-Omat LS film, Sigma Aldrich) u trajanju ekspozicije od 2 do 10 min.

Razdvajanje i detekcija antigenih proteina je ponovljena dva puta.

3.9.3. Kvantitativna analiza aktivnosti rekombinantnih proteina

Aktivnost rekombinantnih inhibitora cisteinskih proteinaza analizirana je, uz manje modifikacije, prema metodi koju su opisali *Michaud* i *Vrain* (1998). Cisteinska proteinaza papain, koju inhibiraju kako OCI tako i OCII, korišćena je kao test enzim. Kao supstrat korišćen je azokazein, hromogeni derivat kazeina. Detekcija proteazne aktivnosti zasniva se na detekciji obojenih peptida male molekulske mase, koji nastaju proteolizom supstrata i ostaju u reakcionoj smeši nakon precipitacije supstrata u kiseloj sredini. Aktivnost papaina je analizirana nakon njegove preinkubacije sa različitim količinama solubilnih proteina izolovanih iz netransformisanih i transgenih biljaka 24 h nakon mehaničkog povređivanja listova.

Sastav pufera i rastvora:

- Ekstrakcioni pufer: 100mM kalijum-fosfatni pufer (pH 6,5) sa 1mM (v/v) EDTA i 1mM (v/v) PMSF.
- Proteolitički pufer za papain: 100mM kalijum-fosfatni pufer (pH 6,5) sa 1mM (v/v) EDTA, 5mM (v/v) L-cistein (Sigma), 0,1% (v/v) Triton-X 100.
- Rastvor papaina: 20 µg papaina (~0.2 jedinice)/mL proteolitičkog pufera. Čuvan na -20°C do upotrebe. Papain (E.C.3.4.22.2, from papaya latex, Sigma)
- Rastvor azokazeina: 2% (w/v) azokazein (Sigma) rastvoren u proteolitičkom puferu. Rastvor je pripreman neposredno pre upotrebe.
- Rastvor trihlorsirćetne kiseline (TCA): 100% (w/v) TCA (Sigma) u vodi. Čuvan na 4°C do upotrebe.

In vitro inhibicija papaina rekombinantnim proteinima: U ependorf epruvete zapremine 1,5 ml koje su sadržale 100 µl u puferu rastvorenog papaina (~ 2 µg papaina) ili 100 µl proteolitičkog pufera (kontrolni uzorci) dodate su različite količine solubilnih proteina izolovanih iz netransformisanih i transgenih listova (0-30 µg) i konačna zapremina je podešena na 400 µl dodavanjem ekstrakcionog pufera. Smeša je inkubirana 10 min na 37°C kako bi se omogućila inhibicija papaina sa rekombinantnim OCI i OCII prisutnim u proteinskom ekstraktu. U svaku epruvetu je, potom, dodato 400 µl 2% rastvora azokazeina i smeša je inkubirana u vodenom kupatilu, 180 min na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 75µl rastvora 100% TCA i smeša je inkubirana 15

min na ledu kako bi se omogućila potpuna precipitacija preostalog azokazeina. Nakon centrifugiranja 5 min na 12000 g i 4°C, 750 µl supernatanta je prebačeno u epruvete sa 750 µl 1N NaOH, kako bi se povećanjem pH omogućilo razvijanje boje. Apsorbanca smeše na talasnoj dužini od 440 nm (A_{440}) je određena tako što je od svake količine testiranog proteinskog ekstrakta oduzeta odgovarajuća vrednost izmerena u kontrolnim uzorcima (uzorci bez papaina). Dobijene vrednosti su izražene na relativnom nivou, u odnosu na A_{440} izmerenu za aktivnost papaina u odsustvu proteinskog ekstrakta listova krompira (100% aktivnosti).

Analiza je ponovljena tri puta, a svaki uzorak je rađen u duplikatu.

3.10. Morfološke karakteristike transformisanih linija krompira

Radi utvrđivanja eventualnih fenotipskih razlika između netransformisanih i transformisanih biljaka praćene su sledeće morfološke karakteristike:

- dužina izdanka
- broj nodusa
- broj bočnih pupoljaka
- broj korenova

Morfološki parametri su praćeni za tri transformisane linije i netransformisanu kontrolu svake od tri ispitivane sorte krompira, pri veličini uzorka od 30 biljaka starosti 4 nedelje i gajenih *in vitro*.

3.11. Biotest sa larvama krompirove zlatice

Listovi sa jajima krompirove zlatice sakupljeni su u regionu Sremske Mitrovice polovinom jula meseca 2010. godine, sa hemijski netretiranih biljaka krompira sorte Dezire. Listovi su, do izleganja larvi, držani na vlažnom filter papiru, u petri kutijama, na temperaturi $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.11.1. Dizajn biotesta

Neposredno nakon izleganja, nasumično izabrane larve su prebačene na listove kontrolnih i transformisanih biljaka krompira. Listovi su odsecani sa 3 meseca starih biljaka gajenih u uslovima staklenika i postavljeni u petri kutije na vlažni filter papir. Da bi se sprečilo isušivanje listova, petiole su obmotavane vatom i držane u ependorf epruvetama sa vodom. Na listove netransformisane kontrole i dva transformisana klona svake sorte krompira prebačeno je po 30 larvi koje potiču iz nekoliko različitih skupina jaja, pri čemu su larve poreklom iz iste skupine jaja ravnomerno raspoređene na kontrolne i transformisane listove. Po 5 larvi prvog stupnja (L1) je zajedno gajeno u petri kutijama dimenzija 1,2 cm x 8,5 cm u kontrolisanim uslovima (temperatura $T=28\pm 1^{\circ}\text{C}$; fotoperiod 16L:8D; intenzitet svetlosti $I=30160\text{ cd}$; relativna vlažnost $\text{RH}=60\pm 5\%$). Neposredno po ulasku u drugi stupanj (L2) larve su razdvojene i pojedinačno gajene u petri kutijama. Po 15 nasumično izabranih larvi za svaki tretman gajeno je pod istim uslovima kao i L1. Svaka 24h larve su hranjene svežim listovima, u uslovima *ad libitum* ishrane.

3.11.2. Parametri rasta i razvića insekata

Tokom L1 praćeno je preživljavanje larvi i određeno je trajanje prvog stupnja razvića. Počev od L2, za svaku larvu krompirove zlatice, svakodnevno su praćeni sledeći parametri:

- procenat preživljavanja
- trajanje svakog stupnja razvića
- masa larvi
- stepen oštećenja listova

Nakon ulaska larvi u prepupalnu fazu praćeno je trajanje narednih faza razvića krompirove zlatice: stadijuma lutke i adulta.

Trajanje razvića za larvene stupnjeve određivano je posmatranjem presvlačenja larve iz jednog stadijuma u naredni ($\pm 1d$). Larveni stupnjevi razlikovani su prema veličini glavene kapsule.

Stepen oštećenja listova odredivan je merenjem mase listova pre i posle 24h ishrane larvi. Da bi se izbegla greška u merenju usled delimičnog isušivanja, listovi su, pre i posle ishrane larvi, potapani u destilovanu vodu 1h i mereni nakon resaturacije vodom. Pri ovakvom merenju, utvrđeno je da su variranja u masi listova nakon 24h manja od 3,5%. Vrednosti dobijene dnevnim merenjem sabirane su da bi se dobila ukupna količina konzumiranih listova (stepen oštećenja listova) za svaku pojedinačnu larvu.

3.11.3. Analiza podataka

Brzina konzumacije hrane (eng. *consumption rate*, CR) i brzina rasta (eng. *growth rate*, GR) računata su prema sledećim formulama:

$$CR \text{ (mg/d)} = \text{količina konzumiranih listova/vreme razvića}$$

$$GR \text{ (mg/d)} = \text{postignuta masa larvi/ vreme razvića}$$

Relativna brzina konzumacije hrane (eng. *relative consumption rate*, RCR) i relativne brzina rasta (eng. *relative growth rate*, RGR) su računata prema sledećim formulama:

$$RCR \text{ (%/d)} = \text{količina konzumiranih listova/(maksimalana masa x vreme)}$$

$$RGR \text{ (%/d)} = \text{postignuta masa larvi/(maksimalna masa x vreme)}$$

Efikasnost konverzije unete hrane u biomasu larve (eng. *conversion efficiency of ingested food*, ECI) računata je prema jednačini:

$$ECI \text{ (%)} = \text{postignuta masa larvi/ količina konzumiranih listova}$$

Postignuta masa larvi je definisana kao masa larvi na određenom stadijumu razvića, a maksimalna masa je definisana kao masa kasnog L4 stadijuma pre ulaska u prepupalnu fazu.

3.11.4. Analiza proteolitičke aktivosti

Digestivna proteolitička aktivnost larvi krompirove zlatice analizirana je na trećem stupnju razvića (L3), kod larvi koje su se hranile kontrolnim, netransformisanim listovima, OCI/OCII listovima tokom celokupnog razvića (hronični efekat) i 24h nakon prebacivanja L3 larvi sa kontrolnih na transformisane listove krompira (akutni efekat).

Ekstrakcija digestivnih proteaza je vršena homogenizovanjem celih L3 larvi (*Overney* i sar. 1997) u 0,9% rastvoru NaCl, u odnosu 1:5 (w:v). Homogenizovanje je vršeno na ledu, 3x10 sekundi pri brzini 20000 obrtaja/min (Ika-Werk Ultra turrax, 20000 rpm). Homogenat je potom sonifikovan (3 x 15 sec) a insolubilni materijal je uklonjen subsekventnim centrifugiranjem (10 min na 5000 g i 20 min na 16000 g, na 4°C). Dobijeni supernatant, koji sadrži digestivne enzime larvi krompirove zlatice je čuvan na -20°C, do određivanja aktivnosti. Koncentracija proteina je utvrđena metodom po *Bradford*-u (1976), koristeći BSA kao standard.

Detekcija proteolitičke aktivnosti vršena je na pH optimumu za analiziranu proteazu: pH 6,5 za ukupnu, azokazeinaznu aktivnost; pH 5,5 za specifičnu aktivnost cisteinskih proteinaza (SACP); pH 7,5 za specifičnu aktivnost leucin aminopeptidaza (SALAP). Za svaki uzorak analiza je rađena u duplikatu, uključujući 3-6 nezavisnih izolata digestivnih enzima za svaki tretman.

Sastav pufera i rastvora:

- Pufer pH 6,5 za određivanje ukupne aktivnosti proteaza: 0,1M kalijum-fosfatni pufer sa 5mM (w/v) MgCl₂ i 0,15M (w/v) NaCl.
- Pufer pH 5,5 za određivanje aktivnosti cisteinskih proteaza: 0,1M Na-citratni pufer sa 5mM (w/v) MgCl₂ i 0,15M (w/v) NaCl.

- Pufer pH 7,5 za određivanje aktivnosti leucin aminopeptidaze: 0,1M TRIS-HCl pufer sa 5mM (w/v) MgCl₂ i 0,15M (w/v) NaCl.
- Supstrat za ukupnu aktivnost proteaza: 2% (w/v) azokazein rastvoren u proteolitičkom puferu pH 6,5.
- Supstrat za cisteinske proteinaze: 30mM (w/v) BApNa rastvoren u DMSO.
- Supstrat za leucinaminopeptidazu: 30mM (w/v) LpNa rastvoren u DMSO.
- Za precipitaciju nedigestovanih proteina i prekidanje enzimske reakcije ukupnih proteaza korišćen je 25% (w/v) rastvor TCA u vodi.
- 10% (v/v) sirćetna kiselina je korišćena za prekidanje reakcije cisteinskih proteaza i leucinaminopeptidaze.

Ukupna digestivna aktivnost određivana je azokazeinskim esejem, prema modifikovanoj metodi koju su opisali *Michaud* i saradnici (1994). 10 µl alikvota proteniskog ekstrakta je, najpre, preinkubirano sa 50mM (v/v) L-cisteinom i 10mM (v/v) EDTA, 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon aktivacije, zapremina je podešena na 100 µl dodavanjem proteolitičkog pufera pH 6,5, i smeša je dodatno preinkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Potom je dodato 100 µl 2% rastvora azokazeina i reakciona smeša je inkubirana u vodenom kupatilu, 180 min na 37°C. Proteoliza je prekinuta dodavanjem 50 µl rastvora TCA, a nedigestovani azokazein je uklonjen centrifugiranjem 10 min na 10000 g. Supernatant je pomešan sa 1M NaOH u odnosu 1:1 i određena je absorbanca smeše na talasnoj dužini od 440 nm (A_{440}).

SACP određivana je prema metodi koju su opisali *Ortego* i saradnici (1996), prilagođenoj manjim količinama uzorka za korišćenje mikrotitar ploče, uz korišćenje sintetičkog supstrata N-benzoil-DL arginin *p*-nitroanilida (BApNa). Metoda se zasniva na oslobađanju *p*-nitroanilina digestijom supstrata, i njegovoj detekciji na talasnoj dužini od 405 nm. 10 µl alikvota proteniskog ekstrakta je preinkubirano sa 10mM (v/v) L-cisteinom i 3mM (v/v) EDTA, 30 min na 30°C. Nakon aktivacije, zapremina smeše je, dodavanjem proteolitičkog pufera pH 5,5, podešena na 110 µl. Nakon 5min preinkubacije dodato je 10 µl supstrata (2,5mM BApNa, finalno), i reakciona smeša je inkubirana 60 min na 37°C. Reakcija je prekinuta dodavanjem 120 µl sirćetne kiseline i određena je absorbanca smeše (A_{405}).

SALAP određivana je prema modifikovanoj metodi *Ortego*-a i saradnika (1996), zasnovanoj na oslobađanju p-nitroanilina digestijom sintetičkog supstrata L-leucin p-nitroanilida (LpNa). Reakciona smeša u kojoj se nalazilo 1 µl proteinskog ekstrakta, 109 µl proteolitičkog pufera pH 7,5 i 10 µl supstrata (2,5mM LpNa, finalno) je inkubirana 60 min na 37°C. Reakcija je prekinuta dodavanjem 120 µl sirćetne kiseline i određena je apsorbancama smeše (A_{405}).

Reakcione smeše koje nisu sadržale proteinski ekstrakt (blank-supstrat) ili supstrat (blank-enzim), kao ni proteinski ekstrakt ni supstrat (blank-blank) - podvrgnute istoj proceduri kao testirani uzorci - služile su kao eksperimentalni blankovi. Apsorpcija je merena na spektrofotometru za mikrotitar ploče "Thermo-Multiskan Spectrum 2.2" (MSS). Specifične aktivnosti enzima su izražene u enzimskim jedinicama po mg proteina (U/mg). Jedinica enzimске aktivnosti (U) je definisana kao količina enzima koja uzrokuje promenu apsorbance od 1,0/h u uslovima eksperimenta.

3.12. Obrada podataka

Numerički podaci su statistički obrađivani primenom računarskog programa Statgraphic Plus Version 2.1. i izraženi su kao srednja vrednost \pm standardna greška (eng. *Standard Error*, SE). Određivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti vršeno je jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA). Ukoliko su razlike između srednjih vrednosti pokazivale statističku značajnost, analizirane su testom najmanje značajnih razlika (eng. *Least Significant Difference*, LSD) pri nivou značajnosti od $P \leq 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Ko-transformacija sojevima *A. tumefaciens* koji nose *OCI* i *OCII* gen

U cilju dobijanja transgenih linija koje eksprimiraju dva cistatina pirinča (*OCI* i *OCII*), odsecci listova tri sorte krompira, *Dezire*, *Dragačevka* i *Jelica*, su istovremeno inokulisani sa dva soja *A. tumefaciens* EHA101, od kojih svaki nosi po jedan orizacistatinski gen.

4.1.1. Indukcija kalusa i regeneracija pupoljaka

Na podlozi za indukciju kalusa (CIM: MS podloga + 0,2 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP), pojava kalusa je uočena nakon 7-10 dana na obodima eksplantata, kako na kontrolnim tako i na odseccima listova inokuliranim sa *A. tumefaciens*. Istovremeno, formiranje kalusa na kontrolnim odseccima listova na selektivnoj podlozi (sCIM) je u potpunosti izostalo (Slika 4.1). Sorte *Dezire* i *Dragačevka* pokazale su visoku efikasnost formiranja kalusa dok je, u odnosu na njih, efikasnost formiranja kalusa kod sorte *Jelica* značajno manja (Tabela 4.1). Efikasnost formiranja kalusa nakon inokulacije je značajno smanjena kod sve tri sorte krompira.

Prebacivanje kalusa na podlogu za indukciju izdanaka (SIM: MS podloga sa 2,0 mg/l BAP i 5,0 mg/l GA₃) iniciralo je pojavu pupoljaka, koja je uočena nakon 10 dana kod sorti *Dezire* i *Dragačevka* i nakon 15 dana kod sorte *Jelica*. Nakon 4 nedelje na SIM podlozi preko 75,0% kalusa poreklom sa inokuliranih odsečaka listova sorti *Dezire* i *Dragačevka* formiralo je oko 7 izdanaka po eksplantatu, dok je, u odnosu na njih, sorta *Jelica* pokazala do 35,6% manju efikasnost regeneracije sa do 42,6% manje izdanaka po eksplantatu (Tabela 4.1; Slika 4.2). Nakon inokulacije, u poređenju sa kontrolnim, neinokuliranim odseccima listova na neselektivnoj podlozi, kod svih sorti krompira zabeleženo je značajno smanjenje efikasnosti formiranja kalusa (do 15,2%), efikasnosti regeneracije (do 21,9%) i prosečnog broja regenerisanih izdanaka po eksplantatu (do 39,5%) (Tabela 4.1).

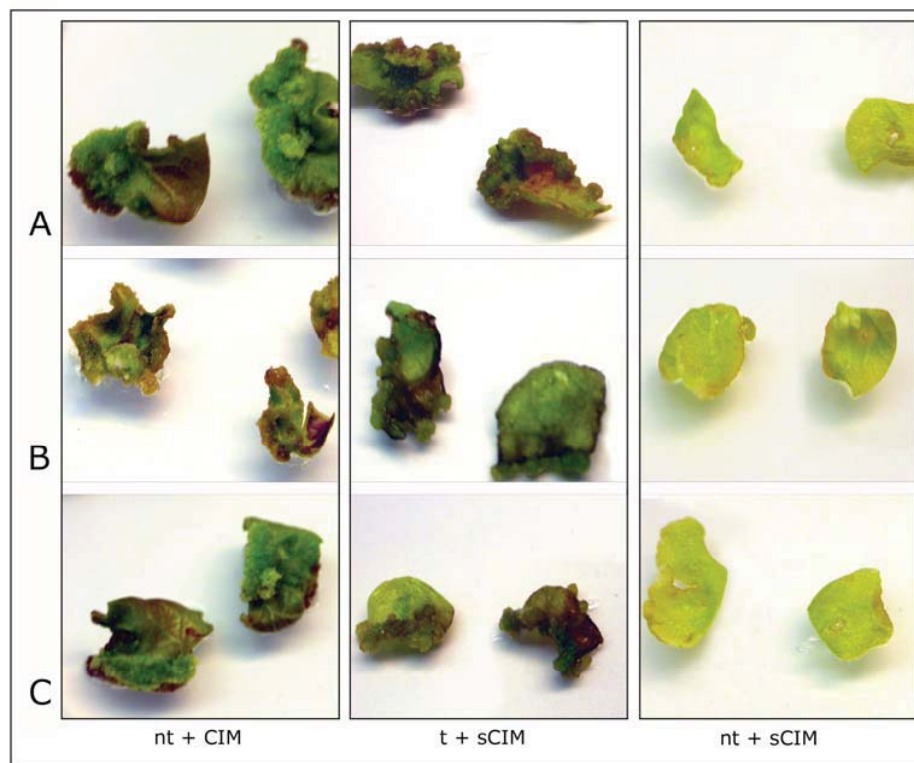
Tabela 4.1. Indukcija kalusa nakon 2 nedelje na CIM podlozi i regeneracija izdanaka nakon 4 nedelje na SIM podlozi na neinokulisanim (kontrola) i inokulisanim (OCI+OCII) odsećcima listova tri sorte krompira.

| kontrola | efikasnost formiranja kalusa ± SE (%) [*] | kalusi sa pupoljcima ± SE (%) ^{**} | broj izdanaka po kalusu ± SE |
|-------------------|--|---|------------------------------|
| Dezire | 98,0 ± 1,2 ^c | 96,0 ± 0,7 ^e | 8,52 ± 0,52 ^c |
| Dragačevka | 99,0 ± 1,0 ^c | 95,0 ± 0,4 ^e | 8,97 ± 0,55 ^c |
| Jelica | 85,0 ± 2,1 ^b | 61,0 ± 0,7 ^b | 6,97 ± 0,48 ^b |
| OCI + OCII | | | |
| Dezire | 85,0 ± 1,6 ^b | 75,0 ± 0,7 ^c | 6,94 ± 0,61 ^b |
| Dragačevka | 84,0 ± 1,9 ^b | 78,0 ± 0,4 ^d | 7,17 ± 0,58 ^b |
| Jelica | 77,0 ± 2,5 ^a | 58,0 ± 0,7 ^a | 4,11 ± 0,50 ^a |

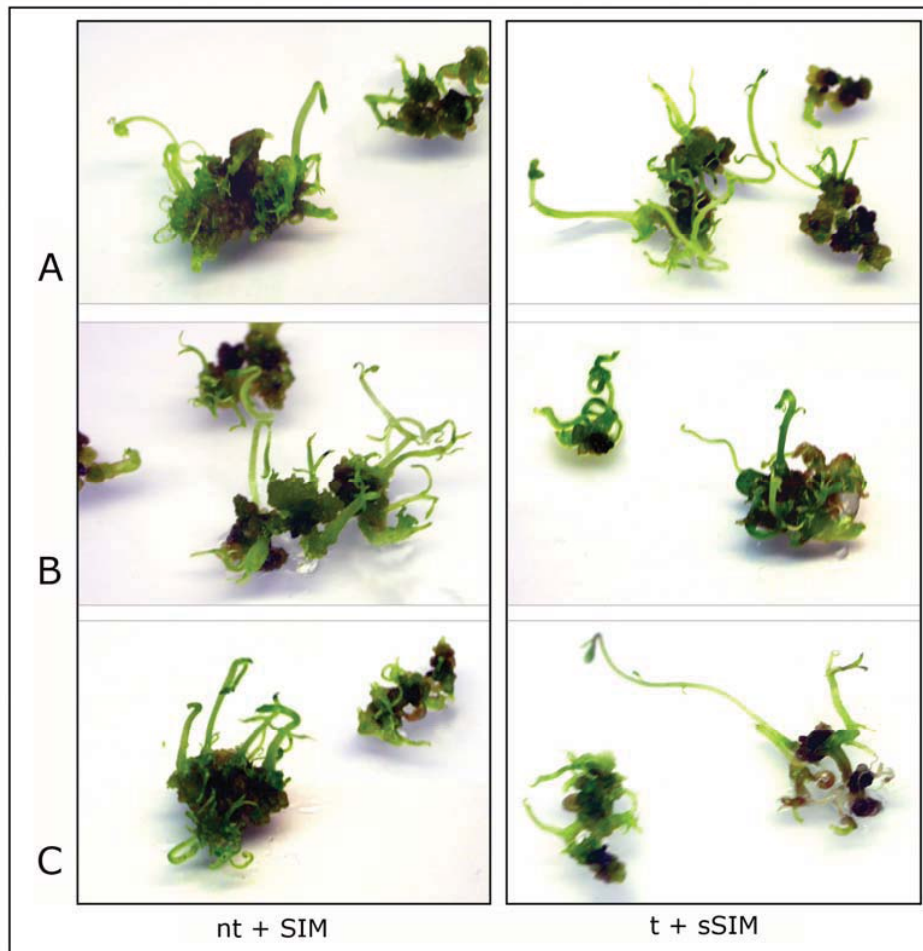
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE); n=100 za kontrolu; n=200 za inokulisane eksplantate, kod svake sorte krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$).

^{*}na podlozi za indukciju kalusa, izraženo kao srednja vrednost broja eksplantata koji formiraju kalus po petri kutiji/ broj eksplantata

^{**}na podlozi za indukciju pupoljaka, izraženo kao srednja vrednost broja kalusa sa pupoljcima po petri kutiji/ broj eksplantata

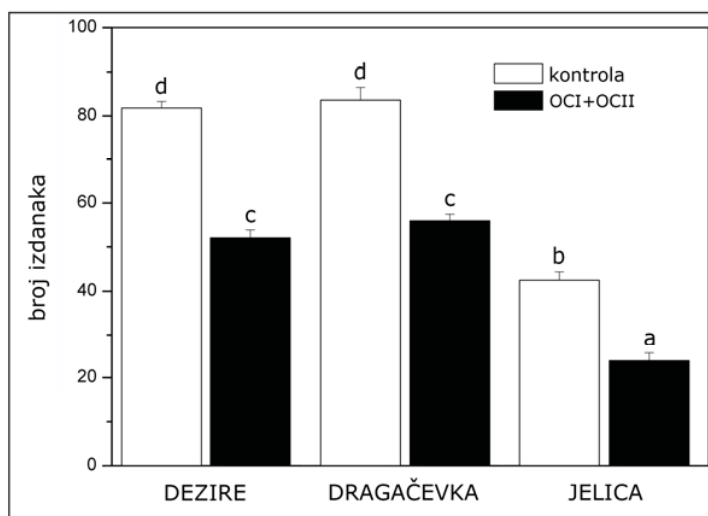


Slika 4.1. Formiranje kalusa na kontrolnim, neinokulisanim odsećcima listova (nt) i na odsećcima listova inokulisanim istovremeno sa sojevima *A. tumefaciens* koji nose OCI ili OCII gen (t) nakon 2 nedelje na podlozi za indukciju kalusa bez antibiotika (CIM) ili sa selektivnom koncentracijom kanamicina od 75 mg/l (sCIM). (A) Dezire; (B) Dragačevka; (C) Jelica.



Slika 4.2. Indukcija izdanaka iz kontrolnih, netransformisanih kalusa (nt) i iz kalusa nastalih na odsečcima listova inokulisanim sa sojevima *A. tumefaciens* koji nose *OCI* ili *OCII* gen (t) nakon 4 nedelje na podlozi za idukciju izdanaka bez antibiotika (SIM) ili sa selektivnom koncentracijom kanamicina od 75 mg/l (sSIM). (A) Dezire; (B) Dragačevka; (C) Jelica.

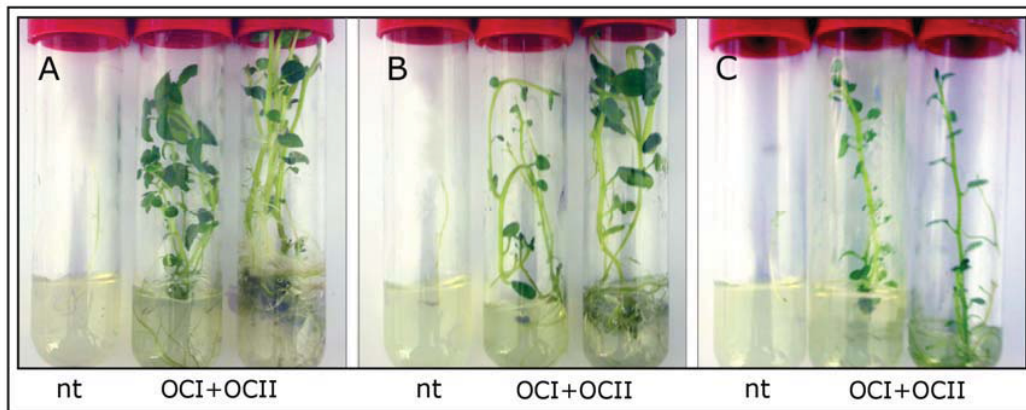
Iz perspektive ukupnog broja dobijenih izdanaka (Grafik 4.1) sorte Dezire i Dragačevka su, nakon inokulacije i na selektivnoj podlozi, zadržale prosečno 65,8% od svog normalnog (kontrolnog) regenerativnog potencijala, dok taj odnos za sortu Jelica iznosi 56,1%. Takođe, u poređenju sa sortama Dezire i Dragačevka, regenerativni potencijal odsečaka listova sorte Jelica je značajno niži (do 49,1% za kontrolne i do 57,3% za eksplantate inokulisane sa *A. tumefaciens*).



Grafik 4.1. Regenerativni potencijal neinokulisanih (kontrola) i odsečaka listova inokulisanih sa sojevima *A. tumefaciens* koji nose *OCI* ili *OCII* gen (*OCI+OCII*), nakon 4 nedelje na podlozi za indukciju izdanaka. Regenerativni potencijal je predstavljen kao ukupan broj izdanaka na 10 odsečaka listova. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (SE); n=100. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$).

Nakon prebacivanja pojedinačnih izdanaka (po jedan nasumično izabrani izdanak sa svake kalusne mase; 50 izdanaka za svaku sortu krompira) na selektivnu podlogu za indukciju korenova (RIM: MS podloga sa cefotaksimom 300 mg/l i kanamicinom 100 mg/l) formiranje korenova se moglo uočiti posle 7-10 dana kod izdanaka poreklom iz eksplantata listova inokulisanih sa *A. tumefaciens*. Procenat ožiljenih potencijalnih transformanata iznosio je 94% za Dezire, 96% za Dragačevku i 88% za Jelicu. Formiranje korenova kod kontrolnih, netransformisanih izdanaka na selektivnoj podlozi je u potpunosti izostalo, a njihov rast je bio značajno usporen (Slika 4.3). Istovremeno, procenat ožiljenih netransformisanih izdanaka na neselektivnoj RIM podlozi iznosio je 100%.

Pojedinačni ožiljeni izdanci su putem kulture jednonodalnih odsečaka umnoženi na MS podlozi bez regulatora rastenja i označeni kao zasebne, potencijalno transformisane linije.

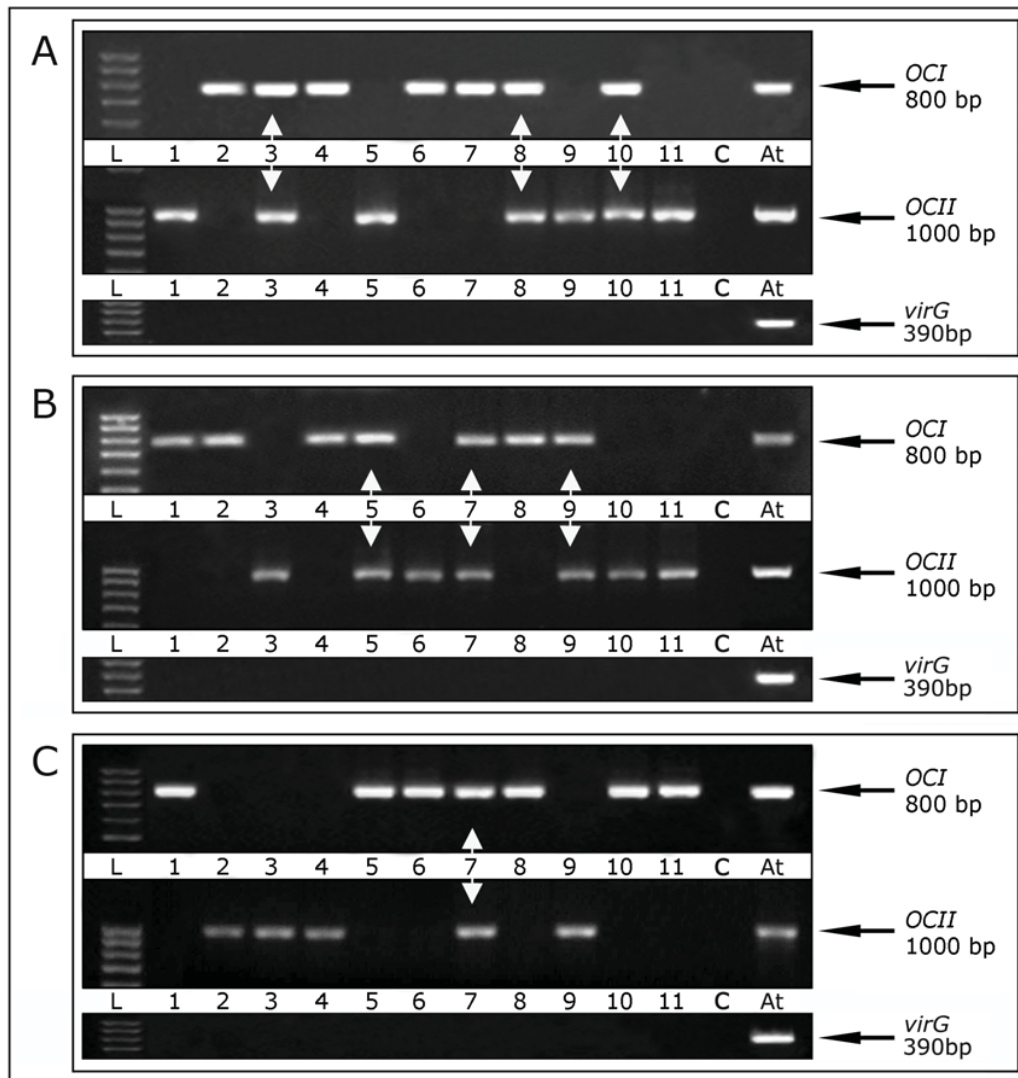


Slika 4.3. Ožiljavanje netransformisanih, kontrolnih (nt) i ko-transformisanih (OCI+OCII) izdanaka nakon 4 nedelje na selektivnoj podlozi za indukciju korenova: (A) Dezire; (B) Dragačevka; (C) Jelica.

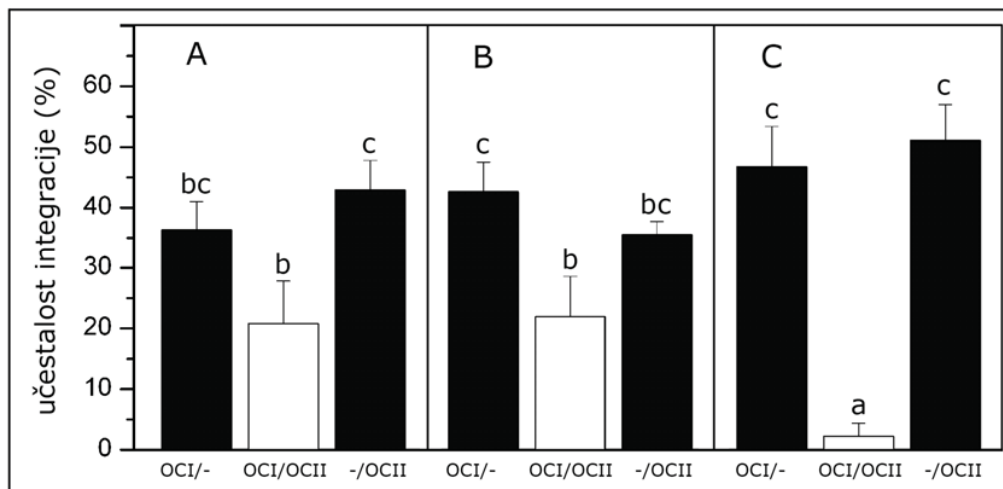
4.1.2. PCR analiza potencijalnih ko-transformanata

PCR analizom genomske DNK izolovane iz potencijalnih OCI/OCII ko-transformanata potvrđeno je prisustvo produkata amplifikacije očekivane veličine od 800bp (OCI) i/ili 1000bp (OCII) kod svih analiziranih linija i njihovo odsustvo kod odgovarajućih, netransformisanih kontrolnih uzoraka. Odsustvo amplifikacije fragmenta od približno 390bp, koji pokriva sekvencu *virG* gena, potvrdilo je da analizirane OCI/OCII linije nisu kontaminirane agrobakterijama (Slika 4.4).

Frekvencija kointegracije oba orizacistatinska gena (Grafik 4.2) kod sorti Dezire i Dragačevka ne pokazuje značajne razlike i između je 20 i 22% (6/30 i 6/28). Nasuprot tome, kointegracija *OCI* i *OCII* gena za sortu Jelica pokazuje neočekivano nisku vrednost od 2,2% (1/45), oko 10 puta manju od sorti Dragačevke i Dezire. Sa druge strane, transformisane linije kod kojih je nakon simultane inokulacije došlo do integracije samo jednog gena (*OCI*- i *-/OCII*), kod svih sorti krompira, uzimaju približno jednak udeo u ukupnom broju transformanata (Grafik 4.2).



Slika 4.4. PCR analiza kontrolnih i *OCI/OCII* ko-transformisanih biljaka krompira uz korišćenje *pin2:OCI*, *pin2:OCII* i *virG* seta prajmera. (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica. L: DNA standard (100 bp DNA ladder, Serva), 1-11: potencijalne *OCI/OCII* linije, C: netransformisana kontrola, At: pozitivna kontrola za *OCI*: pGV-GFP-OCI-3.8(19) ili *OCII*: pGV-GFP-OCII-4.2A7. Strelice označavaju transformisane linije kod kojih je detektovano prisustvo oba gena.



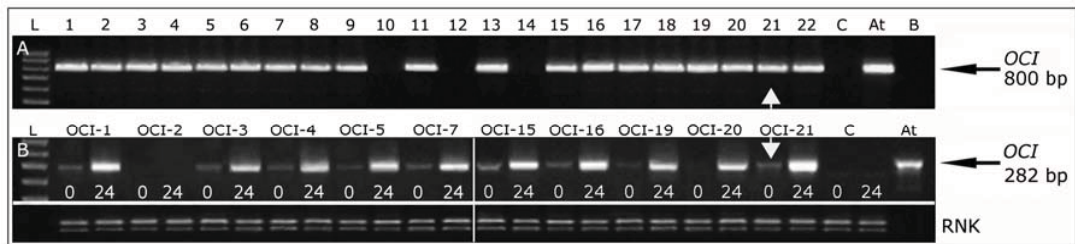
Grafik 4.2. Učestalost integracije *OCI* i *OCII* gena prilikom simultane transformacije krompira sa pGV-GFP-OCI-3.8(19) i pGV-GFP-OCII-4.2A7. Integraciona frekvencija je predstavljena kao ukupan broj PCR pozitivnih linija za samo jedan (OCI/- i -/OCII) ili oba (OCI/OCII) orizacitastinska gena; n=30 za Dezire, n=28 za Dragačevku, n=45 za Jelicu. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (SE). Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$). (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica.

4.2. Re-transformacija OCI transformisane linije sa *OCII* genom

Kako procenat dobijenih dvostrukih OCI/OCII transformanata za sortu Jelica nije bio zadovoljavajući, primenjen je alternativni pristup “slaganja” gena: re-transformacija.

4.2.1. Transformacija pomoću *A. tumefaciens* koji nosi *OCI* gen

Nakon inokulacije odsečaka listova sa *A. tumefaciens* koji nosi *OCI* gen pojava kalusa je uočena 10 dana nakon infekcije na CIM podlozi sa 50 mg/l kanamicina and 300 mg/l cefotaksima. Prebacivanje kalusnog tkiva na SIM podlogu sa istom koncentracijom antibiotika, iniciralo je pojavu pupoljaka koja je uočena nakon 14 dana (Tabela 4.2). Više od 92% nasumično izabranih regenerisanih izdanaka formiralo je korenove nakon 7 dana na selektivnoj RIM podlozi. Prema PCR analizi, prisustvo *OCI* gena potvrđeno je kod 19 od 22 analizirane potencijalno transformisane linije (Slika 4.5A). RT-PCR analiza pokazala je inducibilnu ekspresiju *OCI* gena kod 18 od 19 PCR pozitivnih OCI linija (Slika 4.5B).



Slika 4.5. Analiza OCI transformisanih linija krompira sorte Jelica. (A) Potvrda integracije *OCI* gena PCR analizom; L: DNA standard (100 bp DNA ladder, Serva), 1-22: potencijalne OCI linije, C: netransformisana kontrola, At: pozitivna kontrola za *OCI*: pGV-GFP-OCI-3.8(19), B: blank. (B) Potvrda inducibilne aktivacije i ekspresije *OCI* gena, pre (0) i 24h nakon mehaničkog povređivanja transgenih listova, RT-PCR analizom.

4.2.2. Re-transformacija OCI linije sa *A. tumefaciens* koji nosi *OCII* gen

Kao “roditeljska” linija za re-transformaciju izabrana je OCI transgena linija 21 (OCI-21), koja je pokazivala normalan fenotip i visoki nivo ekspresije *OCI* gena (Slika 4.5).

Na podlozi za indukciju kalusa (CIM: MS podloga + 0,2 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP) pojava kalusa je uočena nakon 10 dana na obodima eksplantata, kako na kontrolnim tako i na OCI transformisanim odsečcima listova inokulisanim sa *A. tumefaciens* koji nosi *OCII* gen (Tabela 4.2). Prebacivanje kalusa na podlogu za indukciju izdanaka (SIM: MS podloga sa 2,0 mg/l BAP i 5,0 mg/l GA₃) je iniciralo pojavu pupoljaka, koja je uočena posle dve nedelje. U odnosu na neinokulisane netransformisane (kontrola) i transformisane kaluse (OCI-21), pojava izdanaka na kalusima koji potiču sa inokulisanih odsečaka listova je učena do 3 dana ranije. Interesantno je da su, i neinokulisani i inokulisani, OCI-21 transformisani odsečki listova pokazali značajno veći regenerativni odgovor u odnosu na netransformisanu kontrolu (Tabela 4.2, Slika 4.6). Posmatran kao ukupan broj izdanaka regenerativni potencijal transformisane OCI-21 linije je, pre i nakon inokulacije sa *A. tumefaciens*, 3,79 i 3,98 puta povećan u odnosu na netransformisanu, početnu liniju sorte Jelica (Grafik 4.3).

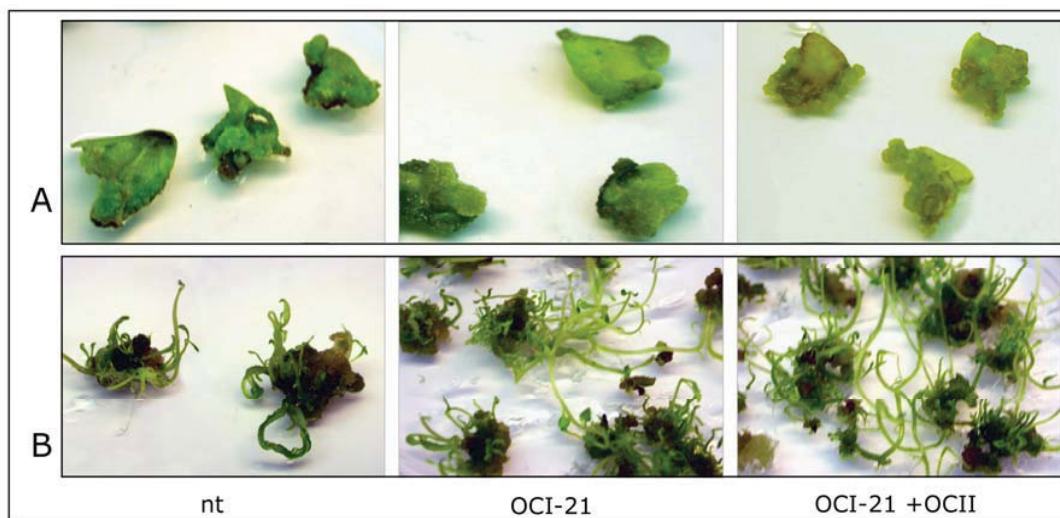
Tabela 4. 2. Indukcija kalusa nakon 2 nedelje na CIM podlozi i regeneracija izdanaka nakon 4 nedelje na SIM podlozi na netransformisanim (kontrola) i inokulisanim (OCI) odsečcima listova sorte Jelica prilikom transformacije sa OCI konstruktom i re-transformacije sa OCII konstruktom.

| | efikasnost formiranja kalusa \pm SE (%) [*] | kalusi sa pupoljcima \pm SE (%) ^{**} | broj izdanaka po kalusu \pm SE |
|--------------------------|--|---|----------------------------------|
| Transformacija | | | |
| kontrola | 82,0 \pm 0,8 ^b | 57,0 \pm 0,8 ^a | 5,3 \pm 0,4 ^a |
| OCI | 75,0 \pm 0,4 ^a | 60,0 \pm 1,0 ^a | 4,9 \pm 0,6 ^a |
| Re-transformacija | | | |
| kontrola | 81,0 \pm 0,4 ^b | 58,0 \pm 0,9 ^a | 5,5 \pm 0,6 ^a |
| OCI-21 | 98,0 \pm 0,6 ^c | 96,0 \pm 0,6 ^b | 12,6 \pm 0,4 ^b |
| OCI-21+OCII | 96,0 \pm 0,4 ^c | 97,0 \pm 0,6 ^b | 13,1 \pm 0,8 ^b |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE); n=100. Različita slova ukazuju na statistički značane razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$).

^{*}na podlozi za indukciju kalusa, izraženo kao srednja vrednost broja eksplantata koji formiraju kalus po petri kutiji/ broj eksplantata

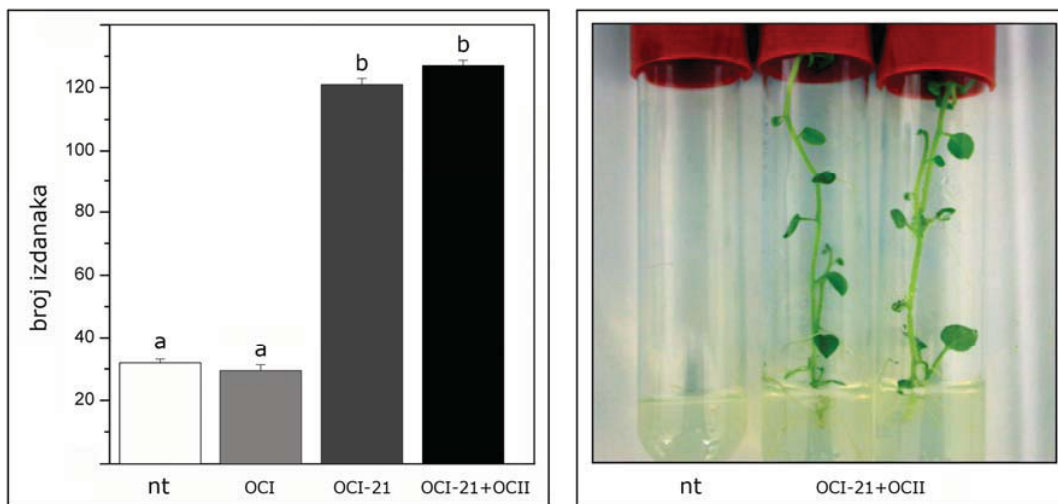
^{**}na podlozi za indukciju pupoljaka, izraženo kao srednja vrednost broja kalusa sa pupoljcima po petri kutiji/ broj eksplantata



Slika 4.6. Indukcija kalusa (A) i regeneracija izdanaka (B) iz kontrolnih, netransformisanih (nt) i OCI transformisanih (OCI-21) odsečaka listova na CIM i SIM podlogama bez antibiotika i iz transformisanih odsečaka listova nakon inokulacije sa *A. tumefaciens* (OCI-21+OCII) na selektivnim indukcionim podlogama.

Nakon prebacivanja pojedinačnih izdanaka (po jedan nasumično izabrani izdanak sa svake kalusne mase; 50 izdanaka ukupno) na selektivnu podlogu za indukciju korenova (RIM: MS podloga sa cefotaksimom 300 mg/l i kanamicinom 100 mg/l) formiranje korenova se moglo uočiti posle 10 dana kod izdanaka poreklom sa eksplantata listova inokulisanih sa *A. tumefaciens*. Procenat ožiljenih putativnih transformanata iznosio je 100%, što je i očekivano, jer je “roditeljska” OCI-21 linija Km- rezistentna (Slika.4.7).

Pojedinačni ožiljeni izdanci su označeni kao zasebne, potencijalno transformisane linije i, putem kulture jednonodalnih odsečaka, umnoženi su na MS podlozi bez regulatora rasta.

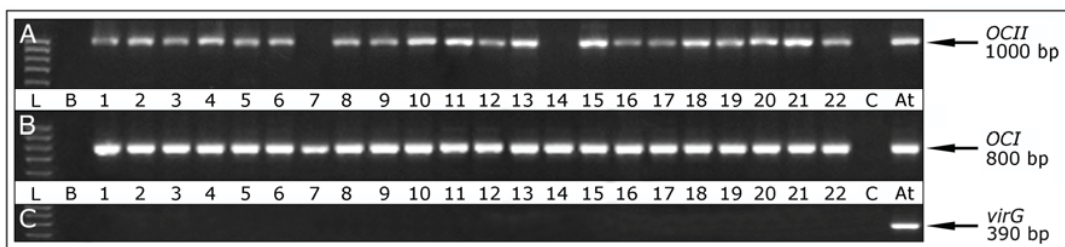


Grafik 4.3. (levo). Regenerativni potencijal netransformisanih (nt) i osečaka listova inokulisanih sa *A. tumefaciens* koji nosi *OCI* gen (OCI) prilikom transformacije i OCI transformisanih (OCI-21) i OCI-21 transformisanih odsečaka listova inokulisanih sa *A. tumefaciens* koji nose *OCII* gen (OCI-21+OCII) prilikom re-transformacije, nakon 4 nedelje na podlozi za indukciju izdanaka. Regenerativni potencijal je predstavljen kao ukupan broj izdanaka za 10 odsečaka listova. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (SE); n=100. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$).

Slika 4.7. (desno) Ožiljavanje netransformisanih, kontrolnih (nt) i re-transformisanih (OCI-21+OCII) izdanaka sorte Jelica nakon 4 nedelje na selektivnoj podlozi za indukciju korenova.

4.2.3. PCR analiza potencijalnih re-transformanata

PCR analizom genomske DNK izolovane iz 22, nasumično izabrana, vijabilna OCI-21/OCII potencijalna re-transformanta, potvrđeno je prisustvo produkta amplifikacije očekivane veličine od 1000 bp (OCII) kod 20 linija, ukazujući na frekvencu integracije *OCII* gena od 90,9% (Slika 4.8A). Istovremeno, PCR detekcija *pin2:OCI* produkta amplifikacije od 800 bp potvrdila je genetičku stabilnost predhodno introdukovanog *OCI* gena kod svih OCI-21/OCII re-transformisanih linija (Slika 4.8B). Odsustvo amplifikacije fragmenta od približno 390 bp, koji pokriva sekvencu *virG* gena, potvrdilo je da analizirane OCI/OCII linije nisu kontaminirane agrobakterijama (Slika 4.8C).

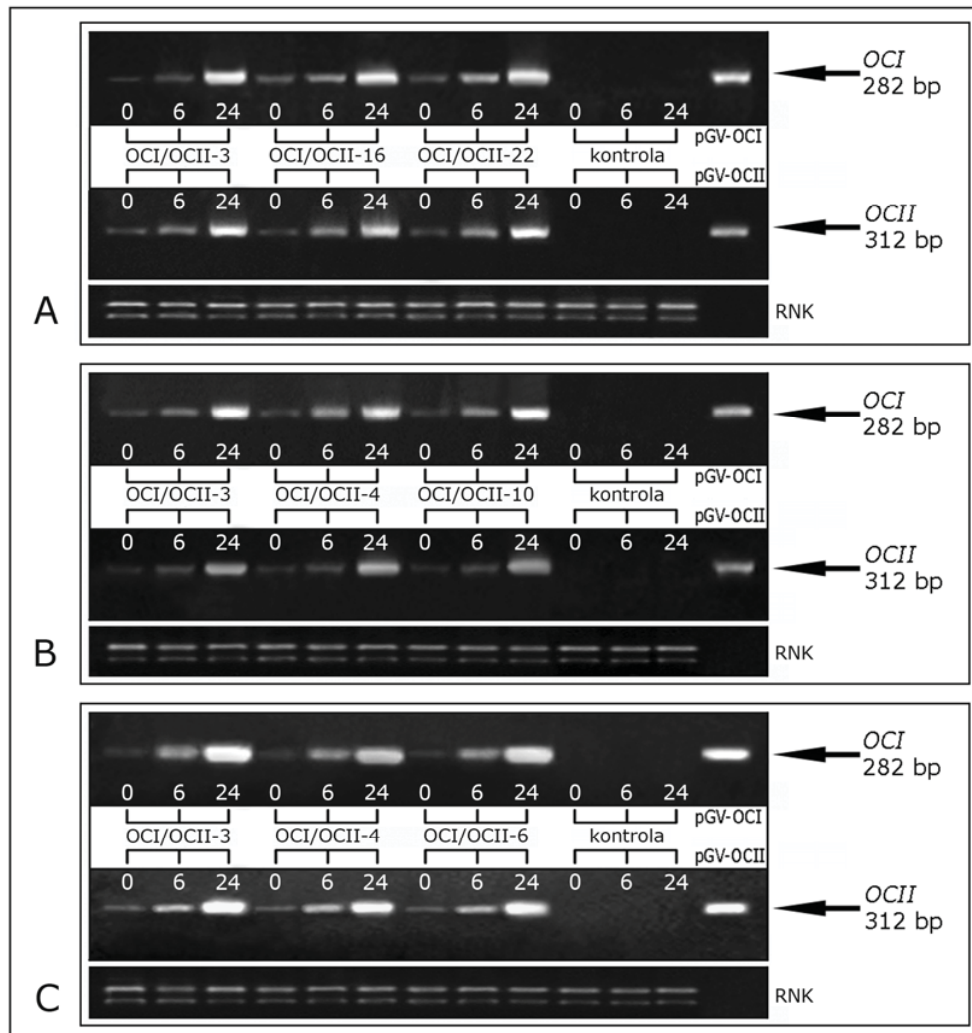


Slika 4.8. PCR analiza kontrolnih i OCI-21/OCII re-transformisanih biljaka krompira sorte Jelica uz korišćenje *pin2:OCII* (A), *pin2:OCI* (B) i *virG* (C) seta prajmera. L: DNA standard (100 bp DNA ladder, Serva), B: blank, 1-22: potencijane OCI-21/OCII linije, C: netransformisana kontrola, At: pozitivna kontrola za *OCI*: pGV-GFP-OCI-3.8(19) ili *OCII*: pGV-GFP-OCII-4.2A7.

Za dalje analize izabrane su po tri OCI/OCII PCR-pozitivne linije sorti Dezire (OCI/OCII linije 3, 16 i 22) i Dragačevka (OCI/OCII linije 3, 4 i 10) dobijene ko-transformacijom i tri OCII PCR-pozitivne linije sorte Jelica (OCI/OCII linije 3, 4 i 6) dobijene re-transformacijom “roditeljske” OCI linije 21. Navedene OCI/OCII linije krompira su izabrane na osnovu normalne morfologije i zdravog izgleda u kulturi *in vitro*.

4.3. RT-PCR analiza OCI/OCII linija krompira

Inducibilna aktivacija regulatornih *pin2* sekvenci i ekspresija oba orizacistatinska gena potvrđena je RT-PCR analizom. Amplifikacija i akumulacija transkripata genskih sekvenci iz kodirajućih regiona *OCI* gena (282 bp) i *OCII* gena (312 bp) pokazala je sličan obrazac nakon mehaničkog povređivanja listova. Oba gena su pokazala nisku konstitutivnu ekspresiju u odsustvu stimulusa i višestruko uvećanje transkripcione ekspresije 24h nakon mehaničkog povređivanja listova (Slika 4.9).



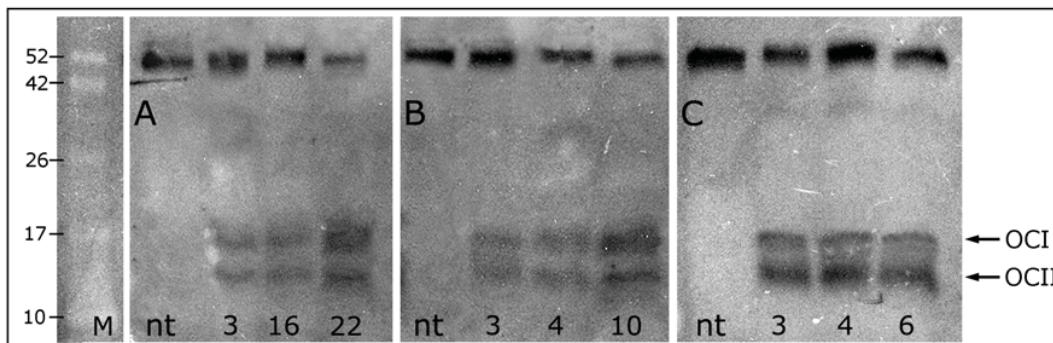
Slika 4.9. RT-PCR analiza kontrolnih i OCI/OCII transformisanih biljaka krompira sorti (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica. Ekspresija orizacistatinskih gena je pokazana za 0h (nepovređeni listovi) i za 6 i 24h nakon mehaničkog povređivanja listova. Za svaku vremensku tačku 0,4 μ g ukupne RNK je, nakon tretmana DNazom I, podvrgnuto reakciji reverzne transkripcije. Kodirajuće sekvence orizacistatinskih gena su amplifikovane PCR reakcijom uz korišćenje seta specifičnih *OCI* i *OCII* prajmera.

4.4. Analiza rekombinantnih OCI i OCII proteina u transformisanim linijama krompira

Akumulacija rekombinantnih proteina, OCI i OCII, pokazana je imunološkom detekcijom, a njihova biološka aktivnost analizom inhibicije cisteinske proteinaze papaina.

4.4.1. Imunološka detekcija rekombinantnih OCI i OCII

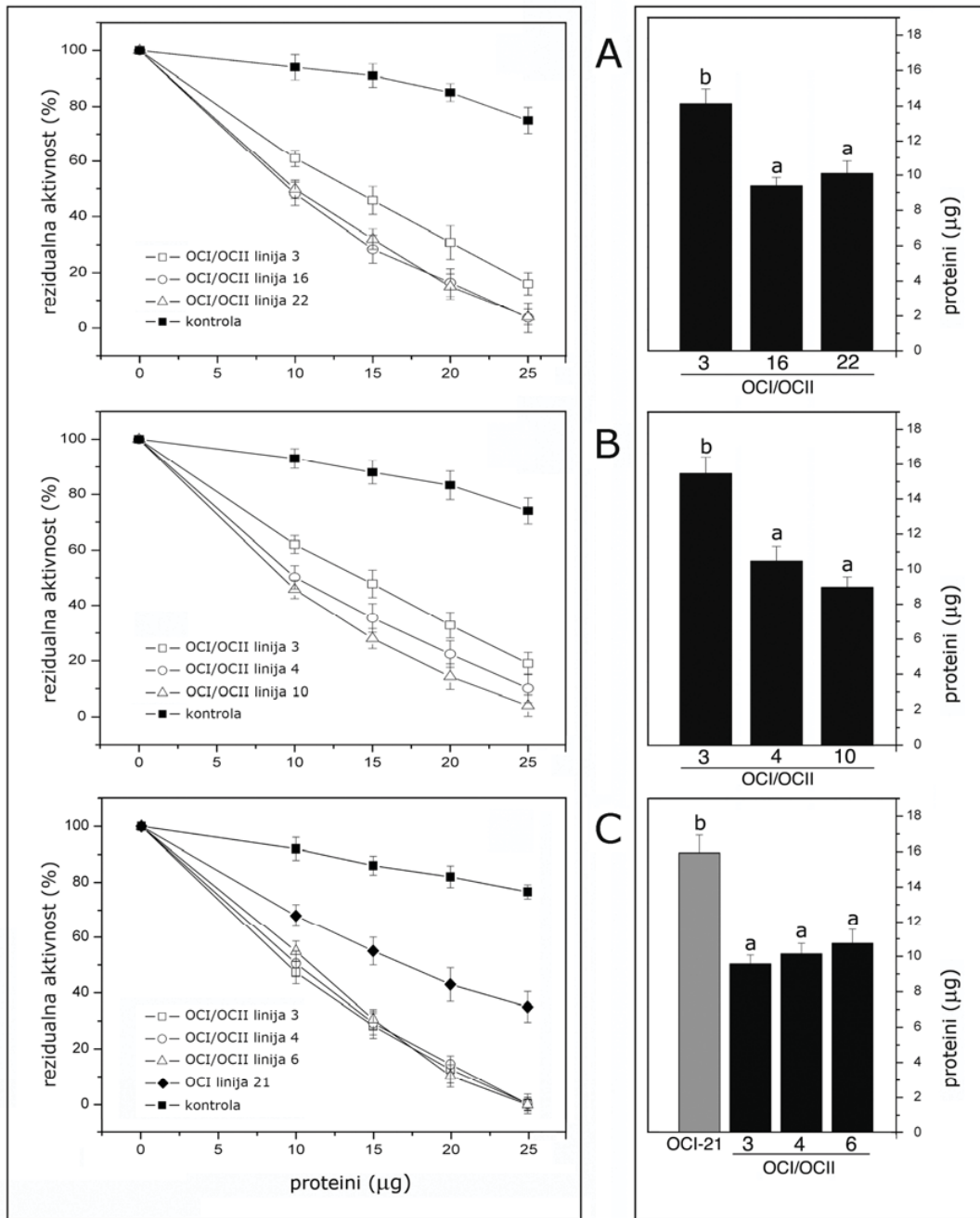
Akumulacija OCI i OCII proteina u listovima transgenih biljaka nakon mehaničkog povređivanja pokazana je *Western blot* metodom (Slika 4.10). Detekcija sa specifičnim OCI antitelima pokazala je prisustvo dve trake, veličine između 17 kDa i 10 kDa, u transformisanim listovima 24h nakon mehaničkog povređivanja. Ove trake odgovarale su očekivanoj veličini OCI (~17 kDa) i OCII (~12 kDa) peptida (Michaud i sar. 1994a) i nisu bile prisutne u proteinskom ekstraktu kontrolnih, netransformisanih listova. Antitela specifična za OCI dodatno su, i kod netransformisanih i kod transgenih listova, reagovala sa peptidom od oko 55 kDa ukazujući na prisustvo endogenog peptida u krompiru koji verovatno deli strukturnu homologiju sa cistatinima iz pirinča.



Slika 4.10. Akumulacija rekombinantnih OCI i OCII proteina u listovima transformisanih linija krompira indukovana 24h nakon mehaničkog povređivanja. M – proteinski marker opsega 10-260 kDa (Fermentas), nt – netransformisana kontrola. (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica.

4.4.2. Analiza inhibitorne aktivnosti rekombinantnih OCI i OCII

Proteinski ekstrakti listova OCI/OCII transformisanih linija krompira, pokazali su snažnu inhibiciju aktivnosti cistenske proteinaze papaina. Rastuće koncentracije proteina, izolovanih 24h nakon mehaničkog povređivanja listova, progresivno su smanjivale proteolitičku aktivnost papaina (Grafik 4.4). Inhibitorna aktivnost proteinskog ekstrakta transformisanih linija 16 i 22 sorte Dezire ne pokazuje statistički značajne razlike, dok u odnosu na njih, linija 3 pokazuje do 29% manju aktivnost (Grafik 4.4A). U okviru transgenih linija sorte Dragačevka (Grafik 4.4B) linija 3 je pokazala najmanju antipapainsku aktivnost, do 37% manju od linija 4 i 10, a razlike u inhibitornoj aktivnosti linija 4 i 10 nisu značajne. OCI/OCII linije 3, 4 i 6 sorte Jelica, dobijene re-transformacijom, međusobno ne pokazuju značajne razlike u inhibitornoj aktivnosti (Grafik 4.4C), a u odnosu na roditeljsku OCI-21 liniju zabeležen je porast antipapainske aktivnosti od prosečno $30 \pm 3\%$. Značajna antipapainska aktivnost zabeležena je i kod netransformisanih biljaka, sa smanjenjem od 20-25% za reakciju sa 25 μg proteinskog ekstrakta listova kontrolnih biljaka krompira (Grafik 4.4).



Grafik 4.4. (levo): Rezidualna aktivnost cisteinske proteinaze papaina nakon inkubacije sa rastućim koncentracijama proteinskog ekstrakta izolovanog iz netransformisanih (kontrola) i OCII/OCII listova krompira, 24h nakon mehaničkog povređivanja listova. **(desno):** Inhibitorna aktivnost proteinskog ekstrakta OCII/OCII listova krompira predstavljena kao količina proteina dovoljna za inhibiciju 1µg papaina. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (SE). Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$). (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica.

4.5. Morfološke karakteristike OCI/OCII linija krompira

Između netransformisanih i OCI/OCII transformisanih biljka gajenih u kulturi *in vitro* nisu postojale upadljive fenotipske razlike (Slika 4.11), dok su eventualna odstupanja od normalnog fenotipa na granici statističke značajnosti (Tabela 4.3).



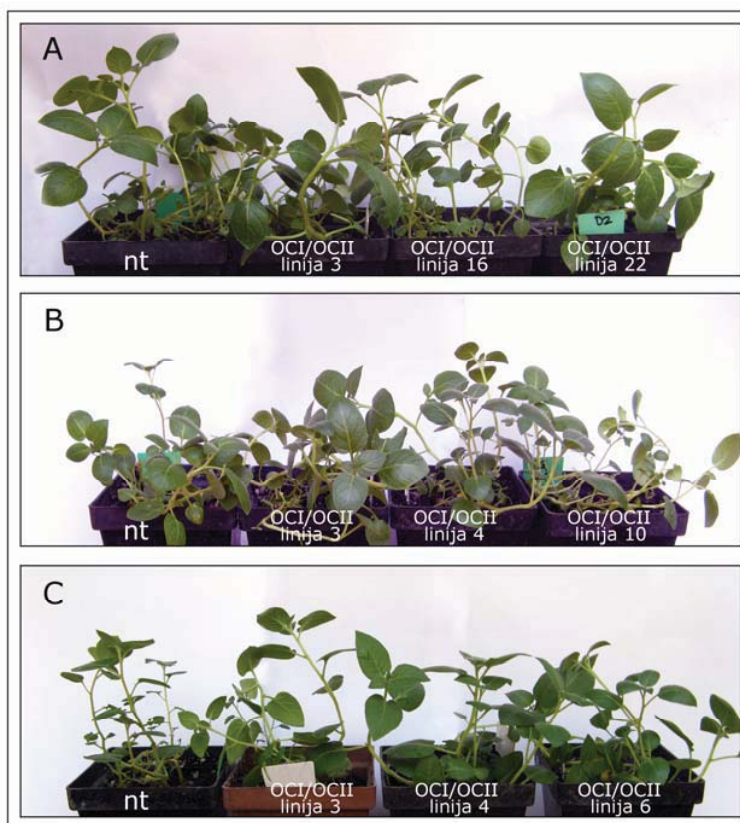
Slika 4.11. Četiri nedelje stare netransformisane (nt) i transformisane biljke krompira gajene u uslovima *in vitro*. OCI/OCII transformisane linije sorti Dezire (A) i Dragačevka (B) dobijene su ko-transformacijom, a OCI/OCII transformisane linije linije sorte Jelica (C) re-transformacijom “roditeljske” linije OCI-21.

Takođe, vizuelno ispitivanje po 70 aklimatizovanih biljaka svake transformisane linije, nakon jednog i dva meseca gajenja u uslovima staklenika, nije otkrilo prisustvo morfoloških nepravilnosti kao što su npr. smanjeni rast, nepravilni, izuvijani ili srasli listovi (Slika 4.12). Odsustvo ovih promena ukazuje na nizak nivo somaklonalnih varijacija i nepostojanje direktnog uticaja rekombinantnih orizacistatina na metabolizam biljke “domaćina”.

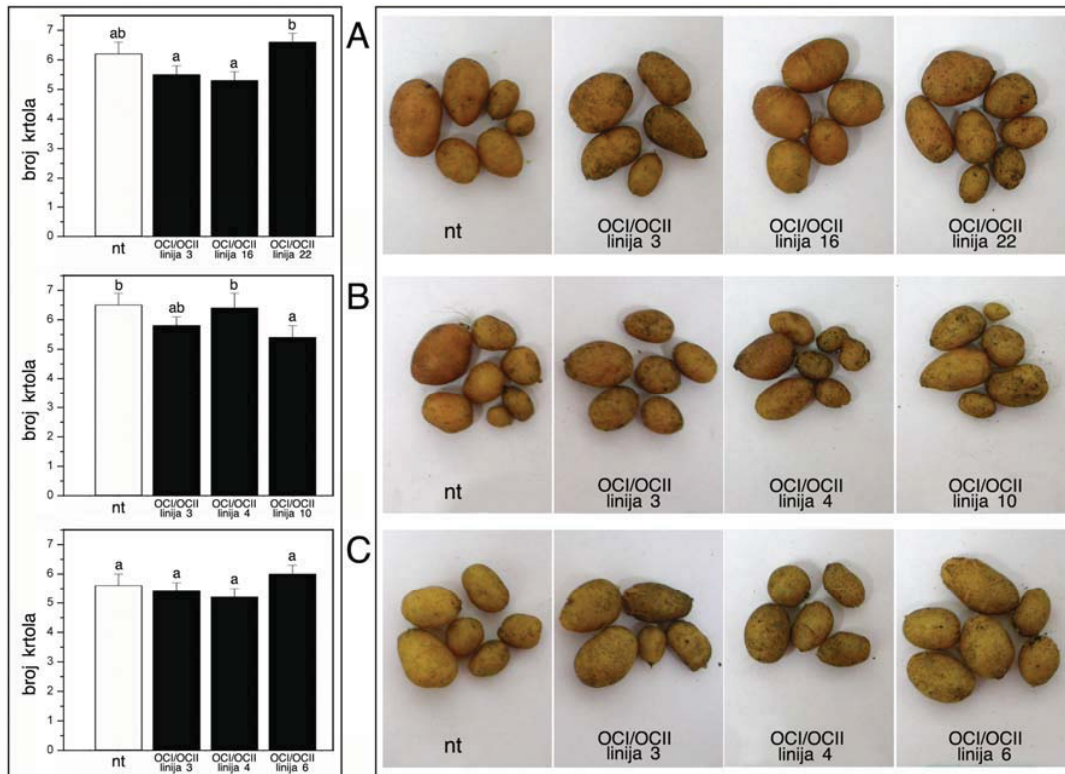
Tabela 4. 3. Morfološke karakteristike netransformisanih i transformisanih linija krompira nakon 4 nedelje gajenja u kulturi *in vitro*.

| linija krompira | dužina (mm) izdanka ± SE | broj nodusa ± SE | broj bočnih pupoljaka ± SE | broj ± SE korenova |
|------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Dezire kontrola | 72,5 ± 1,8 | 6,4 ± 0,2 | 1,0 ± 0,3 | 11,8 ± 1,2 |
| Dezire OCI/OCII-3 | 75,1 ± 1,7 | 7,2 ± 0,4 | 1,4 ± 0,3 | 11,2 ± 1,4 |
| Dezire OCI/OCII-16 | 70,1 ± 3,5 | 6,6 ± 0,2 | 0,8 ± 0,4 | 11,4 ± 0,6 |
| Dezire OCI/OCII-22 | 74,2 ± 1,9 | 7,0 ± 0,3 | 1,2 ± 0,4 | 12,6 ± 1,1 |
| Dragačevka kontrola | 72,9 ± 1,5 | 6,5 ± 0,2 ^{ab} | 1,3 ± 0,3 | 12,5 ± 1,1 |
| Dragačevka OCI/OCII-3 | 76,4 ± 2,7 | 7,4 ± 0,4 ^b | 1,1 ± 0,2 | 12,8 ± 1,3 |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 71,9 ± 3,1 | 6,4 ± 0,2 ^{ab} | 0,6 ± 0,4 | 11,2 ± 1,2 |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 74,5 ± 1,5 | 6,2 ± 0,3 ^a | 0,9 ± 0,2 | 10,8 ± 1,0 |
| Jelica kontrola | 73,1 ± 1,7 ^{ab} | 6,6 ± 0,2 | 0,6 ± 0,4 | 14,1 ± 1,5 |
| Jelica OCI-21 | 74,4 ± 2,7 ^{ab} | 6,5 ± 0,6 | 0,7 ± 0,2 | 14,6 ± 1,8 |
| Jelica OCI/OCII-3 | 71,7 ± 2,9 ^a | 6,2 ± 0,6 | 1,2 ± 0,4 | 13,7 ± 1,2 |
| Jelica OCI/OCII-4 | 74,2 ± 1,4 ^{ab} | 6,7 ± 0,4 | 0,9 ± 0,3 | 12,8 ± 1,5 |
| Jelica OCI/OCII-6 | 78,1 ± 1,3 ^b | 7,1 ± 0,4 | 0,6 ± 0,4 | 14,8 ± 1,8 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE); n=30. Različita slova ukazuju na statistički značane razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$) u okviru iste sorte krompira.

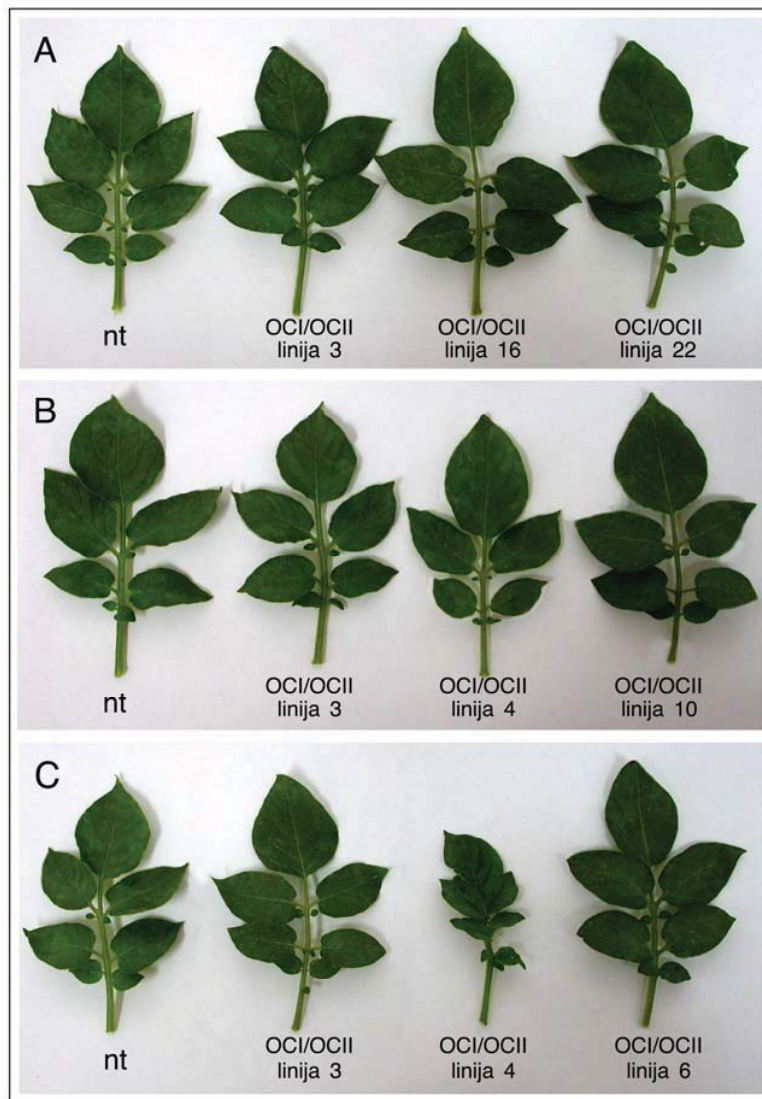


Slika 4.12. Netransformisane (nt) i OCI/OCII transformisane linije sorti krompira Dezire (A), Dragačevka (B) i Jelica (C) nakon mesec dana gajenja u uslovima staklenika.



Grafik 4.5. (levo) i Slika 4.13. (desno) Prosečan prinos kontrolnih (nt) i OCI/OCII T_0 biljaka krompira nakon 4 meseca gajenja u uslovima staklenika. Rezultati su prikazani kao prosečan broj krtola po biljci krompira. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupanja od srednje vrednosti (SE). Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$), $n=10$. (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica.

Nakon 4 meseca gajenja u uslovima staklenika i kontrolne i transformisane bljke krompira su formirale 5-7 tubera po biljci (Slika 4.13), a značajno manji prinos od ~17% u odnosu na netransformisanu kontrolu zabeležen je jedino kod OCI/OCII linije 10 sorte Dragačevka (Grafik 4.5). Iz ovih tubera, zasađenih na oglednom polju, dobijena je T_1 generacija transgenih linija krompira. Odstupanje od normalnog fenotipa zabeleženo je jedino za OCI/OCII liniju 4 sorte Jelica. T_1 biljke ove linije pokazivale su smanjeni rast, posedovale manje i nepravilne listove (Slika 4.14) i, za razliku od netransformisanih i ostalih OCI/OCII transgenih linija, nisu cvetale.

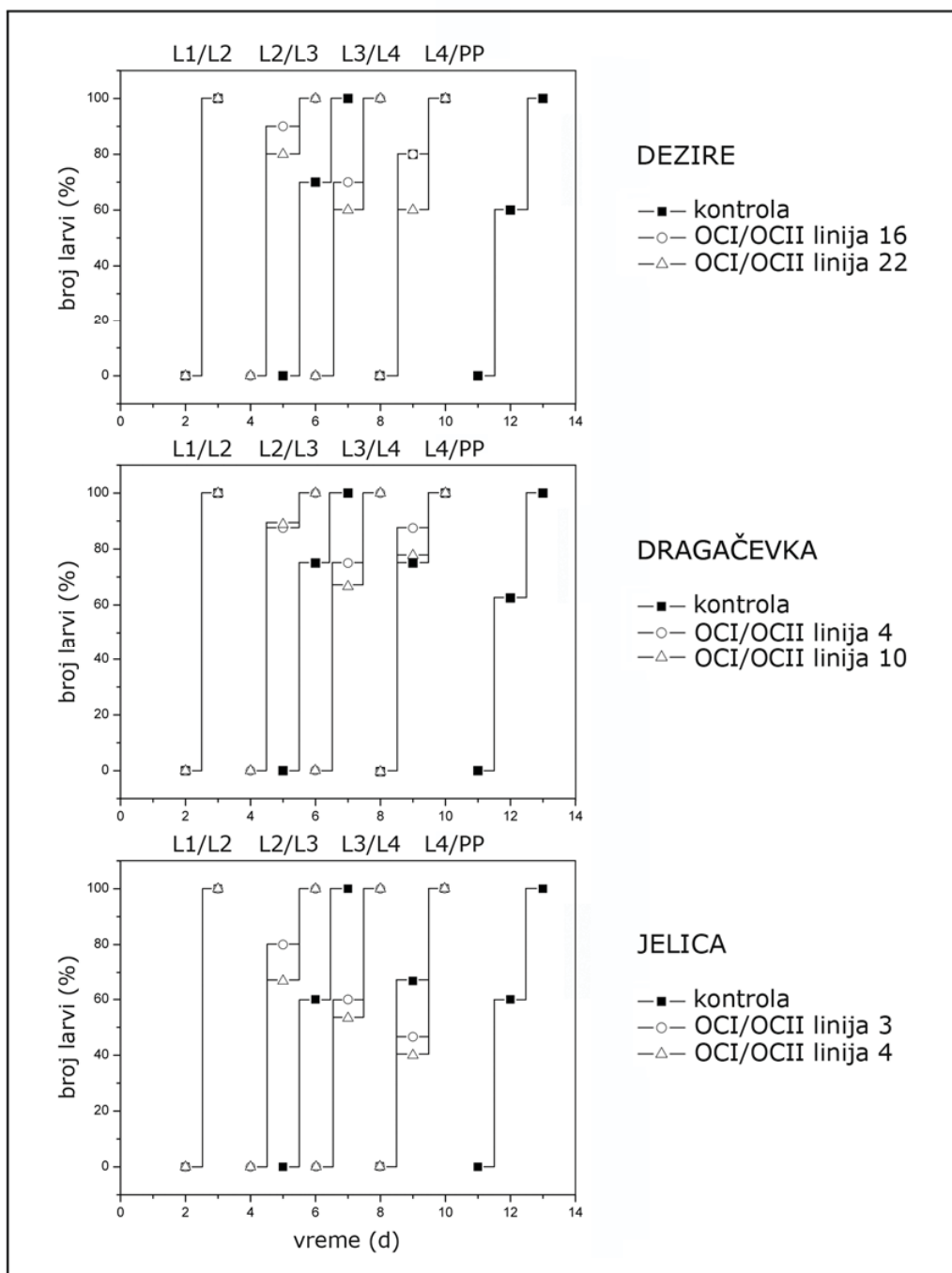


Slika 4.14. Listovi kontrolnih (nt) i OCI/OCII transgenih T₁ linija krompira nakon dva meseca gajenja na oglednom polju. (A) Dezire, (B) Dragačevka i (C) Jelica.

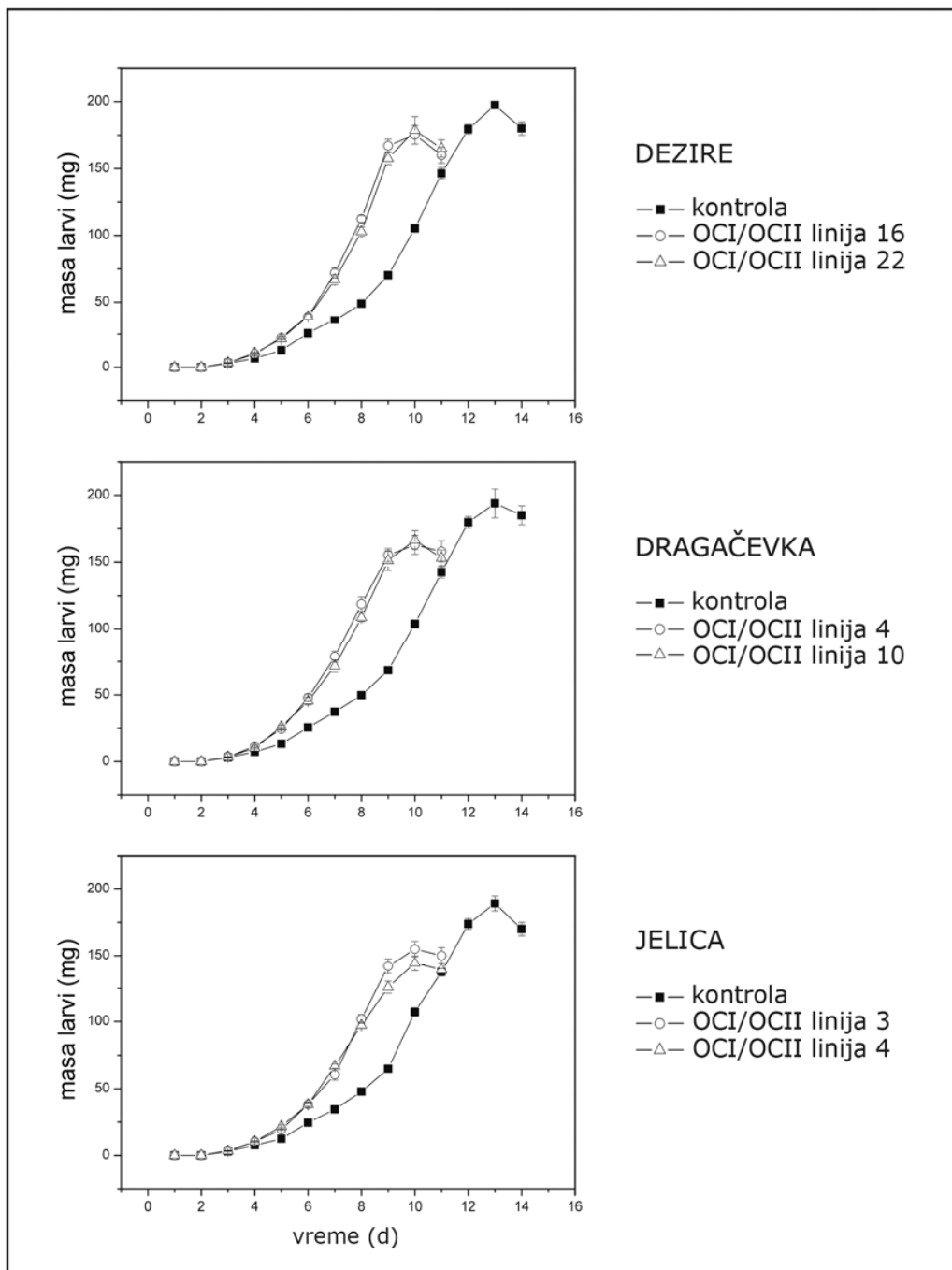
4.6. Biotest sa larvama krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Neposredno nakon izleganja, po 30 larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) postavljeno je na netrtransformisane (kontrolne) i OCI/OCII transformisane listove svake od tri ispitivane sorte krompira. Prvi larveni stupanj (L1), kako na kontrolnim tako i na OCI/OCII listovima, trajao je dva dana tokom kojih je procenat preživljavanja larvi iznosio 100%. Ni dalja ishrana - kada su, radi preciznijeg praćenja parametara rasta i razvića, larve razdvojene u pojedinačne petri kutije - na transformisanim listovima krompira nije uticala na stopu smrtnosti: od ranog L2 do kasnog L4 (prepupalnog) stadijuma stopa preživljavanja je ostala 100%.

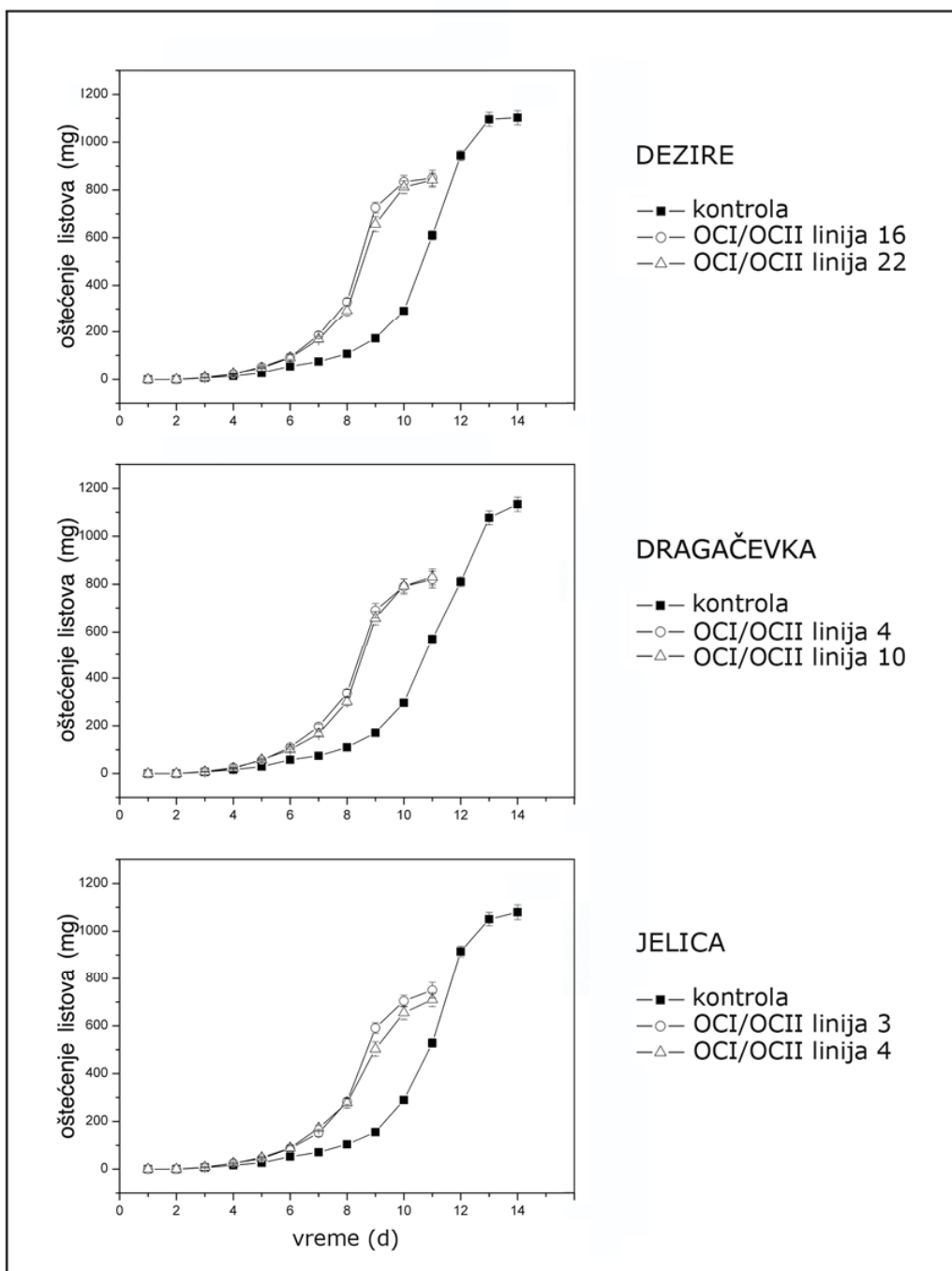
Iako nije uticala na preživljavanje, ishrana larvi OCI/OCII transformisanim listovima krompira imala je značajan uticaj na različite performanse rasta i razvića larvi krompirove zlatice. Larve hranjene transformisanim listovima su se presvlačile ranije (Grafik 4.6), rasle i konzumirale listove brže u odnosu na one hranjene netrtransformisanim listovima (Grafici 4.7 i 4.8). Istovremeno, larve na OCI/OCII listovima brže su dostizale maksimum mase i ranije “usporavale” sa ishranom ulazeći u prepupalnu fazu razvića (Grafici 4.7 i 4.8). Uprkos većoj brzini konzumiranja transformisanih listova, stopa konverzije hrane u telesnu masu je ostala slična onoj koju su pokazivale larve na kontrolnim listovima (Grafik 4.9). Ipak, većom količinom dnevno unete hrane i bržim uvećanjem telesne mase, pri istoj efikasnosti ishrane, larve na transformisanim listovima nisu u potpunosti uspele da kompenzuju efekte prisustva inhibitora u listovima krompira. U odnosu na larve hranjene netrtransformisanim listovima, maksimalna masa na kraju larvenog razvića i ukupan stepen oštećenja listova bio je manji kod larvi krompirove zlatice hranjenih OCI/OCII transformisanim listovima krompira (Grafici 4.7 i 4.8).



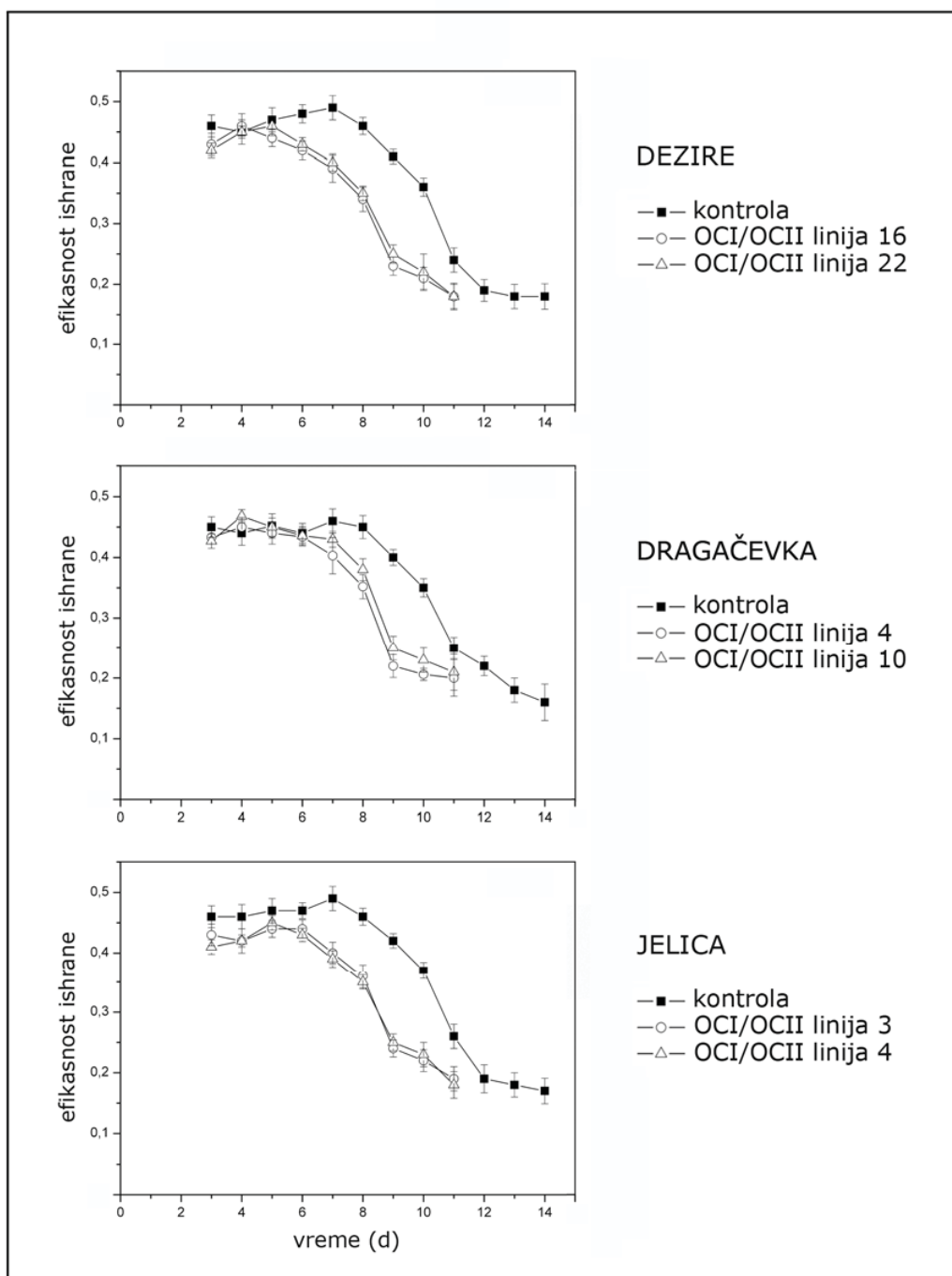
Grafik 4.6. Prolazak larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) kroz stupnjeve razvića tokom ishrane na netransformisanim i OCII/OCI transformisanim listovima tri sorte krompira. Presvlačenje između larvenih stupnjeva (L1/L2, L2/L3, L3/L4) i ulazak u prepupalnu fazu (L4/PP) prikazani su kao ukupan broj larvi (%) na određenom stupnju razvića u odnosu na vreme trajanja razvića larvi, koje je izraženo u danima (d). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira.



Grafik 4.7. Masa larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane netransformisanim (kontrola) i OC1/OC2 listovima tri sorte krompira. Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupnja od srednje vrednosti (standardna greška, SE).



Grafik 4.8. Stepen oštećenja netransformisanih (kontrola) i OCII/OCI transformisanih listova tri sorte krompira tokom ishrane krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Vrednosti količine lisne mase konzumirane od strane larvi dobijene na dnevnoj osnovi su sabirane i predstavljene kao ukupno oštećenje listova. Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupnja od srednje vrednosti (SE).



Grafik 4.9. Efikasnost ishrane larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) na netransformisanim (kontrola) i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira. Efikasnost ishrane je predstavljena kao odnos mase larvi i ukupne količine konzumiranih listova. Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupnja od srednje vrednosti (SE).

4.6.1. Trajanje razvića

Larve krompirove zlatice hranjene OCI/OCII transformisanim listovima su, kod sve tri sorte krompira, su se brže presvlačile, odnosno pojedini larveni stupnjevi su kraće trajali u poređenju sa onim koje su se hranile listovima netransformisanih biljaka (Tabela 4.4, Slika 4.13). Razlike u trajanju prvog larvenog stadijuma na netransformisanim i transformisanim listovima krompira nisu uočene. Sve larve, nezavisno od tretmana, su se presvukle u drugi stupanj nakon dva dana. Svaki naredni stupanj razvića (L2, L3 i L4) na transformisanim listovima, u odnosu na kontrolu, bio je skraćen za oko 1 dan. Statistička analiza pokazala je da su ove razlike značajne kako za svaki stadijum ponaosob (L2: $F = 26,2$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 23,51$, $P \leq 0,0001$ za Dragačevku i $F = 29,2$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu; L3: $F = 18,5$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 9,26$, $P = 0,0012$ za Dragačevku i $F = 24,9$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu; L4: $F = 23,14$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 9,15$, $P = 0,0013$ za Dragačevku i $F = 43,75$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu), tako i za ukupno trajanje razvića larvi (L1-PP: $F = 135,56$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 119,65$, $P \leq 0,0001$ za Dragačevku i $F = 154,26$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu).

Tabela 4.4. Trajanje pojedinih stupnjeva larvenog razvića krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira.

| linija krompira | Trajanje razvića ± SE (d) | | | | |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | L1 | L2 | L3 | L4 | L1-PP |
| Dezire kontrola | 2,0 ± 0,0 | 3,30 ± 0,15 ^b | 2,90 ± 0,13 ^b | 4,20 ± 0,13 ^b | 12,40 ± 0,16 ^b |
| Dezire OCI/OCII-16 | 2,0 ± 0,0 | 2,10 ± 0,10 ^a | 2,20 ± 0,13 ^a | 3,00 ± 0,13 ^a | 9,30 ± 0,13 ^a |
| Dezire OCI/OCII-22 | 2,0 ± 0,0 | 2,20 ± 0,13 ^a | 2,20 ± 0,13 ^a | 3,00 ± 0,16 ^a | 9,40 ± 0,16 ^a |
| Dragačevka kontrola | 2,0 ± 0,0 | 3,25 ± 0,21 ^b | 3,00 ± 0,19 ^b | 4,12 ± 0,23 ^b | 12,38 ± 0,18 ^b |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 2,0 ± 0,0 | 2,12 ± 0,12 ^a | 2,12 ± 0,12 ^a | 3,12 ± 0,23 ^a | 9,36 ± 0,16 ^a |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 2,0 ± 0,0 | 2,11 ± 0,11 ^a | 2,22 ± 0,15 ^a | 3,11 ± 0,11 ^a | 9,33 ± 0,15 ^a |
| Jelica kontrola | 2,0 ± 0,0 | 3,40 ± 0,13 ^b | 2,93 ± 0,16 ^b | 4,07 ± 0,11 ^b | 12,40 ± 0,13 ^b |
| Jelica OCI/OCII-3 | 2,0 ± 0,0 | 2,20 ± 0,11 ^a | 2,20 ± 0,11 ^a | 3,13 ± 0,16 ^a | 9,53 ± 0,13 ^a |
| Jelica OCI/OCII-4 | 2,0 ± 0,0 | 2,33 ± 0,12 ^a | 2,13 ± 0,19 ^a | 3,13 ± 0,19 ^a | 9,60 ± 0,13 ^a |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0,05$) u okviru iste sorte krompira.

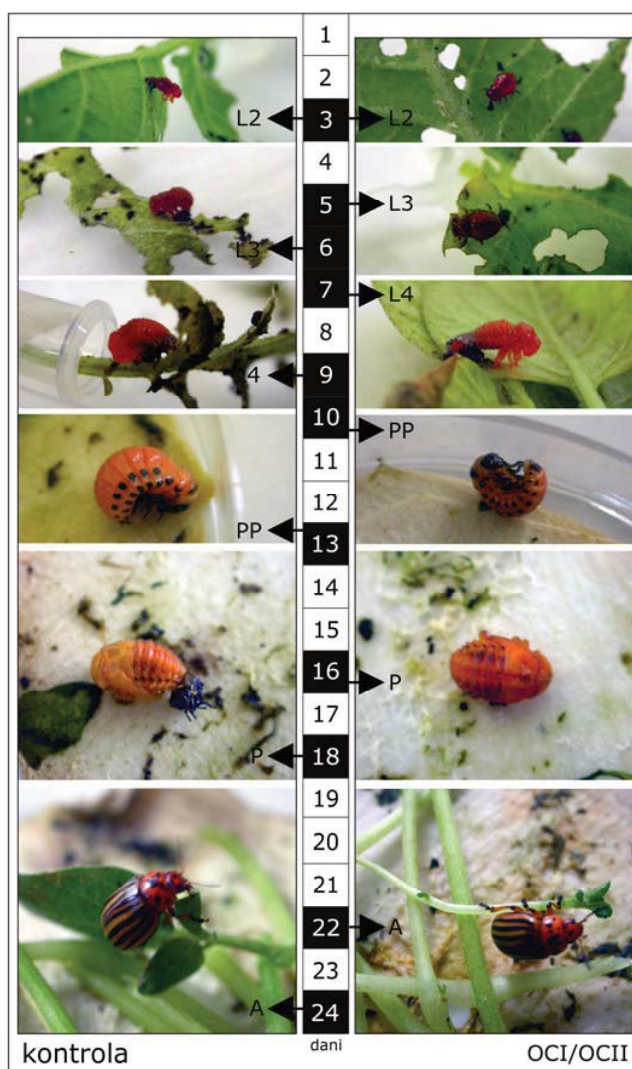
Kako larvama krompirove zlatice, radi praćenja ulaska u naredne stadijume razvića, nije omogućeno da se u prepupalnoj fazi ukopaju - prelazak larvi krompirove zlatice u stadijum lutke nije bio sinhronizovan i, nezavisno od tretmana, razlike u vremenu trajanja PP faze bile su do 5 dana. Ipak, kod svih linija, prve su u stadijum lutke ušle larve hranjene transformisanim listovima, nakon 6 dana prepupalne faze. Dva dana potom, kod svih sorti krompira u stadijum lutke su ušle i prve kontrolne larve. Trajanje faze lutke je bilo ujednačeno i, nezavisno od tretmana, posle 6 dana sve lutke krompirove zlatice su prešle u adulte. Time je vreme razvića od L1 do adulta na transformisanim listovima krompira iznosilo najmanje 21 dan, dok je larvama na netransformisanim listovima, nakon izleganja, bilo potrebno najmanje 23 dana da postanu adulti (Slika 4.13).

4.6.2. Parametri rasta larvi

Prvi očigledni uticaj ishrane transformisanim listovima zabeležen je kod ranog drugog larvenog stupnja (L2), trećeg dana biotesta. U odnosu na kontrolu, masa tri dana starih larvi krompirove zlatice na OCI/OCII transformisanim listovima krompira bila je do 12,3% veća kod sorte Dezire, do 14,4% veća kod sorte Dragačevka i do 13,9% veća kod sorte Jelica. Statistička analiza pokazala je da su ove razlike značajne ($F = 7,8$, $P = 0,0021$ za Dezire; $F = 4,79$, $P = 0,0193$ za Dragačevku; $F = 15,8$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu). Trend bržeg uvećanja mase na transformisanim listovima zadržan je do kraja razvića larvi, a razlike u masi larvi iste starosti bile su maksimalne za 7 i 8 dana stare larve krompirove zlatice. Prosečna masa nedelju dana starih larvi na transformisanim listovima bila je do 49,7 % veća kod sorte Dezire, do 52,7% veća kod sorte Dragačevka i do 48,4% veća kod sorte Jelica (Slika 4.14).

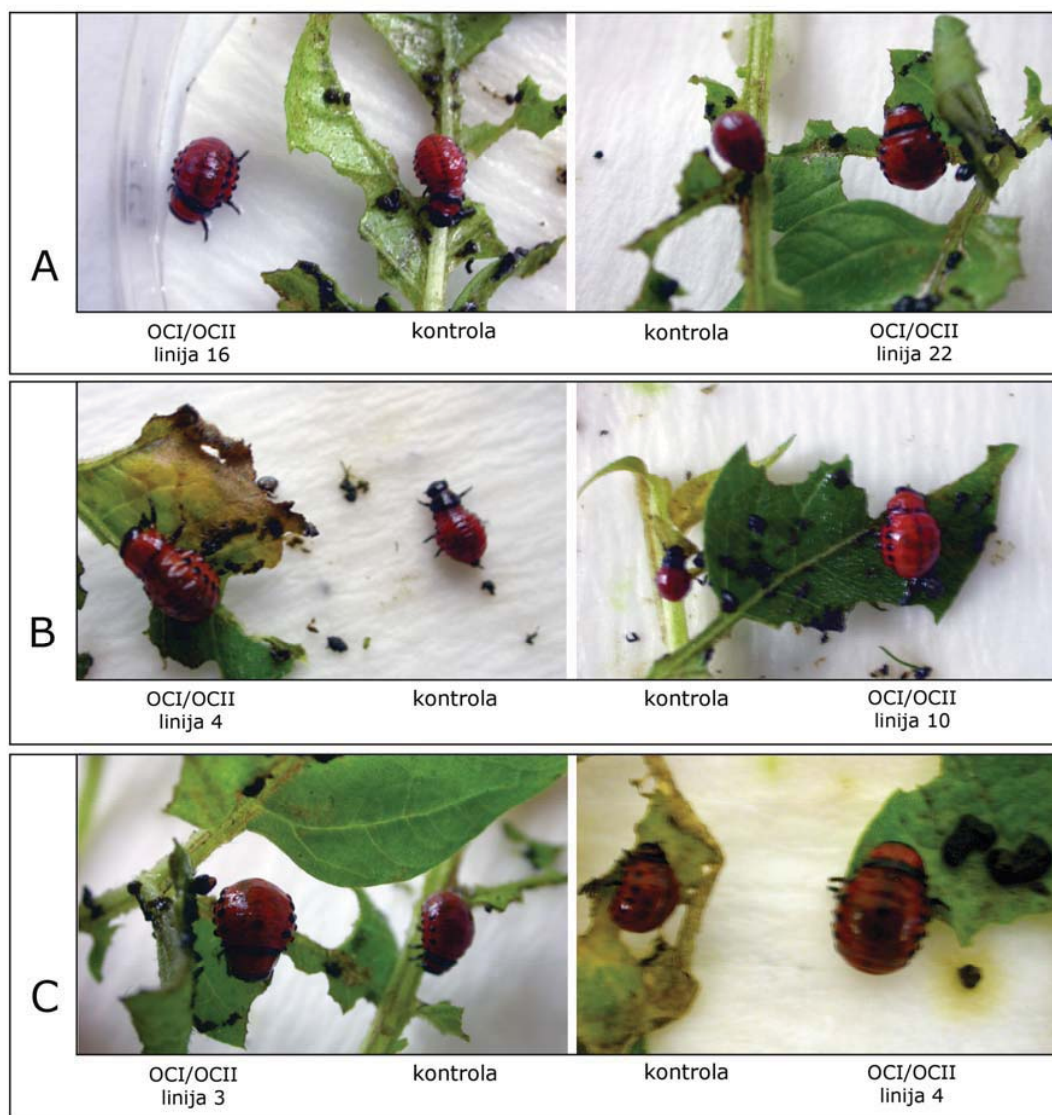
Ove izuzetne performanse uvećanja telesne mase na transformisanim listovima - posmatrane kao dnevno uvećanje mase za svaki stupanj ponaosob – larve krompirove zlatice su pokazivale samo tokom L2 i L3 stupnja (Tabela 4.5). Tokom L2 larve su dnevno uvećavale masu do 20,4% brže kod sorte Dezire ($F = 14,48$, $P \leq 0,0001$), do 20,2% brže kod sorte Dragačevka ($F = 6,82$, $P = 0,005$) i do 25,4% brže kod sorte Jelica

($F = 16,98$, $P \leq 0,0001$). L3 larve na transformisanim listovima pokazivale su brzinu rasta do 25,9% veću kod sorte Dezire ($F = 37,37$, $P \leq 0,0001$), do 29,7% veću kod sorte Dragačevka ($F = 30,47$, $P \leq 0,0001$) i do 26,1% veću kod sorte Jelica ($F = 31,79$, $P \leq 0,0001$) u odnosu na one na netransformisanim listovima krompira. Razlike u brzini uvećanja mase tokom L4 stupnja nisu bile značajne ($F = 2,25$, $P = 0,1245$ za Dezire, $F = 0,26$, $P = 0,776$ za Dragačevku i $F = 1,85$, $P = 0,1705$ za Jelicu). Prema tome - posmatrana preko apsolutnih vrednosti, kao dnevno uvećanje mase - ishrana OCI/OCII transformisanim listovima krompira je inicijalno, tokom L2 i L3, ubrzala rast larvi krompirove zlatice, ali ovaj efekat se izgubio tokom L4.



Slika 4.13. Prolazak krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) kroz larvene stupnjeve (L2, L3, L4) tokom ishrane netransformisanim (kontrola) i OCI/OCII listovima krompira, ulazak u prepupalnu fazu (PP), pojava lutki (P) i adulta (A).

Sa druge strane, posmatrane na relativnom nivou, u odnosu na maksimum ostvarene mase (Tabela 4.6), larve na transformisanim listovima su značajno brže akumulirale biomasu tokom svih stupnjeva razvića u odnosu na one na netransformisanim listovima (L2: $F = 233,96$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 347,02$, $P \leq 0,0001$ za Dragačevku i $F = 275,77$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu; L3: $F = 294,54$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 186,19$, $P = 0,0012$ za Dragačevku i $F = 128,26$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu; L4: $F = 305,18$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 79,2$, $P \leq 0,0001$ za Dragačevku i $F = 128,26$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu).



Slika 4.14. Larve krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) 7-og dana ishrane na netransformisanim (kontrola) i OCI/OCII transformisanim listovima krompira. Dezire (A), Dragačevka (B) i Jelica (C).

Tabela 4.5. Brzina rasta (GR) različitih stupnjeva razvića larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira. GR je prikazana kao dnevno uvećanje biomase larvi.

| linija krompira | Brzina rasta ± SE (mg/d) | | |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|
| | L2 | L3 | L4 |
| Dezire kontrola | 2,97 ± 0,09 ^a | 13,73 ± 0,41 ^a | 33,81 ± 0,62 |
| Dezire OCI/OCII-16 | 3,73 ± 0,12 ^b | 18,53 ± 0,47 ^b | 36,19 ± 1,16 |
| Dezire OCI/OCII-22 | 3,67 ± 0,11 ^b | 17,47 ± 0,35 ^b | 36,91 ± 1,32 |
| Dragačevka kontrola | 3,09 ± 0,16 ^a | 12,87 ± 0,36 ^a | 33,37 ± 0,90 |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 3,78 ± 0,20 ^b | 18,32 ± 0,76 ^b | 34,46 ± 1,21 |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 3,87 ± 0,15 ^b | 17,6 ± 0,45 ^b | 34,09 ± 1,48 |
| Jelica kontrola | 2,76 ± 0,08 ^a | 13,02 ± 0,41 ^a | 32,58 ± 0,71 |
| Jelica OCI/OCII-3 | 3,70 ± 0,14 ^b | 16,5 ± 0,46 ^b | 34,4 ± 0,90 |
| Jelica OCI/OCII-4 | 3,48 ± 0,13 ^b | 17,6 ± 0,45 ^b | 33,6 ± 0,89 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu prema LSD testu ($P \leq 0.05$) u okviru iste sorte krompira.

Tabela 4.6. Relativna brzina rasta (RGR) različitih stadijuma razvića larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira. RGR je prikazana kao dnevno uvećanje biomase larvi u odnosu na ostvarenu masu larvi.

| linija krompira | relativna stopa rasta ± SE (%/d) | | |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | L2 | L3 | L4 |
| Dezire kontrola | 23,12 ± 0,26 ^a | 25,81 ± 1,01 ^a | 17,32 ± 0,13 ^a |
| Dezire OCI/OCII-16 | 34,60 ± 0,43 ^b | 35,69 ± 1,48 ^b | 22,2 ± 0,17 ^b |
| Dezire OCI/OCII-22 | 31,89 ± 0,44 ^b | 35,26 ± 0,58 ^b | 23,13 ± 0,24 ^b |
| Dragačevka kontrola | 23,37 ± 0,70 ^a | 24,90 ± 0,24 ^a | 17,63 ± 0,14 ^a |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 34,20 ± 0,38 ^b | 36,77 ± 0,51 ^b | 21,79 ± 0,29 ^b |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 34,35 ± 0,31 ^b | 35,84 ± 0,58 ^b | 22,07 ± 0,34 ^b |
| Jelica kontrola | 21,92 ± 0,26 ^a | 25,29 ± 0,29 ^a | 17,65 ± 0,14 ^a |
| Jelica OCI/OCII-3 | 32,62 ± 0,35 ^b | 34,41 ± 0,64 ^b | 22,45 ± 0,27 ^b |
| Jelica OCI/OCII-4 | 31,89 ± 0,44 ^b | 35,44 ± 0,41 ^b | 21,83 ± 0,28 ^b |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu prema LSD testu ($P \leq 0.05$) u okviru iste sorte krompira.

Razlike u maksimalnoj masi larvi (Tabela 4.7) su na kraju L2, na granici statističke značajnosti ($F = 3,29$, $P = 0,052$ za Dezire, $F = 3,56$, $P = 0,0457$ za Dragačevku i $F = 3,40$, $P = 0,0429$ za Jelicu). Na kraju L3 uticaj ishrane transformisanim listovima nije značajan ($F = 0,97$, $P = 0,3907$ za Dezire, $F = 0,85$, $P = 0,4408$ za Dragačevku i $F = 1,39$, $P = 0,2593$ za Jelicu), dok kasni L4 na transformisanim listovima ulazi u prepupalnu fazu značajno redukovane mase: do 12,3% za Dezire ($F = 10,17$, $P = 0,0005$), do 14,5% za Dragačevku ($F = 12,58$, $P = 0,0002$) i do 19,4% za Jelicu ($F = 28,40$, $P \leq 0,0001$). Prema tome, larve krompirve zlatice delimično ili potpuno uspevaju kompenzovati potencijalni gubitak biomase uzrokovan ishranom transformisanim listovima tokom L2 i L3 ali ne i tokom L4.

Masa adulta krompirove zlatice, nakon metamorfoze larvi hranjenih OCI/OCII transformisanim listovima, značajno je redukovana u odnosu na kontrolu (Tabela 4.7): do 22,4% za Dezire ($F = 6,01$, $P = 0,0172$), do 20,5% za Dragačevku ($F = 9,86$, $P = 0,0014$) i do 26,3% za Jelicu ($F = 41,15$, $P \leq 0,0001$).

Tabela 4.7. Krajnja masa larvi i adulta krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira.

| | masa \pm SE (mg) | | | |
|------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| linija krompira | L2 | L3 | L4 | adult |
| Dezire kontrola | 12,96 \pm 0,56 ^b | 53,23 \pm 1,35 | 190,15 \pm 2,84 ^b | 143,16 \pm 7,79 ^b |
| Dezire OCI/OCII-16 | 11,05 \pm 0,62 ^a | 50,74 \pm 1,06 | 166,87 \pm 4,64 ^a | 114,66 \pm 6,41 ^a |
| Dezire OCI/OCII-22 | 11,26 \pm 0,54 ^a | 51,81 \pm 1,36 | 167,48 \pm 4,72 ^a | 112,40 \pm 6,66 ^a |
| Dragačevka kontrola | 13,10 \pm 0,52 ^b | 52,98 \pm 2,03 | 188,04 \pm 4,28 ^b | 144,87 \pm 5,62 ^b |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 11,32 \pm 0,38 ^a | 50,15 \pm 1,76 | 157,64 \pm 4,74 ^a | 115,07 \pm 5,25 ^a |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 11,57 \pm 0,57 ^a | 50,41 \pm 1,22 | 160,68 \pm 4,85 ^a | 115,12 \pm 5,83 ^a |
| Jelica kontrola | 12,85 \pm 0,40 ^b | 51,08 \pm 1,26 | 182,77 \pm 3,44 ^c | 144,60 \pm 3,38 ^b |
| Jelica OCI/OCII-3 | 11,54 \pm 0,58 ^{ab} | 48,92 \pm 0,91 | 158,23 \pm 3,38 ^b | 106,24 \pm 3,53 ^a |
| Jelica OCI/OCII-4 | 11,17 \pm 0,42 ^a | 48,98 \pm 0,92 | 147,75 \pm 3,02 ^a | 106,05 \pm 3,47 ^a |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike od kontrole ($P < 0,05$) u okviru iste sorte krompira.

4.6.3. Parametri ishrane larvi i stepen oštećenja listova

Izuzetne performanse uvećanja biomase larvi na transformisanim listovima, tokom L2 i L3, bile su praćene povećanjem brzine konzumacije hrane (Tabela 4.8). U odnosu na larve na netransformisanim listovima, tokom L2, larve su dnevno konzumirale do 29,5% više transgenih listova kod sorte Dezire ($F = 26,33$, $P \leq 0,0001$), do 27,8% više kod sorte Dragačevka ($F = 13,00$, $P = 0,0002$) i do 27,6% više kod sorte Jelica ($F = 33,62$, $P \leq 0,0001$). L3 larve na transformisanim listovima pokazivale su brzinu konzumacije do 25,3% veću kod sorte Dezire ($F = 25,14$, $P \leq 0,0001$), do 29,1% veću kod sorte Dragačevka ($F = 25,82$, $P \leq 0,0001$) i do 29,1% veću kod sorte Jelica ($F = 49,21$, $P \leq 0,0001$). Razlike u brzini konzumacije hrane kod larvi na netransformisanim i transformisanim listovima tokom L4 nisu bile značajne ($F = 2,44$, $P = 0,1059$ za Dezire, $F = 1,23$, $P = 0,3123$ za Dragačevku i $F = 1,99$, $P = 0,1492$ za Jelicu). Prema tome - posmatrana preko apsolutnih vrednosti - ishrana OCI/OCII transformisanim listovima krompira je inicijalno, tokom L2 i L3, povećala dnevnu količinu konzumiranih listova, ali ovaj efekat se izgubio tokom L4. Sa druge strane, posmatrane na relativnom nivou, u odnosu na ostvarenu masu (Tabela 4.9), larve na transformisanim listovima su značajno brže konzumirale listove tokom svih stupnjeva razvića u odnosu na one na netransformisanim listovima (L2: $F = 298,43$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 229,90$, $P \leq 0,0001$ za Dragačevku i $F = 161,53$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu; L3: $F = 61,39$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 53,79$, $P = 0,0012$ za Dragačevku i $F = 24,19$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu; L4: $F = 58,42$, $P \leq 0,0001$ za Dezire, $F = 18,15$, $P \leq 0,0001$ za Dragačevku i $F = 24,89$, $P \leq 0,0001$ za Jelicu).

Tabela 4.8. Brzina konzumacije hrane (CR) različitih stupnjeva razvića larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira. CR je prikazana kao dnevna količina konzumiranih listova.

| linija krompira | brzina konzumacije ± SE (mg/d) | | |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------|
| | L2 | L3 | L4 |
| Dezire kontrola | 8,67 ± 0,32 ^a | 35,16 ± 1,28 ^a | 186,94 ± 6,81 |
| Dezire OCI/OCII-16 | 12,31 ± 0,39 ^b | 46,91 ± 1,38 ^b | 204,07 ± 7,85 |
| Dezire OCI/OCII-22 | 12,12 ± 0,46 ^b | 47,10 ± 1,67 ^b | 203,11 ± 2,40 |
| Dragačevka kontrola | 9,03 ± 0,40 ^a | 32,85 ± 0,76 ^a | 185,87 ± 6,31 |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 12,09 ± 0,60 ^b | 49,66 ± 2,92 ^b | 187,93 ± 5,58 |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 12,50 ± 0,54 ^b | 47,15 ± 0,88 ^b | 199,36 ± 7,62 |
| Jelica kontrola | 8,48 ± 0,17 ^a | 32,61 ± 1,09 ^a | 182,56 ± 4,23 |
| Jelica OCI/OCII-3 | 11,71 ± 0,33 ^b | 45,93 ± 1,11 ^b | 195,58 ± 5,34 |
| Jelica OCI/OCII-4 | 11,12 ± 0,35 ^b | 43,71 ± 0,81 ^b | 184,29 ± 5,36 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$) u okviru iste sorte krompira.

Tabela 4.9. Relativna brzina konzumacije hrane (RCR) različitih stupnjevi razvića larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira. RCR je prikazana kao dnevna količina konzumiranih listova u odnosu na ostvarenu masu larvi.

| linija krompira | relativna brzina konzumacije ± SE (%/d) | | |
|------------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| | L2 | L3 | L4 |
| Dezire kontrola | 67,87 ± 0,89 ^a | 86,79 ± 1,39 ^a | 133,59 ± 1,57 ^a |
| Dezire OCI/OCII-16 | 108,16 ± 1,34 ^b | 113,58 ± 2,28 ^b | 183,56 ± 5,29 ^b |
| Dezire OCI/OCII-22 | 105,04 ± 1,56 ^b | 114,44 ± 2,22 ^b | 189,33 ± 4,20 ^b |
| Dragačevka kontrola | 68,87 ± 0,79 ^a | 85,13 ± 1,84 ^a | 132,65 ± 5,04 ^a |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 106,89 ± 1,29 ^b | 117,45 ± 4,09 ^b | 173,62 ± 5,27 ^b |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 107,74 ± 1,88 ^b | 115,34 ± 3,16 ^b | 168,45 ± 6,79 ^b |
| Jelica kontrola | 66,21 ± 0,66 ^a | 85,23 ± 1,54 ^a | 140,02 ± 3,63 ^a |
| Jelica OCI/OCII-3 | 103,34 ± 0,97 ^b | 115,46 ± 3,16 ^b | 186,68 ± 6,12 ^b |
| Jelica OCI/OCII-4 | 99,81 ± 2,03 ^b | 106,49 ± 4,24 ^b | 183,45 ± 5,58 ^b |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$) u okviru iste sorte krompira.

Tabela 4.10. Efikasnost konverzije unete hrane u biomasu insekta (EI) različitih stupnjeva razvika larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) tokom ishrane na netransformisanim i OCI/OCII transformisanim listovima tri sorte krompira. EI je prikazana kao odnos ostvarene mase larvi i količine konzumiranih listova.

| linija krompira | EI ± SE (%) | | | |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | L2 | L3 | L4 | L2-L4 |
| Dezire kontrola | 45,08 ± 0,63 | 39,45 ± 0,57 | 18,26 ± 0,43 | 21,75 ± 0,61 |
| Dezire OCI/OCII-16 | 44,40 ± 0,80 | 39,96 ± 0,47 | 17,87 ± 0,56 | 22,06 ± 0,57 |
| Dezire OCI/OCII-22 | 44,11 ± 0,76 | 39,70 ± 0,49 | 18,23 ± 0,33 | 21,94 ± 0,60 |
| Dragačevka kontrola | 44,65 ± 0,49 | 39,06 ± 0,65 | 18,34 ± 0,88 | 21,67 ± 0,76 |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 44,16 ± 0,54 | 39,32 ± 0,85 | 17,95 ± 0,64 | 21,77 ± 0,65 |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 43,78 ± 0,49 | 39,01 ± 0,66 | 17,61 ± 0,72 | 21,37 ± 0,66 |
| Jelica kontrola | 44,47 ± 0,42 | 39,23 ± 0,43 | 17,98 ± 0,46 | 21,29 ± 0,45 |
| Jelica OCI/OCII-3 | 44,20 ± 0,38 | 38,79 ± 0,66 | 17,58 ± 0,57 | 21,26 ± 0,52 |
| Jelica OCI/OCII-4 | 44,07 ± 0,49 | 39,08 ± 0,49 | 17,04 ± 0,58 | 21,05 ± 0,49 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira.

Efikasnost konverzije mase konzumiranih listova u biomasu larvi (Tabela 4.10) nije značajno promenjena ishranom larvi krompirove zlatice OCI/OCII transformisanim listovima ni tokom L2 ($F = 0,45$, $P = 0,642$ za Dezire, $F = 0,75$, $P = 0,4832$ za Dragačevku i $F = 0,23$, $P = 0,7922$ za Jelicu), ni tokom L3 ($F = 0,20$, $P = 0,8206$ za Dezire, $F = 0,82$, $P = 0,4125$ za Dragačevku i $F = 0,47$, $P = 0,6308$ za Jelicu), ni tokom L4 stupnja ($F = 0,29$, $P = 0,828$ za Dezire, $F = 0,31$, $P = 0,5092$ za Dragačevku i $F = 0,67$, $P = 0,547$ za Jelicu), kao ni u toku celokupnog posmatranog perioda ishrane larvi (L2-L4: $F = 0,15$, $P = 0,8648$ za Dezire, $F = 0,05$, $P = 0,9543$ za Dragačevku i $F = 0,03$, $P = 0,969$ za Jelicu)

Usled povećane brzine konzumacije hrane, larve krompirove zlatice, transformisanim listovima nanose i veća oštećenja: nedelju dana stare larve su konzumirale do 59,8% više listova sorte Dezire, do 61,9% više listova Dragačevke i 59,0% više listova Jelice u odnosu na larve iste starosti na netransformisanim listovima. Ove razlike u ukupnom oštećenju listova tokom nekoliko sledećih dana dostizale su i do 80,0%. Međutim, larve na transformisanim listovima su ubrzo usporavale sa ishranom ulazeći u prepupalnu fazu, a one na kontrolnim ulazile u L4, stadijum sa najvećim nutritivnim potrebama. Statistička analiza pokazala je da se količina konzumiranih kontrolnih i transformisanih

listova (Tabela 4.11) značajno ne razlikuje tokom L2 ($F = 1,52, P = 0,2378$ za Dezire, $F = 2,20, P = 0,1342$ za Dragačevku i $F = 2,58, P = 0,080$ za Jelicu) i tokom L3 ($F = 0,18, P = 0,8388$ za Dezire, $F = 0,23, P = 0,7497$ za Dragačevku i $F = 0,09, P = 0,9182$ za Jelicu). Za L4 ove razike postaju značajne: larve na transformisanim listovima konzumirale su manju količinu listova ($F = 4,54, P = 0,0200$ za Dezire, $F = 7,69, P = 0,0029$ za Dragačevku i $F = 27,05, P \leq 0,0001$ za Jelicu). Time je i ukupno oštećenje OCI/OCII transgenih listova krompira, uzrokovano ishranom larvi krompirove zlatice, do 15,6% manje za Dezire ($F = 4,54, P = 0,0202$), do 15,6% za Dragačevku ($F = 7,03, P = 0,0044$) i do 18,5% manje za Jelicu ($F = 27,05, P \leq 0,0001$) u odnosu na oštećenje netransformisanih listova.

Tabela 4.11. Stepen oštećenja netransformisanih i OCI/OCII transformisanih listova tri sorte krompira tokom ishrane različitih stupnjeva razvića larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Sepen oštećenja listova je prikazan kao količina lisne mase konzumirana od strane larvi.

| linija krompira | stepen oštećenja listova \pm SE (mg) | | | |
|------------------------|--|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | L2 | L3 | L4 | L2-L4 |
| Dezire kontrola | 28,62 \pm 1,07 | 102,08 \pm 4,53 | 749,53 \pm 22,28 ^b | 880,23 \pm 23,83 ^b |
| Dezire OCI/OCII-16 | 26,23 \pm 0,97 | 99,31 \pm 3,27 | 654,74 \pm 29,67 ^a | 756,29 \pm 30,90 ^a |
| Dezire OCI/OCII-22 | 26,68 \pm 1,02 | 102,12 \pm 3,54 | 631,41 \pm 26,31 ^a | 763,21 \pm 24,89 ^a |
| Dragačevka kontrola | 29,38 \pm 1,29 | 102,24 \pm 2,28 | 736,13 \pm 35,25 ^b | 867,75 \pm 36,71 ^b |
| Dragačevka OCI/OCII-4 | 25,65 \pm 1,39 | 98,74 \pm 5,46 | 598,82 \pm 34,37 ^a | 723,21 \pm 34,20 ^a |
| Dragačevka OCI/OCII-10 | 26,34 \pm 1,27 | 99,56 \pm 3,45 | 625,83 \pm 23,37 ^a | 751,73 \pm 24,49 ^a |
| Jelica kontrola | 28,89 \pm 0,88 | 97,44 \pm 3,18 | 732,12 \pm 17,47 ^b | 858,45 \pm 20,76 ^b |
| Jelica OCI/OCII-3 | 25,98 \pm 1,21 | 96,36 \pm 2,27 | 621,73 \pm 14,90 ^a | 744,06 \pm 14,93 ^a |
| Jelica OCI/OCII-4 | 25,94 \pm 1,03 | 96,74 \pm 1,69 | 577,18 \pm 16,79 ^a | 699,86 \pm 18,02 ^a |

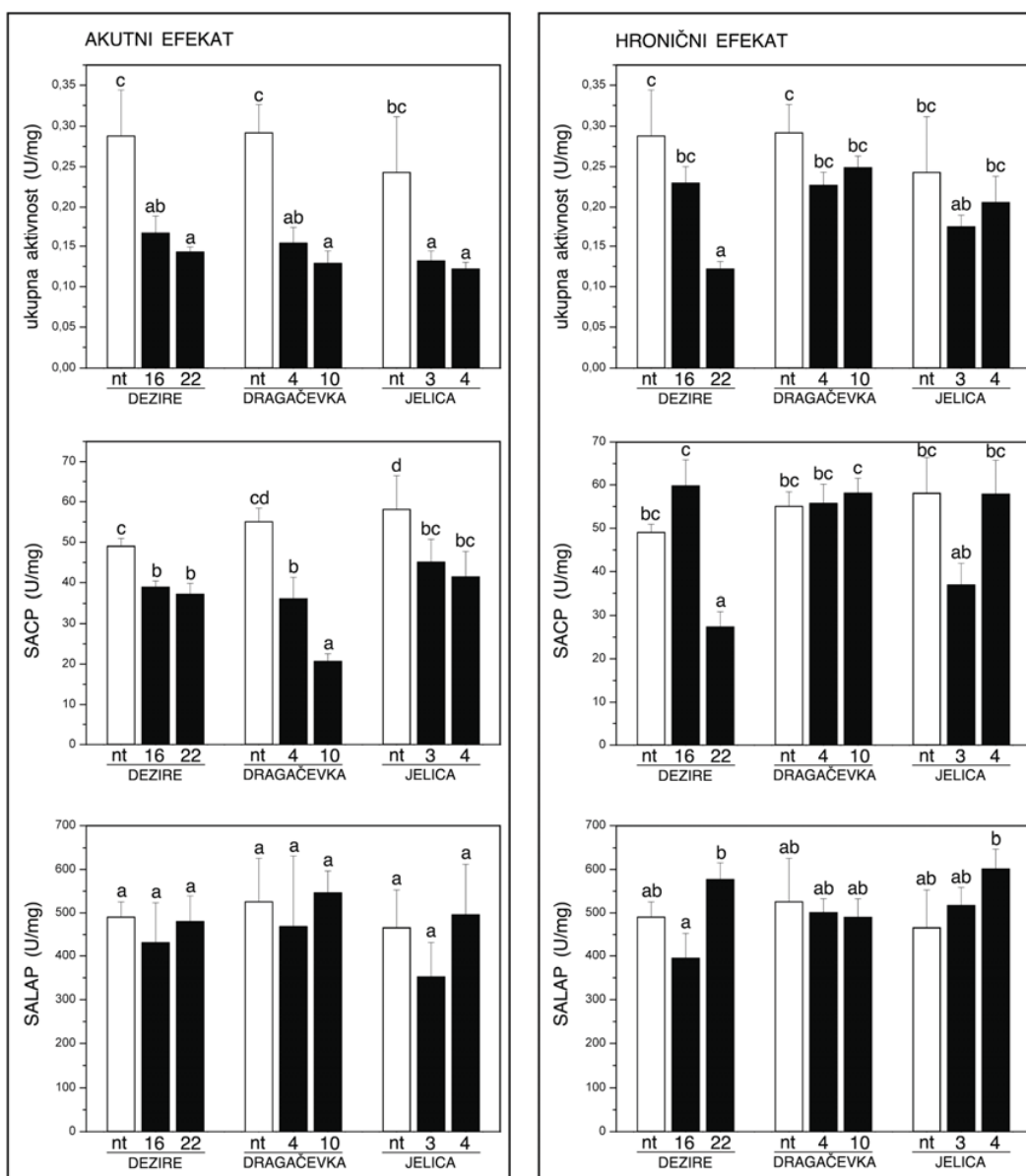
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE). Veličina uzorka je 15 larvi za svaku testiranu liniju krompira. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$) u okviru iste sorte krompira.

4.6.4. Analiza digestivnih proteinaza

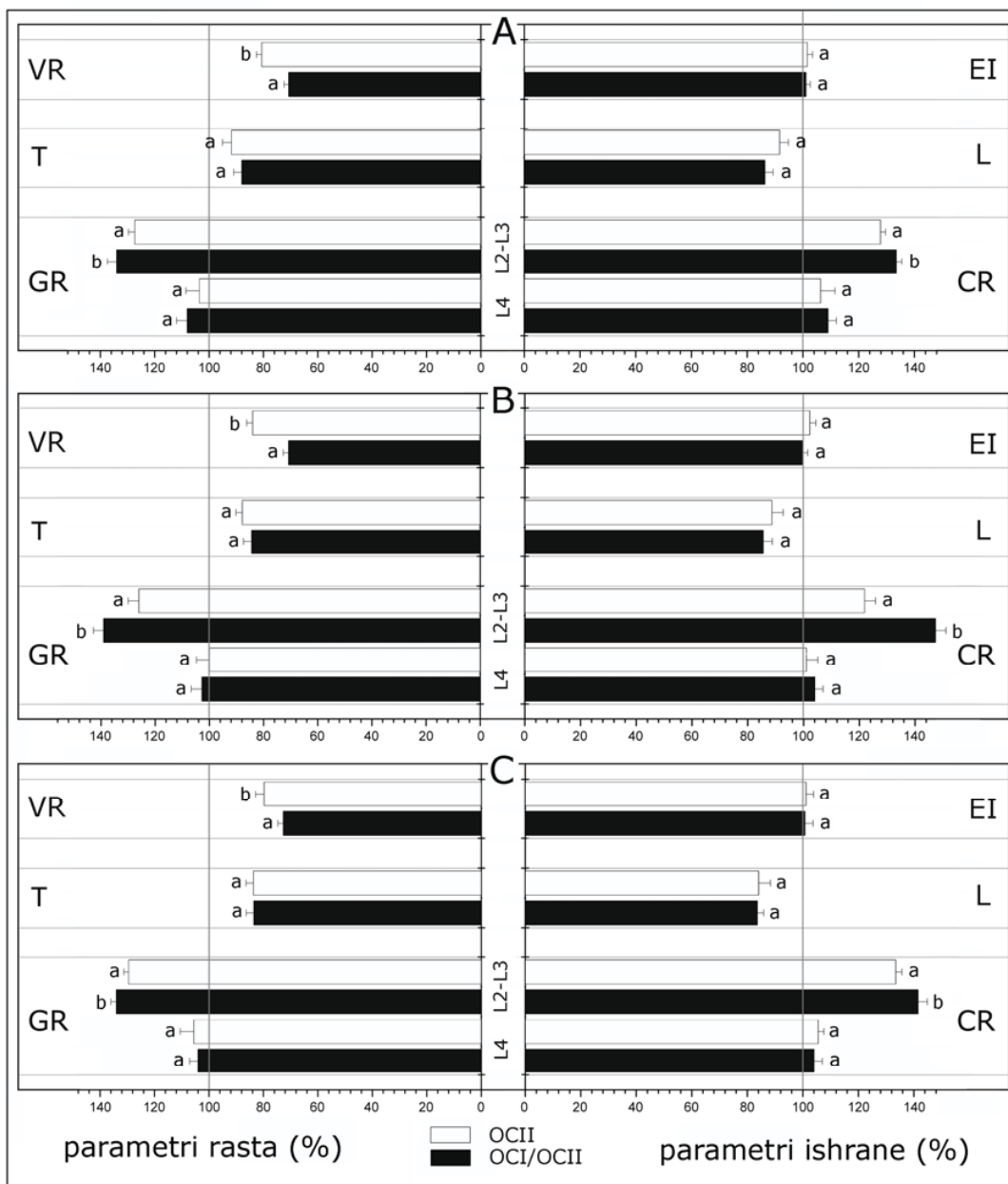
Ukupna proteinazna (azokazeinazna) aktivnost kod larvi krompirove zlatice hranjenih na kontrolnim, netransformisanim listovima krompira, 24h nakon prebacivanja na OCI/OCII listove, pokazuje smanjenje aktivnosti kod L3 larvi od 42-56% u zavisnosti od transformisane linije krompira. Smanjenje azokazeinazne aktivnosti praćeno je sa inhibicijom specifične aktivnosti cisteinskih proteinaza do oko 62%, dok je nivo aktivnosti leucin aminopeptidaze (egzopeptidaza), ostao na kontrolnom nivou (Grafik 4.8, akutni efekat). Sa druge strane, pri hroničnoj ingestiji OCI/OCII listova krompira, ukupna i aktivnost cisteinskih proteinaza kod L3 larvi – osim kod onih hranjenih lišćem linije 22 sorte Dezire - ne pokazuje značajna odstupanja od kontrolnog nivoa, ukazujući na adaptaciju proteaznog sistema larvi na prisustvo rekombinantnih orizacistatina u ishrani (Grafik 4.8, hronični efekat).

4.6.5. OCII vs OCI/OCII

Kombinovani uticaj cistatina iz pirinča na larve krompirove zlatice poređen je sa onim koji je pokazan za transgene linije krompira koje ekspimiraju samo jedan orizacistatin, OCII (*Cingel*, 2006). Iako larve krompirove zlatice na OCI/OCII linijama krompira, u odnosu na OCII, pokazuju trend daljeg smanjenja maksimuma ostvarene mase i manjeg ukupog oštećenja listova, na relativnom nivou, ove razlike između tretmana (OCII vs OCI/OCII) nisu značajne. Sa druge strane, prisustvo još jednog cistatina u listovima krompira, tokom L2-L3, značajno povećava intenzitet kompenzatorne ishrane i, ne menjajući efikasnost konverzije lisne u telesnu masu, dodatno povećava brzinu rasta larvi. Dodatno povećanje performansi rasta i ishrane na OCI/OCII listovima (GR i CR) praćeno je i uvećanjem još jedne karakteristike performanse insekta - daljim skraćanjem trajanja razvića (Grafik 4.9).



Grafik 4.8. Digestivna aktivnost proteaza trećeg stupnja larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) na kontrolnim (nt) i OCI/OCII transformisanim listovima krompira. Specifična aktivnost ukupnih proteaza (azokazeinaza), specifična aktivnosti cisteinskih proteinaza (SACP) i specifična aktivnost leucin aminopeptidaza (SALAP) analizirane su kod L3 larvi koje su nakon piljenja neprestano hranjenje OCI/OCII transformisanim listovima (hronični efekat) kao i 24h nakon prebacivanja L3 larvi sa netransformisanih na OCI/OCII listove krompira (akutni efekat). Varijacije (barovi) predstavljaju odstupnja od srednje vrednosti (SE), n=3-6 za svaki tretman. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$).



Grafik 4.9. Performanse larvi krompireve zlatice (*Leptinotarsa demcclineata* Say) na OCII/OCII i OCII transgenim listovima krompira sorti Dezire (A), Dragačevka (B) i Jelica (C). Parametri performansi su prikazani kao relativne vrednosti (%) u odnosu na kontrolu (100%) i za svaki tretman (OCII ili OCI/OCII) predstavljaju srednju vrednost rezultata dobijenih za dve nezavisne transgene linije. **VR:** vreme razvića L2-PP; **T:** maksimum ostvarene mase; **GR:** dnevna brzina rasta; **EI:** efikasnost konverzije unete hrane L2-PP; **L:** ukupno oštećenje listova; **CR:** dnevna brzina konzumacije hrane. Veličina uzorka je 20-30 larvi za svaki parametar. Varijacije (barovi) predstavljaju odstupnja od srednje vrednosti (SE). Različita slova ukazuju na statistički značane razlike prema LSD testu ($P \leq 0.05$).

5. DISKUSIJA

Transformacija biljaka posredovana bakterijama iz roda *Agrobacterium* - svojom efikasnošću, stabilnom T-DNK integracijom i ekspresijom gena od interesa, kao i relativno visokim procentom biljaka normalnog fenotipa - postao je dominantan metod za dobijanje transgenih biljaka. Protokoli transformacije krompira (*Solanum tuberosum* L.) razvijeni su od strane brojnih istraživačkih grupa (pregled dat od strane *Chakravarty* i sar. 2007; *Vinterhalter* i sar. 2008) i genetički inženjering različitih kultivara krompira postao je rutina mnogih laboratorija. Tako su dobijene transgene biljke krompira povećane otpornosti na viruse (*Hoekema* i sar. 1989; *Thomas* i sar. 1997, 2000; *Hassairi* i sar. 1998; *Kaniewski* i sar. 1990; *Lawson* i sar. 1990, 2001; *MacKenzie* i sar. 1991; *Van Der Wilk* i sar. 1991; *Doreste* i sar. 2002; *Kawchuk*, 2002; *Ehrenfeld* i sar. 2004; *Missiou* i sar. 2004; *Arif* i sar. 2009), bakterijske i gljivične patogene (*Wu* i sar. 1995; *Lorito* i sar. 1998; *Arce* i sar. 1999; *Yu* i sar. 1999; *Ahrenholtz* i sar. 2000; *Serrano* i sar. 2000; *Zhen* i sar. 2000; *Watanabe* i sar. 2000; *Gao* i sar. 2000; *Osusky* i sar. 2000, 2004; *Liapkova* i sar. 2001; *Felcher* i sar. 2003; *Song* i sar. 2003; *Van der Vossen* i sar. 2003; *Smilde* i sar. 2005; *Kuhl* i sar. 2007; *Almasia* i sar. 2008; *Halterman* i sar. 2008; *Maniruzzaman* i sar. 2010), insekte (*Down* i sar. 1996; *Gatehouse* i sar. 1996, 1997; *Chakrabarti* i sar. 2000; *Marchetti* i sar. 2000; *Mohammed* i sar. 2000; *Davidson* i sar. 2002a,b; *Douches* i sar. 2002; *Meiyalaghan* i sar. 2005, 2006a,b; *Cooper* i sar. 2009), nematode (*Urwin* i sar. 1995b, 2001, 2003; *Lilley* i sar. 2004; *Estrada* i sar. 2007; *Green* i sar. 2012), abiotički stres (*Perl* i sar. 1993; *Wallis* i sar. 1997; *Jeong* i sar. 2001; *Deryabin* i sar. 2003; *Turhan*, 2005; *Tang* i sar. 2008; *Hemavathi* i sar. 2009, 2010, 2011; *Waterer* i sar. 2010), herbicide (*Padegimas* i sar. 1994; *Eltayeb* i sar. 2010) ili poboljšane nutritivne vrednosti krtola (*Chong* i sar. 1997; *Visser* i sar. 1997a,b; *Navratil* i sar. 1998; *Chakraborty* i sar. 2000, 2010; *Schwall* i sar. 2000; *Regierer* i sar. 2002; *Benmoussa* i sar. 2004; *Ducreux* i sar. 2005a,b). U svim ovim studijama korisna osobina je kontrolisana samo jednim heterolognim genom. Ipak, postizanje snažnije, opsežnije ili trajnije zaštite, kao i kontrola složenih metaboličkih puteva zahteva koordinisanu manipulaciju više od jednog gena. Ovi zahtevi doveli su do toga da strategija “slaganja” gena (engl. *gene stacking*) postane jedan od vodećih pristupa savremene biotehnologije biljaka (*Halpin*, 2001, 2005; *Francois* i sar. 2002; *Halpin & Boerjan*, 2003; *Dafny-Yelin & Tzfira*, 2007).

Najjednostavniji način za slaganje dva ili više transgena je seksualna hibridizacija transgenih biljaka (*Bizily* i sar. 2000; *Cao* i sar. 2002; *Datta* i sar. 2002; *Samis* i sar. 2002; *Zhao* i sar. 2003; *Lucker* i sar. 2004). Međutim, kako su komercijalne sorte krompira autotetraploidi sa tetrasomatičkim nasleđivanjem, visoke heterozigotnosti i različitih nivoa sterilnosti, genetička stabilnost hibridnih kultivara se gubi nakon samo-ili međusobnog oprašivanja izabranih linija (*Conner & Christey*, 1994). Sa druge strane, pojava da su, tokom transformacije, insercije T-DNK u genom biljaka u velikoj meri nasumične (*Gelvin & Kim*, 2007), uključujući i krompir (*Jacobs* i sar. 1995; *El-Kharbotly* i sar. 1996), obezbedila je osnovu za uspešno slaganje gena transformacijom sa više različitih plazmida: simultana transformacija sa više željenih gena ili postupna re-transformacija postali su pristupi koji kod krompira mogu omogućiti relativno brzo i stabilno slaganje transgena (*Chang* i sar. 2002; *Morris* i sar. 2006; *Meiyalaghan* i sar. 2010).

Glavni nedostatak ovih metoda slaganja gena je potreba za različitim selekcionim markerima za svaki novi, introdukovani gen. U slučaju gena za otpornost na antibiotike, najčešće korišćene selekzione metode, javljaju se dodatna strahovanja zbog potencijalne biološke opasnosti (*Miki & McHugh*. 2004; *Craig* i sar. 2008; *Miki* i sar 2009). Prisusvo gena za otpornost na antibiotike u transgenim biljkama može omogućiti horizontalni transfer ovih gena sa biljaka na patogene bakterije ili na crevne mikroorganizme (*Darbani* i sar. 2007). Zato se, nakon selekzione faze, primenjuju različite strategije za eliminaciju marker gena u cilju dobijanja transgenih biljaka bez selekcionih gena (*Darbani* i sar. 2007; *Ramana Rao* i sar. 2011). Ipak, mnogi metodi za uklanjanje selekcionih gena su dugotrajne, složene procedure koje najčešće uključuju seksualno ukrštanje (*Hohn* i sar. 2001; *Hare & Chua* 2002) i/ili nisu dovoljno razrađene i efikasne da bi našle komercijalnu primenu (*Konig*, 2003). Takođe, metode za uklanjanje selekcionih gena su neefikasne ili nisu primenljive za biljke koji se razmnožavaju aseksualnim ili, kao što je u slučaju krompira, propagiraju vegetativnim putem. Iako je moguće dobiti transgene biljke izostavljajući selekciju i time izbeći potrebu za marker genima (eng. *marker-less transformation*: *Popelka* i sar. 2003; *De Vetten* i sar. 2003; *Doshi* i sar. 2007; *Jia* i sar. 2007; *Ferradini* i sar. 2011a) - ovi metodi su niske efikasnosti i zahtevaju analizu velikog broja potencijalnih transformanata. U slučaju

krompira, pod neselektivnim uslovima transformacije, samo 0,2% regenerisanih izdanaka su transgeni, a ovaj procenat se može povećati korišćenjem supervirulentnih agrobakterijskih sojeva do 4,5% (*De Vetten* i sar. 2003). Uzimajući u obzir veliki broj biljaka potrebnih da bi se identifikovale linije podesne za komercijalizaciju, niska efikasnost je, iz ekonomske perspektive, u velikoj meri ograničila upotrebu ovog metoda. Koekspresija dva ili više gena metodama koje koriste samo jedan selekциони marker predstavlja pristup kojim se, delimično, mogu prevazići navedene poteškoće (*Chang* i sar. 2002; *Morris* i sar. 2006). Pored toga *nptII*, gen koji omogućava otpornost na antibiotik kanamicin, je najpodesniji selekциони marker za transformaciju krompira, dok su alternative - potrebne prilikom transfera više gena - manje efikasne (*Barrell* i sar. 2002; *Barrell & Conner* 2006; *Meiyalaghan* i sar. 2010). Zbog ovih razloga prilikom ko-transformacije i re-transformacije domaćih sorti krompira Dragačevke i Jelice, kao i kontrolnog kutivara Dezire, *nptII* gen je korišćen kao jedini selekциони marker.

Procedura koja je korišćena pri ko-transformaciji i re-transformaciji domaćih sorti krompira uključila je neka proceduralna unapređenja, u odnosu na prethodni protokol (*Cingel* i sar. 2010), na kome je zasnovana. Promene su imale za cilj da skrate vreme potrebno za dobijanje transgenih biljaka, da redukuju broj lažno-pozitivnih potencijalnih transformanata, kao i da umanje mogućnost pojave netipičnih biljaka usled somaklonalnih varijacija.

Prva važna optimizacija protokola je skraćivanje vremena indukcije kalusa, sa 4 na 2 nedelje. Time je u velikoj meri omogućeno da nezavisni događaji transformacije budu razdvojeni pre nego što dve ili više kalusnih kolonija međusobno srastu. Istovremeno, umanjena je i mogućnost pojave somaklonalnih varijacija povezana sa dugim trajanjem kalusne faze (*Hanish ten Cate & Ramulu*, 1987). Glavni uzrok ovih genetičkih i epigenetičkih odstupanja povezan je sa stresnim uslovima *in vitro* kulture tkiva (*Walbot & Cullis*, 1985; *Sala* i sar. 1999) i "pripisuju" se metilaciji DNK, amplifikaciji ili aktivaciji transpozonskih elemenata (*Brar & Jain*, 1998). Iako mehanizmi ovih varijacija nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da je narušavanje epigenetičkih mehanizama ćelijske regulacije tokom kalusne faze njihov glavni uzrok (*Grandbastien*, 1998; *Kubis* i sar. 2003; *Tanurdzic* i sar. 2008).

Druga proceduralna optimizacija - uklanjanje početnih eksplantata i prebacivanje samo potencijalno transformisanog, kalusnog tkiva na podlogu za regeneraciju izdanaka - redukovala je potencijalno negativni uticaj okolnog umirućeg tkiva. Metaboliti oslobođeni iz netransformisanog tkiva početnog eksplantata, koje nekrozira usled prisustva antibiotika korišćenog za selekciju i bakterijske infekcije, mogu inhibirati regeneraciju transformisanih ćelija, i istovremeno, dodatno povećavajući stresne uslove, pospešiti pojavu somaklonalnih varijacija (Conner, 1986). Redukcija pojave netipičnih biljaka tokom transformacije je neophodna da bi se povećao broj transgenih linija ekvivalentnih roditeljskom klonu sa dodatnom korisnom osobinom ekspresije transgena (Conner, 2007).

Treća proceduralna modifikacija je intenziviranje selekcionog pritiska povećanjem koncentracije kanamicina u selektivnim podlogama. Iako se, kod krompira, koncentracija kanamicina od 50 mg/l smatra adekvatnom za kontrolu netransformisanih ćelija i ne odlaže inicijaciju pupoljaka iz transformisanog tkiva (Banerjee i sar. 2006) istovremeno može dozvoliti i pojavu lažno-pozitivnih potencijalnih transformanata (Wenzler i sar. 1989; Cingel i sar. 2010). Pojava ovakvih "bekstava" (eng. *escapes*) nije netipična za transformaciju krompira (Conner i sar. 1991; Davidson i sar. 2004), jer inicijalne koncentracije selekcionog agensa predstavljaju kompromis između dovoljno visoke da eliminiše "bekstva" i dovoljno niske da dozvoli brzu regeneraciju i dobijanje transgenih linija (Barrell i sar. 2002). Takođe, previsok selektivni pritisak može dovesti do eliminacije lažno-negativnih linija, linija sa niskom ekspresijom selektivnog marker gena i, istovremeno, može dati prednost linijama sa početno visokom ekspresijom - usled prisustva višestrukih kopija transgena. Prisustvo više kopija transgena može voditi ka utišavanju gena (Conner & Jacobs, 1999), posebno nakon uklanjanja selektivnog agensa. Prilikom ko- i re-transformacije domaćih sorti krompira, koncentracija kanamicina od 75 mg/l u CIM podlogama je u potpunosti inhibirala razvoj netransformisanih ćelija i nije odložila pojavu pupoljaka na SIM podlogama. Dalje povećanje koncentracije kanamicina na 100 mg/l u RIM podlozi, za razliku od predhodnog protokola (Cingel i sar. 2010), prema PCR analizi, u potpunosti je eliminisalo pojavu lažno-pozitivnih transgenih linija. Ovim je potvrđena i visoka efikasnost sistema za transfer gena posredovanog *Agrobacterium*-om u kome se

otpornost na kanamicin koristi kao selektivni marker za krompir (*Barrell i sar. 2002*). Istovremeno, ovo povećanje selekcionog pritiska imalo je za cilj da, eventualno, favorizuje potencijalno transformisane linije kod kojih je došlo do integracije obe T-DNK.

Efikasnost formiranja kalusa, broj kalusa sa pupoljcima i broj izdanaka po eksplantatu, nakon ovih modifikacija, ostala je u opsegu vrednosti dobijenih za ranije korišćen protokol transformacije domaćih sorti krompira (*Cingel i sar. 2010*). Time je 14 dana ranije dobijen približno isti broj regeneranata, izbegnuta je pojava lažno-pozitivnih transgenih linija, smanjena potencijalna mogućnost pojave netipičnih biljaka i, eventualno, data je prednost dvostrukim transformantima.

5.1. Ko-transformacija sojevima *A. tumefaciens* koji nose *OCI* i *OCII* gen

Kotransformacija, danas, predstavlja jedan od najuspešnijih pristupa introdukcije više gena od interesa u genom biljaka - sa mogućnošću istovremenog uvođenja do 11 heterolognih gena u jednu biljku (*Chen i sar. 1998*). Najspektakularniji primer ove strategije je tzv. "zlatni pirinač" (eng. "*golden rice*") - inženjering metaboličkog puta β -karotena u endosperm pirinča (*Ye i sar. 2000*) - koji može rešiti deficienciju vitamina A u siromašnim regionima sveta gde je pirinač glavna namirnica. Efikasnost ovog metoda je pokazana i u manipulaciji metaboličkim putevima u drugim sistemima (*Slater i sar. 1999; Yu i sar. 2003; Li i sar. 2003, 2004; Morris i sar. 2006*), povećanju otpornosti biljka uvođenem nekoliko insekticidnih gena (*Maqbool & Christou 1999; Maqbool i sar. 2001; Rao i sar. 2001; Meiyalaghan i sar. 2010*) ili uvođenjem kombinacija različitih korisnih karakteristika (*Li i sar. 2009*). Takođe, kao sistem za eliminaciju selektivnih marker gena, ko-transformacija je jedna od najčešće korišćenih metoda (*Daley i sar. 1998; Tu i sar. 2003; Vidal i sar. 2003; Breitler i sar. 2004; Park i sar. 2004; Dutt i sar. 2008; Sripriya i sar. 2008, 2011*).

Koristeći tehnike transfera gena, više grupa autora pokazalo je da se frekvencija ko-transformacije odvojenih gena kreće do 30% (*Uchimiya i sar. 1986; McKnight i sar.*

1987; Christou i sar. 1990; De Block & Debrouwer 1991; Carrer i sar. 1995; Poirier i sar. 2000; Chang i sar. 2002; Miller i sar. 2002; Radchuk i sar. 2005; Morris i sar. 2006; De Buck i sar. 2009; Ramana Rao & Veluthambi, 2010). Sa druge strane postoje podaci da frekvenca ko-transformacije može dostići i 35-88% (De Buck i sar. 1998; Schocher i sar. 1998; Tagu i sar. 1998; Park i sar. 2004; Faize i sar. 2011).

Frekvece ko-integracije *OCI* i *OCII* gena kod sorti Dezire i Dragačevka, od 20 - 22%, ostvarene u ovom radu, u opsegu su onih (24% i 10%) prethodno dobijenih za ko-transformaciju krompira sa dva različita soja *A. tumefaciens* i pri upotrebi samo jednog selekcionog marker gena (Chang i sar. 2002; Morris i sar. 2006). Veća efikasnost ko-integracije gena prilikom ko-transformacije krompira postignuta je biolističkom tehnologijom: 41% za dva gena i 17% za tri gena (Romano i sar. 2003). Sa druge strane, značajno niža učestalost ko-integracije orizacistatinskih gena kod sorte Jelica više odgovara onima, manjim od 5%, dobijenim za druge sisteme (Noriyuki & Soh, 2004; Ferradini i sar. 2011). To, delimično, i nije iznenađujuće imajući u vidu da je pokušaj ko-trasformacije krompira Romano i saradnika (neobjavljeni rezultati) pomoću *A. tumefaciens* bio neuspešan.

Prema Depicker-u i saradnicima (1985) svaki transformacioni događaj je nezavisan i učestalost ko-transformacije je jednaka produktu pojedinačnih frekvenci transformacije ako su dve T-DNK u različitim sojevima *A. tumefaciens* - što rezultuje u niskoj učestalosti ko-transformacije. Ipak, De Block & Debrouwer (1991) i Chang i saradnici (2002) zabeležili su mnogo više frekvence ko-transformacije prilikom infekcije biljnog tkiva sa dva agrobakterijska soja i selekciji za samo jedan od markera, nego što to predviđa hipoteza Depicker-a i saradnika. Isto tako, De Buck i saradnici (1998) su pokazali da je, prilikom ko-transformacije duvana i arabidopsisa, frekvenca integracije druge T-DNK u ćelijama koje su transformisane prvom selektovanom T-DNK, nezavisna od selekcije i da ko-transformacija biljne ćelije sa različitim sojevima *A. tumefaciens*, zapravo, predstavlja čest događaj. Visoke frevence ko-integracije - koje prilikom ko-transformacije mogu biti i veće od učestalosti integracije samo jednog od gena u biljnu ćeliju (De Buck i sar. 1998) - ukazuju na to da istovremeni transferi više gena nisu nasumični i nezavisni događaji. Pretpostavlja se da će integracija jedne T-

DNK unutar specifičnog regiona genoma biljke posredovati inserciju druge T-DNK (*De Buck* i sar. 1998; *Radchuk* i sar. 2005). Istovremeno, prilikom ko-transformacije, integracija više transgena se najčešće dešava unutar jednog ili manjeg broja genskih lokusa biljke (*Chen* i sar. 1998; *Wu* i sar. 2002), sa visokom tendencijom fizičkog povezivanja dve ili više T-DNK prilikom kointegracije (*De Neve* i sar. 1997; *De Buck* i sar. 1999; *Poirier* i sar. 2000; *Radchuk* i sar. 2005). Kointegracija T-DNK, koje potiču sa različitih plazmida ili različitih agrobakterija, na isto mesto unutar genoma biljke podržava hipotezu o njihovoj ligaciji pre ili tokom insercije u genom biljke (*De Buck* i sar. 1999; *Radchuk* i sar. 2005). Takođe je moguće i da različite T-DNK najpre budu integrisane na isto mesto, a potom, i povezane. U ovom slučaju bi mesto integracije prve T-DNK delovalo kao “vruća” tačka za integraciju drugih T-DNK u isti lokus (*Kohli* i sar. 1998; *Wu* i sar. 2002).

Povezivanje različitih T-DNK tokom ko-transformacije, obezbeđujući koordinisanu ekspresiju transgena, može biti prednost kada se nekoliko transgena koristi za kontrolu metaboličkih puteva ili proučavanje interakcije gena. Kosegregacija povezanih gena takođe je poželjna radi olakšanog dobijanja homozigotnih linija i integracije dodatnih transgena seksualnim ukrštanjem. Sa druge strane, vezana integracija T-DNK sa različitih plazmida otežava razdvajanje marker gena i gena od interesa - ako je cilj produkcija transgenih linija bez marker gena.

Postojeći podaci podržavaju pretpostavku da je interakcija između bakterije i biljne ćelije glavni ograničavajući faktor prilikom ko-transformacije (*Depicker* i sar. 1986; *McCormac* i sar. 2001; *Radchuk* i sar. 2005) u odnosu na sam proces integracije T-DNK i broj biljnih ćelija kompetentnih da budu transformisane. Prema tome, relativna količina bakterijskih ćelija svakog bakterijskog soja tokom kokultivacije bi trebalo da ima uticaj na efikasnost ko-transformacije. U skladu sa tim *Park* i saradnici (2004) su postigli najveću efikasnost ko-transformacije koristeći smešu dve agrobakterije u jednakom odnosu. Sa druge strane, odnos agrobakterija (2:1, 1:1 ili 1:2) ne mora značajno da utiče na efikasnost ko-transformacije (*Dutt* i sar. 2008), što je u skladu sa rezultatima *De Buck*-a i saradnika (2000): da i T-DNK transfer i T-DNK integracija, zajedno i u istoj meri ograničavaju frekvencu transformacije i ko-transformacije. Takođe, nasuprot

nalazima *McCormac*-a i saradnika (2001), frekvencija ko-integracije izgleda da ne zavisi od veličine T-DNK (*Depicker* i sar. 1986; *McKnight* i sar. 1987; *De Neve* i sar. 1997; *De Buck* i sar. 1998; *Slater* i sar. 1999; *Poirier* i sar. 2000) tako da, prilikom transfera posredovanog *Agrobacterium*-om, svaki gen ima jednake šanse za integraciju u biljni genom - nezavisno od veličine i prirode kodirajućeg regiona (*Radchuk* i sar. 2005).

Prema tome, slične frekvencije integracije *OCI* i *OCII* gena, zabeležene u ovom radu, mogu biti usled uspostavljanja interakcije bakterija/biljna ćelja iste efikasnosti - jer su oba plazmida unutar istog EHA101 soja *A. tumefaciens* i bakterijske suspenzije u odnosu 1:1 korišćene prilikom inokulacije i iste uspešnosti T-DNK transfera i integracije u genom biljke domaćina jer se oba gena nalaze u istom regionu T-DNK i približno su iste veličine. Istovremeno, ovo objašnjava i slične frekvencije kointegracije *OCI* i *OCII* kod sorti Dezire i Dragačevka, ali ne i, odnosu na njih, značajno manji procenat *OCI/OCII* transformanata sorte Jelica. Postojanje "vrućih" tačaka u biljnom genomu (*Linacero* i sar. 2000), kao i podatak da visok nivo T-DNK transfera u biljnu ćeliju istovremeno ne mora da dovede i do visoke stope integracije T-DNK u biljni genom (*Maximova* i sar. 1998) upućuju na uticaj genoma domaćina na integraciju transgena - i mogu objasniti manji broj kanamicin rezistentnih biljaka dobijenih kod sorte Jelica, i možda, bar delimično, manju efikasnost ko-transformacije. Takođe, prema *De Buck*-u i saradnicima (2009) prilikom transformacije i ko-transformacije, biljna ćelija - a ne *A. tumefaciens* - je ta koja određuje kompleksnost obrasca integracije T-DNK.

5.2. Re-transformacija OCI linije krompira sorte Jelica sa OCII genom

Postupna re-transformacija transgenih biljaka sa dodatnim heterolognim genima nije metod koji se uobičajeno koristi za slaganje gena u genom biljaka koje se umnožavaju seksualnim putem, ali može biti atraktivan za one koje se, poput krompira, propagiraju vegetativnim putem. Nekoliko autora je pokazalo validnost ovog pristupa u multigenskoj kontroli metaboličkih puteva (*Jobling* i sar. 2002; *Rosati* i sar. 2003; *Qi* i sar. 2004), u povećanju otpornosti na abiotički stres (*Singla-Pareek* i sar. 2003) ili, na primer, dodatnom povećanju "vrednosti" već postojeće transgene linije (*Lapierre* i sar. 1999;

Chan i sar. 2005; *Ahmad* i sar. 2010). Ovaj pristup posebno može biti uspešan za slaganje gena koji povećavaju otpornost prema štetočinama i patogenima jer omogućava da se drugi gen(i) doda transgenoj liniji koja već poseduje visoku ekspresiju prvog heterolognog gena (*Meiyalaghan* i sar. 2010; *Ntui* i sar. 2011; *Rivero* i sar. 2012).

U cilju dodatnog povećanja otpornosti, prethodno dobijena OCI transformisana linija 21 (OCI-21) krompira sorte Jelica je re-transformisana drugim cistatskim genom poreklom iz pirinča, *OCI1*. OCI-21 je, na osnovu visoke OCI ekspresije i normalnog fenotipa, izabrana kao početna roditeljska linija za re-transformaciju.

Pad regenerativnog odgovora nakon inokulacije sa *A. tumefaciens* uobičajen je fenomen i uočen je prilikom dobijanja OCI transformisanih linija kao i prilikom ko-transformacije. Ipak, nakon inokulacije OCI-21 linije zabeležen je značajan porast regenerativnog potencijala u odnosu na netransformisanu kontrolu. Ranije formiranje pupoljaka i porast regenerativnog potencijala nakon inokulacije odsečaka listova sorte Jelica dokumentovani su i ranije (*Cingel* i sar. 2010). Ovo može biti pripisano samom procesu transformacije koji može stimulisati diferencijaciju ćelija kalusa u meristemske ćelije (*Wang* i sar. 2005) i/ili efektu antibiotika cefotaksima, korišćenog za eliminaciju bakterija nakon inokulacije, koji može stimulisati pojavu kalusa i pozitivno delovati na regeneraciju i pojavu pupoljaka (*Mathias & Boyd*, 1986; *Yepes & Aldwinckle*, 1994; *Bhau & Wakhlu*, 2001; *Danilova & Dolgikh*, 2004). Ipak, kako su i neinokulisani OCI-21 odsecci listova takođe pokazali povišeni regenerativni potencijal, koji se značajno nije razlikovao od inokulisanih eksplantata iste linije, uočeni porast morfogenetskog potencijala nije moguće povezati sa samim procesom re-transformacije. Nepostojanje ovih razlika ukazuje na moguće, bilo genetičke ili epigenetičke, promene povezane sa insercijom prvog (*OCI*) transgena.

Genetičke promene mogu nastati usled nepovratnog narušavanja sekvence endogene biljne DNK, prilikom insercije heterolognog gena (*Wilson* i sar. 2006). Pokazano je da kod mnogih biljnih vrsta, uključujući i *Solanaceae* kao što su krompir i duvan (*Koncz* i sar. 1989; *Lindsey* i sar. 1993), učestalost insercija T-DNK unutar kodirajućih ili poznatih regulatornih genskih sekvenci prelazi 50%. Dodatno, mutacije uzrokovane

insercijom transgena (eng. *insertion-site mutations*), pogotovo ako je heterologni gen pod kontrolom snažnog promotora, mogu promeniti obrasce ekspresije susednih gena, na primer povećavajući ili smanjujući njihovu ekspresiju (*Wilson i sar. 1996; Weigel i sar. 2000; Jeong i sar. 2002; Ichikawa i sar. 2003*). Drugi tip mutacija koje se prenose na sledeće generacije - povezan sa samim procesom transformacije - može nastati u bilo kom delu biljnog genoma (eng. *genome-wide mutations*) i ogleđa se u DNK polimorfizmu između transgenih i netransgenih biljaka (*Sala i sar. 2000*). *Bhatt i saradnici (1998)*, kao i *Wu i saradnici (2009)*, su pokazali da ove poslednje promene imaju uzrok epigenetičke prirode: sam proces transformacije može aktivirati transpozonske elemente (TEs) koji, potom, povećavaju stopu mutacija i genomske rearanžmane (*Matzke & Matzke 1998; Matzke i sar. 2000*) i čija je aktivnost pod normalnim okolnostima onemogućena hipermetilacijom DNK (*Kubis i sar. 2003; Tanurdzic i sar. 2008*). Pretpostavlja se da je isti mehanizam - aktivacija TEs - "krivac" i za somaklonalne varijacije, fenomen koji se vezuje za *in vitro* kulturu tkiva. TEs se mogu aktivirati demetilacijom, posebno izraženom tokom kalusne faze koja se karakteriše opštom redukcijom nivoa metilacije citozina (*Kaeppler i sar. 2000; Guo i sar. 2007; Li i sar. 2007; Ngezahayo i sar. 2009*).

Da bi ispoljile totipotentnost, ćelije, bar delimično, "brišu" postojeće epigenetičke programe tokom dediferencijacije. U skladu sa tim, razlike u regenerativnom kapacitetu između genotipova mogu biti usled toga koliko brzo i lako epigenetičke odrednice mogu biti obrisane ili reprogramirane (*Smulders & Klerk. 2011*). Nakon regeneracije, epigenetičke odrednice se uspostavljaju *de novo* metilacijom DNK, i promene koje nastaju mogu biti usled netačnog ili nepotpunog "resetovanja" epigenetičkog programa razvića. Tako, na primer, *Krizova i saradnici (2009)* su, prateći formiranje kalusa i regeneraciju biljka duvana, zabeležili gubitak roditeljskog epigenetičkog imprinta kod 25% regenerisanih biljaka, nezavisno od toga da li su roditeljski epialeli početno bili metilovani ili ne. Sa druge strane, epigenetski imprinti obezbeđuju i prolazno "sećanje" na program razvića i utiču na buduće reakcije i razviće ćelije (*Roudier i sar. 2009*), a ponekad se promena epigenetičke "memorije" može zadržati tokom najmanje osam generacija (*Johannes i sar. 2009*). Stoga je opravdano pretpostaviti da uzrok porasta morfogenskog potencijala OCI-21 linije krompira može biti i isključivo epigenetički,

budući da OCI-21 potiče od tkiva koje je prethodno prošlo kroz faze dediferencijacije i organogeneze.

Prema PCR analizi, efikasnost integracije *OCII* gena prilikom re-transformacije OCI-21 linije iznosila je 90,9%. Ovo je izuzetno visoka efikasnost imajući u vidu gotovo nepostojanje selekcionog pritiska prilikom re-transformacije (roditeljska OCI-21 linija je kanamicin-rezistentna) a postojeći podaci ukazuju na to da pod neselektivnim uslovima integracija T-DNK, kod krompra, ne prelazi 4,5% (De Vetten i sar. 2003). Takođe, postignuta frekvenca integracije je za 32,3% veća od one zabeležene nakon inokulacije originalne linije sorte Jelica sa istim sojem *A. tumefaciens* (Cingel i sar. 2010). Ova razlika može biti usled toga što ćelije koje su sposobne da stabilizuju jednu T-DNK mogu da poseduju veći potencijal da stabilizuju sledeću T-DNK u odnosu na one bez T-DNK (Windels i sar. 2008). U tom slučaju bi mesto integracije prve T-DNK ili direktno moglo predstavljati “vruću” tačku i/ili, indirektno, omogućiti “otkrivanje” takvih mesta koja bi bila meta integracije T-DNK nakon *Agrobacterium*-posredovane transformacije prvim genom. Kako T-DNK “preferira” integraciju u hipometilovane, transkripciono aktivne regione genoma domaćina (Koncz i sar. 1989), logično je pretpostaviti i uticaj epigenetičkih promena koje bi učinile DNK biljke “otvorenijom” i “pristupačnijom” za integraciju T-DNK i time uticale na porast integracije drugog gena. U skladu sa tim je i moguća povezanost regenerativne sposobnosti i integracije gena, uočena u prethodnim eksperimentima transformacije (Cingel i sar. 2010), kao i prilikom re-transformacije sorte Jelica u ovom radu: u odnosu na netransgene eksplantate, nakon inokulacije, porast regenerativnog kapaciteta (za 28,1%) prati i porast integracije T-DNK (za 32,3%).

Postignuta efikasnost integracije *OCII* gena pri re-transformaciji OCI-21 linije sorte Jelica od 90,9% i izvedena efikasnost re-transformacije u odnosu na ukupan broj polaznih eksplantata od 84,6% daleko su veće od onih dobijenih za druge sisteme: Cervera i saradnici (2009) su kod hibridnog citrusa, u zavisnosti od selekcije, zabeležili efikasnost re-transformacije od 2,5% (za higromicin) i 3,3% (za bialafos); Bisht i saradnici (2007) u studijama ponovnog uspostavljanja fertiliteta *Brassica juncea* su, u zavisnosti od korišćenog plazmida, ostvarili efikasnost re-transformacije od 8,9% i 10,3%; Ntui i saradnici (2011) su, dodajući gen za defenzin (*WD*) transgenoj liniji

duvana koja eksprimira hitinazu (*ChiC*), kod 37% re-transformisaih izdanaka potvrdili *ChiC/WD* ko-ekspresiju. *Ramana Rao* i saradnici (2011) su prilikom re-transformacije *Chi11*-transgene linije pirinča genom za osmotin (*ap24*) potvrdili prisustvo oba gena kod 67% re-transformisanih linija.

U odnosu na frekvencu ko-transformacije od 2,2%, ostvarenu prilikom simultane introdukcije *OCI* i *OCII* gena kod sorte Jelica, re-transformacija - iako vremenski zahtevnija - u ovom slučaju, pokazala se kao daleko efikasniji pristup.

5.3. RT-PCR analiza OCI/OCII transformisanih linija krompira

Nakon povređivanja biljke, mnogi geni su mobilisani u cilju odbrane i saniranja povrede na mestu napada ili stvaranju sistemskih signala u cilju odbrane ostalih delova biljke (*Ryan*, 1990; *Kazan & Manners*, 2008). Genima koji su zaduženi za odgovor biljaka na biotički ili abiotički stres “upravljaju” promotori koji usmeravaju ekspresiju direktno na mestu povrede ili infekcije, dok paralelna, sistemska indukcija ima potencijal da zaštiti biljku samo kada je to potrebno (*Ryan*, 1990, 1992). Ova osobina čini promotore indukovane povređivanjem ili stresom idealnim za inženjering gena za otpornost ili insekticidne proteine koji će se “uključiti” samo u vreme napada. Prema tome, kako bi se sačuvala metabolička energija i smanjio mogući fiziološki uticaj rekombinantnih cistatina na metabolizam biljke domaćina i, istovremeno, izloženost neciljnih organizama transgenim PI svela na minimum – cistatini iz pirinča, krorišćeni u ovom radu, su pod kontrolom inducibilnog, *pin2p* promotora (*Samac & Smigocki* 2003). Ovaj promotor je normalno vezan uz *PIN II* gen (proteinazni inhibitor II) krompira, indukuje se povređivanjem ili ishranom insekta i omogućava istovremeno lokalnu i sistemsku akumulaciju *PIN II* proteina (*Pena-Cortes* i sar. 1988, 1995).

Prisustvo *pin2* promotora vezanog za druge gene je dovoljno da transgena biljka reaguje na specifične spoljne signale (*Ryan & An*, 1988): visokom ekspresijom heterolognog gena nakon indukcije patogenima ili povređivanjem a, istovremeno, u odsusvu stimulusa - ekspresije ili nema ili je minimalna (*Keil* i sar. 1989, 1990; *Xu* i sar. 1993; *Cheng &*

Wu, 1997). Tako, u transgenom pirinču, pin2 promotor obezbeđuje nisku konstitutivnu ekspresiju koja, nakon povređivanja ili tretmana metil jasmonatom, dostiže visok nivo (Xu i sar. 1993). Ekspresija transgena koju vodi pin2 promotor je istovremeno i lokalna i sistemska (Cheng & Wu, 1997) i dostiže maksimum nakon 24h (Keil i sar. 1990; Samac & Smigocki 2003). U transgenom pirinču kinetika i akumulacija PIN II proteina pod kontrolom vlastitog promotora može obezbediti zaštitu biljaka počev od 12h nakon povređivanja i ostati na visokom nivou više od 2 nedelje nakon inicijalne indukcije (Cheng & Wu, 1997). U skladu sa navedenim, sve analizirane OCI/OCII transformisane linije krompira su pokazale nisku konstitutivnu akumulaciju pin2p-OCI i pin2p-OCII transkripata i indukciju transkripcije oba orizacistatinska gena nakon povređivanja sa višestrukim uvećanjem kako OCI tako i OCII transkripata nakon 24h.

Sa druge strane, konstitutivna ekspresija heterolognih gena, koja je u velikoj meri zastupljena kada su u pitanju i geni za povećanje otpornosti biljaka na predatore i patogene, može biti “problematična” iz nekoliko razloga. Ako je specifični transgen eksprimiran u pogrešnom trenutku razvića, u tkivima u kojima nije normalno eksprimiran ili je produkt transgena prisutan u velikoj količini - to može imati neočekivane posledice na rast i razviće biljke domaćina i, potencijano, na životnu sredinu (Potenza i sar. 2004; Dietz-Pfeilstetter, 2010). Tako, na primer, konstitutivna ekspresija transgena koji regulišu signalnu transdukciju odgovora na patogene može voditi ka smanjenju rasta (Bowling i sar. 1994, 1997) ili povećanoj osetljivosti biljke na druge patogene (Stuiver & Custers, 2001; Berrocal-Lobo i sar. 2002). Strahovanja da će prekomerna konstitutivna ekspresija toksina *Bacillus thuringiensis* u komercijalnim usevima ubrzati stvaranje otpornosti ciljnih insekata (Huang i sar. 1999) dovela su da Agencija za zaštitu životne sredine (eng. *Environmental Protection Agency*, EPA) uvede pravilo o sadnji netransgenih “utočišta” pored Bt-biljaka (http://www.epa.gov/oscpmont/sap/2000/october/brad4_irm.pdf). Takođe, prisustvo više transgena kojima upravlja isti konstitutivni promotor može dovesti do od homologije-zavisnog utišavanja gena, posebno ako su promotori visoko aktivni (Elmayan & Vaucheret, 1996). Stoga, biljni inducibilni promotori, koji su precizno aktivirani kada i gde je to potrebno, bi bili idealni za strategije genetičkog inženjeringa usmerene ka povećanju

otpornosti prema štetočinama i patogenima (*Potenza* i sar. 2004; *Meiyalaghan* i sar. 2006a; *Senthilkumar* i sar. 2010).

Varijacije u ekspresiji transgena između nezavisno dobijenih linija sa povećanom otpornošću na insekte uobičajen je fenomen (*Peferoen* i sar. 1990; *Van Rie* i sar. 1994; *Beuning* i sar. 2001; *Davidson* i sar. 2002a, 2004; *Meiyalaghan* i sar. 2005, 2006a, 2011; *Jacobs* i sar. 2009; *Senthilkumar* i sar. 2010). Ova variranja se pripisuju nepredvidivom nivou ekspresije transgena kao posledice pozicionog efekta usled različitih mesta integracije T-DNK (*Peach & Velten*, 1991; *Conner & Christey*, 1994) i/ili razlika u broju kopija T-DNK integrisane u biljni genom (*Hobbs* i sar. 1993). Nivoi ekspresije različitih transgena unutar istog genoma biljke i količina transgene RNK dobijene u drugim sistemima (*Wu* i sar. 2002; *Radchuk* i sar. 2005; *Meiyalaghan* i sar. 2010) navode na zaključak da je, i nakon ko-transformacije, ekspresija jednog transgena nezavisna od ekspresije drugog. Dva OC gena, integrisana simultanom transformacijom sorti *Dezire* i *Dragačevka*, ili re-transformacijom sorte *Jelica*, pokazala su isti obrazac indukcije i sličan nivo ekspresije između nezavisno dobijenih transgenih linija. Ovo može biti objašnjeno činjenicom da je prilikom ko-transformacije, većina transgena integrisana u isti ili mali broj lokusa, a ko-integracija T-DNK sama po sebi ne vodi do represije ekspresije transgena usled faktora kao što su DNK rearanžmani ili metilacija (*Radchuk* i sar. 2005). Drugi mogući razlog je što su oba orizacistatinska gena pod kontrolom istog promotora. Takođe, korelacija između broja kopija gena i količine iRNK ne mora uvek da bude očigledna (*Maqbool & Christou*, 1999; *Radchuk* i sar. 2005; *Morris* i sar. 2006): jednako visok nivo ekspresije može biti postignut i sa jednom ili više kopija, bilo istog, ili različitih gena pod kontrolom istog promotora.

5.4. Analiza rekombinantnih proteina

Imunološka analiza proteinskog ekstrakta listova anti-OCI antitelima je potvrdila translaciju OC transkripata u proteine očekivane molekulske mase. U skladu sa transkripcionim nivoom, nivo rekombinantnih OCI i OCII proteina u nepovređenim listovima svih OCI/OCII linija krompira je bio ispod nivoa detekcije (rezultati nisu

prikazani) i jasno vidljiv 24h nakon mehaničkog povređivanja. Ovakav obrazac akumulacije OCII proteina dokumentovan je i u biljkama lucerke transformisanim sa istim, pin2p-OCII, konstruktom (Ninković i sar. 2007). Oba rekombinantna orizacistatina su u aktivnoj konformaciji, što je pokazano snažnom inhibicijom cisteinske proteinaze papaina. Primetan nivo anti-papainske aktivnosti je, nakon povređivanja, zabeležen i kod kontrolnih netransformisanih biljaka - ukazujući na prisustvo endogenih, krompirovih proteina sa funkcijom sličnom cistatinima. Ovo može biti povezano sa prisustvom proteina od oko 55 kDa, detektovanim pomoću anti-OCI antitela kako kod kontrolnih tako i kod transformisanih linija u ovom radu, kao i prisustva povređivanjem inducibilne genske sekvence kod krompira, čija izvedena aminokiselinska sekvenca deli značajnu homologiju (45%) sa cistatinom I iz pirinča (Hildmann i sar. 1992).

Sinteza aktivnih orizacistatina u transgenim biljkama krompira, kada su eksprimirani pojedinačno, potvrđena je i ranije, kako za OCI (Benchekroun i sar. 1995), tako i za OCII (Cingel i sar. neobjavljeni rezultati). Ipak, kada produkti dva različita transgena doprinose istoj osobini, varijacije u njihovoj ekspresiji mogu biti vidljive samo kao varijacije njihovog zajedničkog delovanja (Meiyalaghan i sar. 2010). Iako su kontrolisani istim promotorom nivo ukupne aktivnosti produkta dva orizacistatinska gena se razlikovao među transgenim linijama sorti Dezire i Dragačevka, dobijenih ko-transformacijom, ali ne i između OCI/OCII linja sorte Jelica, dobijenih re-transformacijom. Varijacije u aktivnosti heterolognih PI u zavisnosti od transgene linije, fiziologije biljke i prirode tkiva dokumentovano je u različitim sistemima (Cloutier i sar. 2000; De Leo i sar. 2001; Cowgill i sar. 2004; Senthilkumar i sar. 2010). Ove varijacije ne moraju da oslikavaju mesto integracije ili broj kopija transgena, već, pre, nepredvidivi uticaj fenomena kao što su mutacije nakon integracije, orijentacija transgena ili promene u aktivnosti promotora nakon integracije heterolognog gena (Maqbool & Christou, 1999). Dodatno, bar u slučaju re-transformacije, nepredvidive promene u ekspresiji prvog transgena, nakon introdukcije drugog heterolognog gena (Meiyalaghan i sar. 2010), takođe, ne mogu biti isključene.

5.5. Morfološke karakteristike OCI/OCII linija krompira

Unapređenje useva koji se propagiraju klonalnim putem pomoću genetičkih transformacija zahteva dobijanje transgenih linija sa adekvatnom ekspresijom heterolognog gena i istovremenim očuvanjem svih “elitnih” genetičkih atributa roditeljskog klona (*Conner & Christey*, 1994). Jedno od glavnih ograničenja postizanja ovih zahteva je pojava netipičnih biljaka - najčešće kao rezultat somaklonalnih varijacija i/ili insercione mutagenoze koje mogu nastati u samoj kulturi tkiva i/ili tokom transformacije (*Conner i sar.* 1994; *Conner*, 2007; *Barrell & Conner*, 2011). Povrh toga, krompir je podložan somaklonalnim varijacijama u kulturi tkiva (*Mitten i sar.* 1990) čak i u odsustvu transformacije (*Belknap i sar.* 1994). Genotip, poreklo eksplantata, period kultivacije i uslovi kulture *in vitro* su četiri kritične varijable koje doprinose pojavi ovih genetičkih i fenotipskih odstupanja (*Evans & Sharp*, 1988). Učestalost pojave netipičnih biljaka, koja se pripisuje somaklonalnim varijacijama, u populaciji transgenih linija krompira, u zavisnosti od kultivara, kreće se između 15% i 80% (*Dale & McPartlan*, 1992; *Jongedijk i sar.* 1992; *Belknap i sar.* 1994; *Conner i sar.* 1994; *Davidson i sar.* 2002a,b, 2004; *Heeres i sar.* 2006; *Meiyalaghan i sar.* 2011). Redukcija pojave netipičnih biljaka tokom transformacije je neophodna, jer je, kod krompira, eliminacija somaklonalnih varijacija seksualnom hibridizacijom nemoguća bez istovremenog gubitka genetičkog integriteta početne linije. Sa druge strane, aseksualna reprodukcija trajno fiksira hemizigotni status transgena unutar visoko heterozigotne genetičke “podloge”. Iz tih razloga, transgene linije krompira se održavaju kao vegetativni klonovi počev od inicijalne selekcije transformanata u kulturi tkiva pa do (kao i tokom) eventualne komercijalne upotrebe (*Conner*, 2007).

Pojava netipičnih biljaka se najčešće prevazilazi stvaranjem velike populacije transgenih linija - izborom obično po jednog izdanaka za svaki zasebni događaj transformacije - da bi se, na kraju, dobilo nekoliko linija sa željenim fenotipom i visokom ekspresijom transgena. Prilikom dobijanja velikog broja izdanaka, što najčešće jeste slučaj prilikom regeneracije krompira, obično se selektuju rani događaji regeneracije (*Davidson i sar.* 2002a; *Jacobs i sar.* 2009). To se zasniva na široko rasprostranjenom gledištu da je pri minimalnom vremenu u kulturi tkiva, istovremeno, i minimalan nivo nepoželjnih

varijacija (*Birch*, 1997) i pretpostavci da je kod izdanaka kome treba više vremena da regeneriše veća i verovatnoća pojave somaklonalnih odstupanja. Nasuprot ovom ustaljenom gledištu, nedavno su, *Barrell* i *Conner* (2011), kao i *Meiyalaghan* i saradnici (2011) pokazali da, nakon transformacije, kasniji događaji regeneracije daju veći procenat fenotipski normalnih biljaka krompira od onih koji se dešavaju ranije. Iako je, u našem radu, izbor regenerisanih izdanaka nakon inokulacije bio nasumičan, a vizuelna selekcija biljaka za umnožavanje i analizu je vršena nakon ožiljavanja na RIM podlozi, vidljive morfološke razlike između netransformisanih i izabranih OCI/OCII linija krompira nisu uočne. Fenotipska odstupanja nisu bila vidljiva ni kod biljaka gajenih u uslovima *in vitro*, kao ni kod biljaka gajenih u uslovima staklenika. Ipak, u T₁ generaciji (klonalna T₁ generacija dobijena iz krtola T₀ biljka) kontrolnih i transgenih linija gajenih na oglednoj parceli, jasna odstupanja od normalnog fenotipa su zabeležena za OCI/OCII liniju 4 sorte Jelica. Neočekivane performanse ove transgene linije u prirodnim uslovima mogu biti pripisane plejotropnom efektu ekspresije heterolognih gena, insercionim mutacijama i/ili epigenetičkim ili mutagenim fenomenima vezanim za kulturu tkiva i fazu regeneracije tokom transformacije krompira.

Neočekivani fenotip transgenih linija može biti posledica same ekspresije transgena - posebno u slučaju heterolognih PI, ove potencijalne interakcije mogu nastati usled strukturne homologije endogenih proteinaza biljke sa ciljnim proteinazama PI (*Goulet* i sar. 2008). Endogene cisteinske proteinaze viših biljaka učestvuju u različitim fiziološkim procesima (*Yonezawa* i sar. 1998; *Kato* i sar. 1999), igraju važnu ulogu u senescenciji biljaka (*Guerrero* i sar. 1998) i ključni su enzimi regulacije programirane ćelijske smrti (*Solomon* i sar. 1999). Tako, na primer, iako rane studije ekspresije OCI u duvanu nisu pokazale vidljive fenotipske posledice (*Masoud* i sar. 1993), kasnije evaluacije su otkrile promene morfoloških parametara kao što su povećana brzina rasta, veća biomasa i ranije cvetanje (*Gutierrez-Campos* i sar. 2001) i povećan sadržaj proteina u listovima (*Prins* i sar. 2008) ili, nasuprot tome, smanjeni rast, manje razvijene listove i nešto manju ukupnu biomasu (*Van der Vyver* i sar. 2003). Patuljasti rast i smanjenje veličine listova kao moguća posledica ekspresije OCII uočena je i kod transgenih biljaka lucerke (*Ninković*, 2002). Isto tako, ekspresija drugih insekticidnih proteina - lektina, aglutinina (GNA) ili inhibitora tripsina (CpTi) - može smanjiti broj i ukupnu suhu masu

transgenih listova krompira (*Birch* i sar. 2002). Sa druge strane, konstitutivna ekspresija CDI, inhibitora aspartatnih proteaza, nije ispoljila vidljivi uticaj na fenotip biljaka krompira (*Brunelle* i sar. 2004), kao ni prisustvo cisteinskih PI, OCI ili OCII (*Benchekroun* i sar. 1995; *Cingel* i sar. 2010). Takođe, ni integracija i koekspresija *cry1Ac9* i *cry9Aa2*, postignuta bilo ko-transformacijom ili re-transformacijom, nije promenila fenotip transgenih linija krompira (*Meiyalaghan* i sar. 2010), niti je koekspresija sporamina (inhibitor tripsina) i CeCPI (fitocistatin) uticala na fenotip transgenih biljaka duvana (*Senthilkumar* i sar. 2010). Kako sve OCI/OCII linije sorte Jelica pokazuju sličan nivo inhibitorne aktivnosti, uočene fenotipske promene kod linije 4 se, najverovatnije, ne mogu pripisati plejotropnom efektu ekspresije transgena. Nepostojanje direktnog međusobnog afiniteta rekombinantnih orizacistatina i endogenih krompirovih proteinaza (*Michaud* i sar. 1994b; *Benchekroun* i sar. 1995), takođe, može objasniti normalno razviće i fenotip ostalih OCI/OCII linija krompira. Iako neke od ovih “nenamernih” plejotropnih promena, nastalih ekspresijom heterolognih PI, mogu predstavljati korisne osobine (*Schluter* i sar. 2010), kao što je bolji rast (*Gutierrez-Campos* i sar. 2001) ili otpornost na niske temperature (*Van der Vyver* i sar. 2003) biljaka duvana koje ekspimiraju OCI - odsustvo “mešanja” rekombinantnih PI u metabolizam domaćina je važno za produkciju “zdravih” transgenih biljaka koje ekspimiraju heterologni inhibitor sposoban da reaguje sa ciljnim proteinazama predatora ili patogena.

Insercione mutageneze kod arabidopsisa dovode do dramatičnih fenotipskih promena (*Feldmann*, 1991), sličnih onima koje su uočene kod transgenog krompira koji raste u polju, u ovoj, kao i u ranijim studijama (*Conner* i sar. 1994). Ipak, da bi se ova odstupanja pripisala insercionoj mutagenezi potrebno je pokazati 100% kosegregaciju insertovanog gena i uočenih promena (*Walden* i sar. 1991), što je u slučaju OCI/OCII linije 4 sorte Jelica nemoguće, pošto nije cvetala niti donela seme. Sa druge strane, kako je početna transformisana biljka hemizigotna za heterologni gen, ne očekuje se da inserciona mutageneza bude ispoljena kod biljaka nastalih njenim umnožavanjem u kulturi *in vitro*, kao ni u sledećim klonalnim generacijama. Ovo posebno važi za krompir, koji je autotetraploid i poseduje još tri alela koji potencijalno mogu nadomestiti efekat insercione mutageneze usled funkcionalne delecije nekog gena. Čak iako usled

visoke heterozigotnosti komercijalnih kultivara krompira, inserciona mutageneza može proizvesti vidljive fenotipske promene - ovakvi fenomeni se smatraju izuzetno retkim događajem (Conner i sar. 1994).

Stoga, najprihvatljivije objašnjenje za fenotipska odstupanja OCI/OCII linije 4 sorte Jelica uključuje fiziološke, epigenetičke ili genetičke promene povezane sa kulturom *in vitro* i fazom regeneracije izdanaka tokom transformacije. Ovakve promene su poznate za biljke regenerisane u kulturi tkiva (Evans, 1989; Karp, 1991) i često su uočavane kod krompira kada raste u spoljašnjim uslovima (Shepard i sar. 1980; Secor & Shepard, 1981; Potter & Jones, 1991; Conner i sar. 1994). Odstupanja od normalnog fenotipa u spoljašnjim uslovima nisu očekivana za kontrolne, roditeljske linije jer one potiču iz *in vitro* kulture izdanaka i nisu regenerisane iz dediferenciranih ćelija (Potter & Jones, 1991). Ove promene mogu biti prolazne prirode i povezane sa združenim uticajem uslova *in vitro*, korišćenih regulatora rasteња i selektivnih agenasa. U tom slučaju može se očekivati da u narednim generacijama biljke budu "reprogramirane" ka svom normalnom razvojnom ciklusu (Conner i sar. 1994). Sa druge strane, promene indukovane u kulturi tkiva povezane sa stabilnim promenama u ekspresiji gena - somaklonalnim varijacijama - mogu dovesti do smanjenog rasta, netipičnog oblika listova i drugih promena u razviću. Ovakvo odstupanje od normalnog fenotipa, čiji je uzrok promena u broju hromozoma i/ili njihovi strukturni rearanžmani, može biti učestalo u populaciji transgenog krompira (Visser i sar. 1989a,b; Vries-Uijtewaal i sar. 1989; Leij i sar. 1991; Imai i sar. 1993; Conner i sar. 1994; Meiyalaghan i sar. 2011). Ove studije upućuju na to da su uočene fenotipske varijacije prilikom rasta transgenog krompira u spoljašnjim, prirodnim uslovima posledica genetičkih ili epigenetičkih promena koje se dešavaju tokom kulture tkiva i faze regeneracije biljaka pri transformaciji, pre nego insercione mutageneze ili fiziološke cene usled ekspresije heterolognih gena. Prema Conner-u i saradnicima (1994) performanse transgenih linija i postojanje mogućih somaklonalnih varijacija su vidljivije u promenljivim prirodnim uslovima dodatnog stresa (npr. temperatura, dostupnost vode i nutrienata) nego u ujednačenim uslovima, bilo staklenika ili kulture *in vitro*.

5.6. Biotest sa larvama krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Krompirova zlatica (*Leptinotarsa decemlineata* Say) je glavna štetočina krompira u mnogim delovima sveta. Kako je vrlo brzo stekla otpornost na većinu pesticida (Forgash, 1985) i, istovremeno, usled ekonomskih troškova primene insekticida, nametnula se potreba za novim sredstvima kontrole ovog insekta. Genetičke transformacije biljaka sa sekvencama DNK koje kodiraju faktore otpornosti na herbivore, poslednje dve dekade, predstavljaju alternativu sintetičkim insekticidima za kontrolu štetočina poput krompirove zlatice (Meeusen & Warren, 1989; Estruch i sar. 1997). Razvoj i komercijalizacija varijeteta krompira koji eksprimiraju toksine iz *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) i pokazuju visoku otpornost na krompirovu zlaticu (Gill i sar. 1992; Perlak i sar. 1993; Wierenga i sar. 1996), su najbolji primeri uspešnosti ovog pristupa. *Bt*-toksini, ipak, uzrokujući akutnu smrtnost, donose i rizik da preko snažnog selektivnog pritiska dovedu do stvaranja rezistentnosti unutar genetički raznolikih populacija insekata koje mogu razviti sposobnost da inaktiviraju toksin (Oppert i sar. 1996; Michaud, 1997), kao i da razviju otpornost na *Bt* usled nedostatka alela za proteinaze koje su neophodne za aktivaciju *Bt*-protoksina (Oppert i sar. 1997) ili da usled mutacija na membranskim receptorima budu neosetljivi na *Bt*-toksin (Baxter i sar. 2011). Zbog ovog postoji narastajuća bojazan da će efektivnost *Bt*-transgenih biljaka biti smanjena jer evolucija *Bt*-rezistentnosti među insektima postaje sve prisutniji fenomen (Tabashnik i sar. 2009).

Nasuprot *Bt*-toksinima, proteazni inhibitori (PI), usled antinutritivnog delovanja, pojavljuju se kao dugoročnije sredstvo kontrole. Kako PI pre deluju smanjujući adaptivnu vrednost insekata redukujući brzinu rasta, i reprodukciju i povećavajući trajanje razvića (Estruch i sar. 1997) - mogućnost za stvaranje rezistentnosti na njih je značajno manja. Takođe, hronični efekat PI, kao što je, na primer, produženje trajanja razvića, može delovati sinergistički sa prirodnim neprijateljima insekta, povećavajući mogućnosti predatorstva ili parazitizma (Kusnierczyk i sar. 2007; Kollner i sar. 2008).

Narušavanje digestije proteina i snabdevanja organizma amino kiselinama usled inhibicije digestivnih enzima insekata proteaznim inhibitorima pokazao se kao

delotvoran pristup za kontrolu štetočina (*Johnson i sar. 1989; Hilder i sar. 1992*). Uticaj veštačke dijetе sa visokom koncentracijom serinskih PI na preživljavanje, rast i razviće larvi različitih redova insekata dokumentovano je od strane više autora (*Broadway & Duffey, 1986; Larocque & Houseman, 1990; Johnston i sar. 1993; Burgess i sar. 1994*). Na isti način, pokazan je i negativan uticaj cisteinskih PI na adaptivnu vrednost insekata (*Chen i sar. 1992; Orr i sar. 1994; Azzouz i sar. 2005; Aguiar i sar. 2006; Kiggundu i sar. 2010*). Ipak, dok količina PI u veštačkoj dijeti može biti kontrolisana, PI eksprimirani *in planta* su obično u nižoj koncentraciji, a njihova količina može varirati u zavisnosti od transgene linije, fiziologije biljke domaćina i biljnog tkiva (*Cloutier i sar. 2000; De Leo i sar. 2001; Cowgill i sar. 2004; Abdeen i sar. 2005*) tako da često mogu uzrokovati samo usporavanje rasta i razvića ciljnog insekta (*Hilder i sar. 1987; Johnson i sar. 1989; McManus i sar. 1994*).

Fitofagni insekti iz reda Coleoptera generalno koriste cisteinske proteinaze za proteinsku digestiju (*Murdock i sar. 1987*), a neki, pored cisteinskih, koriste i druge klase proteinaza (*Mochizuki, 1998*). Krompirova zlatica, koja pripada koleopterama, digestiju proteina bazira na serinskim, cisteinskim i aspartatnim proteinazama (*Wolfson & Murdock, 1987; Thie & Houseman, 1990; Michaud i sar. 1993; Brunelle i sar. 1999*).

E-64, specifični inhibitor svih poznatih cisteinskih proteinaza izolovan iz *Aspergillus japonicum* (*Hanada i sar. 1978*) pokazao je značajnu inhibiciju rasta larvi krompirove zlatice (*Wolfson & Murdock, 1987; Bolter & Latoszek-Green, 1997*), kao i toksični efekat tokom razvića larvi drugih koleoptera (*Murdock i sar. 1988; Oppert i sar. 1993*). Ovi rezultati su ukazivali da bi indukcija inhibitora cisteinskih proteinaza krompira trebala imati sličan efekat. *Hildmann* i saradnici (1992) su pokazali da mehaničko povređivanje listova krompra rezultuje transkripcijom gena za inhibitore cisteinskih i aspartatnih proteinaza. Ipak, suprotno očekivanjima na osnovu rezultata sa E-64, rast i razviće larvi krompirove zlatice nisu pogođeni ishranom listovima krompira kod kojih su nativni inhibitori proteinaza dodatno indukovani (*Bolter & Jongsma, 1995*).

Oba orizacistatina, i OCI i OCII, eksprimirani u transgenim biljkama, pokazuju potencijal u kontroli štetočina koje koriste cisteinske proteinaze za varenje proteina (Leple i sar. 1995; Samac & Smigocki, 2003; Ribeiro i sar. 2006; Ninković i sar. 2007). I za OCI i za OCII, pokazano je da *in vitro* svaki posebno, u zavisnosti od pH, može inhibirati 20-80% proteolitičke aktivnosti ekstrakta creva krompirove zlatice (Michaud i sar. 1993; Benchekroun i sar. 1995), tako što od dve glavne digestivne cisteinske proteinaze krompirove zlatice (Thie & Houseman, 1990), selektivno inhibiraju cisteinsku proteinazu katepsin H, ali ne i katepsin B (Kondo i sar. 1990; Michaud i sar. 1994a). Ipak, pesticidni efekat cistatina iz pirinča kada su pojedinačno eksprimirani u biljkama krompira, u slučaju krompirove zlatice, potrebno je dodatno unaprediti (Cloutier i sar. 1999, 2000; Cingel, 2006). Stoga su u ovom radu, da bi se pojačao njihov inhibitorni opseg i, eventualno, ostvario dodatni efekat ukupne efikasnosti ovih inhibitora, OCI i OCII koeksprimirani u transformisanim linijama krompira.

5.6.1. Uticaj rekombinantnih OC na preživljavanje larvi krompirove zlatice

Ishrana larvi krompirove zlatice OCI/OCII listovima praćena u ovom radu nije uticala na smrtnost, i stopa preživljavanja larvi na listovima svih transgenih linija krompira iznosila je 100%. To je bilo i očekivano, jer su prethodno i OCI-linija krompira sorte Kenebek (Cloutier i sar. 1999, 2000) i OCII-linije sorti Dezire, Dragačevka i Jelica (Cingel, 2006), za ovaj parametar, “poraženi” od strane insekta. Isto tako, OCI-linija sorte Kenebek nije povećala smrtnost druge važne severnoameričke štetočine krompira, *Macrosiphum euphorbiae* (Ashouri i sar. 2001), niti je ekspresija OCI u uljanoj repici uticala na preživljavanje larvi koleoptera *Psylliodes chrysocephala* (Girard i sar. 1998) i *Baris coerulescens* (Bonade-Bottino i sar. 1999) kao ni hemiptere *Myzus persicae* (Rahbe i sar. 2003). Takođe, ni inhibicija druge važne digestivne cisteinske proteinaze krompirove zlatice, katepsina B, cistatinom iz ječma nije uticala na preživljavanje larvi (Alvarez i sar. 2007). Suprotno od ovih rezultata, Lecardonnel i saradnici (1999) su zabeležili snažan negativni uticaj transgenih OCI-linija krompra cv. Bintje i cv. BF₁₅ na larve krompirove zlatice, sa stopom smrtnosti do 53%, koja odgovara onoj za E-64 (Bolter & Latoszek-Green, 1997). Ovi, pomalo neočekivani rezultati su mogući usled

sinergističke interakcije između OCI i prirodnih odbrambenih jedinjenja korišćenih linija krompira i/ili samih stresnih uslova biotesta.

Iako nije uticala na smrtnost, ishrana transgenim OCI/OCII listovima krompira sorti Dezire, Dragačevka i Jelica imala je značajan uticaj na različite performanse rasta i razvića larvi krompirove zlatice: larve na transgenim listovima su brže prolazile kroz stupnjeve razvića, rasle su i konzumirale listove brže i ranije su dostizale maksimum mase, “usporavajući” sa ishranom i ulazeći u prepupalnu fazu razvića. Takođe, u odnosu na kontrolne, larve hranjene OCI/OCII listovima su ranije dostizale stadijum lutke i, potom, adulta.

5.6.2. Trajanje razvića

Jedna od očekivanih posledica ingestije PI je smanjenje performansi ciljnog insekta u smislu odlaganja presvlačenja i produženog vremena razvića: ishrana larvi krompirove zlatice na biljkama pre-tretiranih sa metil jasmonatom ili arahnoindnom kiselinom - jedinjenjima koji indukuju različite odbrambene gene kod krompira - odlaže presvlačenje i usporava razviće larvi (*Rivard i sar. 2004*). Isto tako, razviće larvi krompirove zlatice na dijeti sa E-64, može biti produženo do nedelju dana u odnosu na larve na kontrolnim listovima (*Bolter & Latoszek-Green, 1997*). Međutim, ishrana larvi krompirove zlatice OCI/OCII listovima krompra imala je upravo suprotan efekat – skraćanje vremena razvića larvi za oko tri dana i dva dana raniju pojavu adulta. Sličan uticaj na adaptivnu vrednost larvi krompirove zlatice dokumentovan je i za svaki od orizacistatina kada su pojedinačno eksprimirani u biljkama krompira: OCI može skratiti trajanje razvića larvi (*Lecardonnell i sar. 1999; Cloutier i sar. 1999*) i dovesti do, više od jednog dana, ranije pojave adulta (*Cloutier i sar. 1999*) a razviće larvi na OCII-listovima može trajati oko 2 dana manje (*Cingel, 2006*). OCI u transgenim biljkama krompira može skratiti i razviće *Macrosiphum euphorbiae* (*Ashouri i sar. 2001*), a ingestija OCI preko plena koji se hranio transgenim biljkama inicijalno skraćuje trajanje larvenih supnjeva korisnog insekta predatora *Harmonia axyridis* (*Ferry i sar. 2003*). Takođe, ekspresija subletalnog nivoa inhibitora tripsina (MTI-2) dovodi do bržeg razvića larvi

Spodoptera littoralis na transgenim biljkama duvana (*De Leo* i sar. 1998) a koekspresija krompirovih inhibitora serinskih proteinaza i karboksipeptidaza (PI-II/PCI) u paradajzu može omogućiti larvama *Heliothis obsoleta* brži ulazak u L4 (*Abdeen* i sar. 2005). I drugi nutritivni modifikatori mogu imati sličan efekat: ishrana na *nptII-gus* (selektivni i reporter gen) transformisanim listovima krompira može ubrzati razviće larvi krompirove zlatice i dovesti do 2,5 dana ranije pojave adulta (*De Turck* i sar. 2002).

Ovakav uticaj orizacistatina se može smatrati pozitivnim jer i sama prirodna selekcija teži da skрати vreme razvića insekta: brže završavanje razvića smanjuje izloženost larvi predatorima i time povećava verovatnoću preživljavanja (*Roff*, 2000). Isto tako i ranija pojava adulta je prednost jer omogućava raniju reprodukciju. Prema tome, za ovaj aspekt performansi insekta, očigledno je da krompirova zlatica ne samo da kompenzuje negativan uticaj prisustva orizacistatina u ishrani već ostvaruje i izvesnu prednost u odnosu na larve hranjene netransformisanim listovima krompira.

5.6.3. Parametri rasta i ishrane larvi

Druga očigledna prednost koju larve krompirove zlatice ostvaruju na OCI/OCII transformisanim listovima krompira je ubrzan rast. Masa larvi nakon sedam dana ishrane listovima koji ekspimiraju oba orizacistatina bila je oko dva puta veća u odnosu na larve iste starosti koje su rasle na kontrolnim, netransformisanim listovima. Ove izuzetne performanse rasta na transformisanim listovima larve su ispoljavale tokom L2 i L3 (dnevno su do oko 30% brže uvećavale masu) ali ne i tokom L4 kada je efekat OCI/OCII tretmana na brzinu rasta prestao biti značajan. Uporedo sa porastom brzine rasta, L2 i L3 larve su pokazale i značajno povećanje performansi ishrane: porast brzine konzumacije u približno istoj srazmeri kao brzine rasta rasta (do oko 30%), kao i vraćanje brzine konzumacije na kontrolni nivo tokom L4. Istovetan fenomen je zabeležen za nutritivni stres izazvan prisustvom kako OCI u ishrani L2i L3 larvi krompirove zlatice (dnevni porast GR i CR od 28% i 14%), tako i OCII (dnevni porast GR i CR od 38% i 35%), kao i odsustvo razlika u odnosu na larve na netransformisanim listovima, sa ulaskom L4 (*Cloutier* i sar. 1999; *Cingel*, 2006). Efekat stimulisanoog rasta

larvi na listovima koji ekspimiraju PI pokazan je i za druge sisteme: brzina rasta *Thysanoplusia orichalcea* je povećana kada se larve hrane na duvanu koji ekspimira inhibitor himotripsina (McManus i sar. 1994); larve *Spodoptera littoralis* na transgenim biljkama duvana koje ekspimiraju inhibitor tripsina mogu pokazati povećanu brzinu rasta i ishrane (De Leo i sar. 1998); Koleoptera *Psylliodes chrysocephala* pokazuje veću masu u odnosu na kontrolu kada raste na OCI-uljanoj repici (Girard i sar. 1998); subletalna koekspresija krompirovih PI-II and PCI inhibitora u paradajzu povećava brzinu rasta i ishrane larvi *Heliothis obsoleta* (Abdeen i sar. 2005); larve *Lymantria dispar* dostižu skoro dva puta veću masu ako se u veštačku dijetu doda inhibitor serinskih proteinaza iz kupusa (Broadway 1995). Takođe, vredan pažnje je i podatak o stalno prisutnom povećanju apetita *Perillus bioculatus*, prirodnog predatora krompirove zlatice (Ashouri i sar. 1998), kao i larvi *H. axyridis* (Ferry i sar. 2003) kada se hrane plenom na OCI-dijeti.

Ingestija tkiva koja sadrže PI kod mnogih insekata izaziva promene u ponašanju i fiziološke protivmere usmerene ka prevazilaženju digestivne inhibicije. Subletalni nivo PI može da stimuliše hranjenje i indukuje overprodukciju proteolitičkih enzima. Overprodukcija digestivnih proteinaza, potom, može da uzrokuje povećanje brzine rasta. Tako, na primer, stimulacija ishrane i 6 puta povećana aktivnost himotripsina nakon ingestije tripsinskog inhibitora iz soje (SBTI) mogu da objasne povećanu brzinu rasta *Melanoplus sanguinipes*, (Hinks & Hupka, 1995), a povećanje brzine rasta *Psylliodes chrysocephala* na OCI transgenoj uljanoj repici prati dvostruko povećanje proteolitičke aktivnosti usled overprodukcije cisteinskih (OCI senzitivnih) i serinskih (OCI insenzitivnih) digestivnih proteinaza (Girard i sar. 1998). Overprodukcija digestivnih enzima može dovesti do deficita važnih aminokiselina i tako umanjiti rast i druge parametre performanse insekta, što i jeste jedan od pretpostavljenih modela delovanja PI (Broadway & Duffey, 1986; Gatehouse i sar. 1992). Ipak, u uslovima *ad libitum* ishrane, larve mogu povećati brzinu konzumacije kako bi odgovorile zahtevima overprodukcije digestivnih enzima. Povratno, povećani unos hrane može stimulisati hipersekreciju proteinaza i obezbediti normalan rast i razviće larvi uprkos prisustvu PI (Winterer & Bergelson, 2001) ili čak ubrzati rast i razviće larvi (Girard i sar. 1998). Na taj način, kompenzatorno povećanje unosa hrane može poništiti negativan uticaj PI i, najčešće,

dovesti i do većeg gubitka biomase transformisanih genotipova u odnosu na netransformisane biljke (*De Leo* i sar. 1998; *Cloutier* i sar. 2000; *Winterer & Bergelson*, 2001; *Abdeen* i sar. 2005; *Steppuhn & Baldwin*, 2007). Ovaj adaptivni odgovor insekata ne zahteva “prepoznavanje” specifičnog inhibitora već, pre, predstavlja opšti mehanizam koji se aktivira u odgovoru na nutritivni stres izazvan izlaganjem subletalnim količinama inhibitora (*Abdeen* i sar. 2005).

Hipertrofičko ponašanje larvi krompirove zlatice na OCI/OCII transformisanim listovima, može navesti na pretpostavku o postojanju nutritivnog disbalansa koji se kompenzuje povećanom ingestijom (*Simpson & Simpson*, 1989; *Winterer & Bergelson*, 2001). Međutim, prethodno je pokazano da je nutritivni kvalitet OCI transgenih listova (*Cloutier* i sar. 1999) i OCII transformisanih listova krompira (*Cingel*, 2006) približno jednak netransformisanim listovima za larve krompirove zlatice, uprkos tome što je konzumiranje transgenih listova brže. Obzirom da efikasnost konverzije lisne mase u biomasu (ECI) larvi krompirove zlatice na OCI/OCII listovima, nije značajno promenjena u odnosu na larve koje se hrane netransformisanim listovima može se zaključiti da je kompenzatorni porast unosa hrane anulirao negativne postingestivne efekte transformisanih listova. Smanjenje ECI na OCI-listovima zabeleženo za adulte krompirove zlatice (*Cloutier* i sar. 2000), čiji je ukupni proteolitički potencijal za 70-75% manji od onoga kod larvi (*Michaud* i sar. 1995a), sugerise postojanje praga iznad kojeg kompenzacija nutritivnog disbalansa povećanom brzinom konzumacije hrane nije moguća. Poznato je da nivo ishrane insekata zavisi od ravnoteže i dostupnosti nutrienata u hrani (*Simpson & Simpson*, 1989; *Simpson & Raubenheimer*, 1993). Mehanizmi regulacije koji uključuju indikatore nutrienata u hemolimfi insekta mogu biti izmenjeni prisustvom heterolognih cistatina u ishrani, posebno ako osnovne aminokiseline deluju kao indikatori te ravnoteže. To je očekivano ako je digestija proteina nekompletna ili ako je dinamika hidrolize proteina znatno izmenjena usled specifične inhibicije digestivnih proteaza ili promene njihovog profila. Ovo obrazloženje je u skladu sa izrazito povećanim apetitom L2 i L3 larvi krompirove zlatice na OCI/OCII transgenim listovima, kao i sa istim efektom dokumentovanom ranije za transgene linije krompira koje eksprimiraju jedan od orizacistatina (*Cloutier* i sar. 1999, 2000; *Cingel*, 2006).

Ako u poređenje između tretmana uključimo i vreme razvića pojedinih larvenih stupnjeva - koje je prema rezultatima dobijenim u ovom radu, kao i rezultatima dobijenim za OCII linije krompira (*Cingel, 2006*) u očiglednoj korelaciji sa brzinom rasta - nameće se zaključak da je povećanje performansi rasta i ishrane L2 i L3 larvi na OCI/OCII listovima usmereno ka zadržavanju normalne adaptivne vrednosti, u smislu održavanja telesne mase na kontrolnom nivou. Na ovaj način L2 larve delimično uspevaju kompenzovati potencijalni gubitak adaptivne vrednosti prilikom ingestije rekombinantnih orizacistatina, L3 ga kompenzuju u potpunosti, a brzina rasta i konzumacije hrane kod L4 ukazuju na aklimaciju larvi na prisustvo heterolognih PI. Za razliku od L2-L3 larvi na OCI-dijeti koje pokazuju sposobnost da prekompenzuju potencijalno negativan uticaj prisutnog PI (*Cloutier i sar. 1999*) ili potpuno kompenzuju OCII (*Cingel, 2006*), koekspresija oba orizacistatina, početno (tokom L2), pokazuje blagu, ali značajnu redukciju adaptivne vrednosti. Nakon toga, tokom L3, telesna težina larvi se vraća u okvire kontrolnog nivoa, verovatno usled postepene zamene OC-senzitivnih OC-insektivnim proteinazama (*Cloutier i sar. 1999, 2000 Gruden i sar. 2003*).

5.6.4. Analiza digestivnih proteinaza

Poznato je da krompirova zlatice digestivnu proteolizu bazira na cisteinskim i aspartatnim proteinazama (*Wolfson & Murdock, 1987; Thie & Houseman, 1990; Michaud i sar. 1993*) ali detektovana je i minorna digestivna aktivnost sa karakteristikama serinskih i metalo proteinaza (*Novillo i sar. 1997*). Cisteinske proteinaze krompirve zlatice su slične sisarskim katepsinima B i H i čine oko 66% ukupne digestivne proteolitičke aktivnosti (*Bolter & Latoszek-Green, 1997*) a specifične aspartatne proteinaze su nalik katepsinu D (*Thie & Houseman, 1990*) i čine oko 35% digestivne proteolize (*Bolter & Latoszek-Green, 1997*). Cisteinska proteinaza slična katepsinu H je snažno inhibirana orizacistainima I i II, ali aktivnost katepsina B, koja čini značajan deo ukupne digestivne proteolize krompirove zlatice, ostaje nepromenjena (*Michaud i sar. 1993*). U skladu sa tim, ingestija OCI/OCII listova krompira inicijalno,

nakon 24h, dovodi do smanjenja ukupne proteolitičke (azokazeinazne) digestivne aktivnosti L3 larvi do 56%, što je praćeno smanjenjem aktivnosti cisteinskih proteinaza do 62%. Sa druge strane, proteazna aktivnost kod L3 larvi krompirove zlatice koja je pri hroničnoj ingestiji OCI/OCII listova u okviru kontrolnog nivoa, ukazuje na prevazilaženje početnog, negativnog uticaja rekombinantnih orizacistatina. Iako ovakva aklimacija pri hroničnoj ingestiji rekombinantnih orizacistatina nije zabeležena kod larvi hranjenih OCI/OCII listovima linije 22 sorte Dezire, prisustvo aktivnih (neinhibiranih) proteinaza u crevima insekta, u ovom slučaju, može dovesti do fiziološke komplementacije funkcije inhibiranog katepsina H. Takođe, pokazano je da larve krompirove zlatice normalno poseduju veći nivo digestivnih proteinaza od onog neophodnog za opstanak, i da su, na primer, uprkos smanjenju ukupne aktivnosti digestivnih proteinaza za oko 42% sposobne da se razvijaju i rastu normalno (Bolter & Jongsma 1995). Isto tako, kada su izazvane prisustvom nativnih PI paradajza, koji nije "gostoljubiv" domaćin, larve krompirove zlatice mogu da povećaju digestivnu proteolizu do 4,2 puta u odnosu na onu kada se hrane krompirom (Overney i sar. 1997). Povrh toga, krompirova zlatica pokazuje i sposobnost da na prisustvo povećane količine inhibitora cisteinskih proteinaza, bilo nativnog krompirovog multicistatina indukovanog sa MeJa (Bolter & Jongsma, 1995), E-64 (Bolter & Latoszek-Green, 1997) ili rekombinantnog OCI (Cloutier i sar. 1999), indukuje izozime cisteinskih proteinaza neosetljivih na inhibitor. Sintaza digestivnih proteinaza neosetljivih na biljne PI, bilo to izmena proteinaza unutar iste mehanističke klase ili zamena mehanističke klase digestivnih proteinaza, izgleda da predstavlja deo opšteprisutnog adaptivnog mehanizma insekata. Tako se, na primer, larve *Spodoptera exigua* reaguju na visok nivo heterologih inhibitora serinskih proteinaza u listovima duvana sekrecijom crevnih proteinaza koje nisu osetljive na inhibitor (Jongsma i sar. 1995); nakon ingestije inhibitora tripsina (STI) larve Lepidoptera *Agrotis ipsilon* i *Helicoverpa zeainges* STI-senzitivne zamenjuje STI-insenzitivnim tripsinima (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001); kod larvi *Helicoverpa armigera* se, nakon ingestije inhibitora tripsina, smanjuje digestivna aktivnost tripsina a povećava aktivnost himotripsina (Bown i sar. 1997) ili himotripsina i elastaze (Wu i sar. 1997); larve *Baris coerulescens* nisu pogođene ishranom na uljanoj repici koja eksprimira OCI, jer gubitak cisteinske aktivnosti kompenzuju serinskim proteinazama (Bonade-Bottino i sar. 1999); izazvane cisteinskim PI, larve

Callosobruchus maculatus odgovaraju povećanom produkcijom aspartatnih proteinaza (Zhu-Salzman i sar. 2003a; Ahn & Zhu-Salzman, 2009) a larve *Tribolium castaneum* proteinsku digestiju prebaciju na serinske proteinaze (Oppert i sar. 2005). Za razliku od hiperprodukcije “nativnih” digestivnih enzima izmena proteinaznog profila insekata usled ingestije heterolognih PI verovatno je regulisana “prepoznavanjem” inhibitora (Bown i sar. 2004). Ovakav model regulacije, istovremeno objašnjava i fenomen da PI koji u *in vitro* uslovima pokazuju snažnu i specifičnu inhibiciju digestivnih enzima insekta, eksprimirani *in planta*, ne moraju imati značajan uticaj na adaptivnu vrednost insekta i da, nasuprot njima, *in vitro* “slabiji” inhibitori iste mehanističke klase proteinaza u *in vivo* situaciji mogu pokazati značajan efekat na rast ciljnog insekta (Hilder i sar. 1987; Gatehouse i sar. 1994, 1997; Bown i sar. 2004). Prema hipotezi Bown-a i saradnika (2004), a na osnovu analogije sa sisarskim sistemima, razlog za to je što snažni inhibitori specifičnije reaguju sa regulatornim mehanizmima sekrecije digestivnih enzima insekta i dovode do kvalitativnih promena u smislu isključivanja PI-senzitivnih i indukcije PI-insenzitivnih enzima na koje inhibitor više nema uticaja. Sa druge strane, “slabiji” PI usled manjeg afiniteta vezivanja nisu u potpunosti “prepoznati” i izazivaju kvantitativne promene - hiperprodukciju proteinaza, koje i dalje, makar delimično, mogu biti inhibirane ingestijom PI.

Jedan od evolutivnih mehanizama za prevazilaženje prisustva PI u ishrani je i proteolitička inaktivacija inhibitora - veoma efikasan sistem detoksifikacije potencijalno štetnih proteina koji je, takođe, široko rasprostranjen među insektima. Koleoptera *Otiorynchus sulcatus* delimičnom proteolizom može inaktivirati OCII (Michaud i sar. 1995b), a potpunom proteolizom humani stefin A, inhibitor katepsina B - čija je aktivnost neosetljiva na OCI, OCII i druge biljne cistatine (Michaud i sar. 1996); serinska proteinaza jedne druge koleoptere, *Zabrotes subfasciatus*, je odgovorna za degradaciju inhibitora α -amilaze, koju insekt nakon proteolize može koristiti kao nutritivni suplement (Ishimoto & Chrispeels, 1996); *Helicoverpa armigera* pokazuje sposobnost hidrolize CpTI, inhibitora tripsina (Giri i sar. 1998); koleoptera *Phaedon cochleariae* inaktivira OCI i BBI (inhibitor serinskih proteinaza) sinergističkim delovanjem serinskih proteinaza i leucin aminopeptidaza ne menjajući svoj digestivni profil (Girard i sar. 1998b), kao i *Plutella xylostella* koja specifično inaktivira inhibitor tripsina (MTI2) bez

indukcije dodatne enzimske aktivnosti (Yang i sar. 2009), za razliku od *Callosobruchus maculatus* gde je cisteinski PI iz soje (scN) inaktiviran kombinovanim delovanjem cistenskih i aspartatnih proteinaza čija se produkcija indukuje ingestijom scN (Zhu-Salzman i sar. 2003a).

Ovi podaci oslikavaju poteškoće u razvijanju povećane otpornosti biljaka pomoću jedinjenja koja deluju na nivou nutritivne redukcije koje se javljaju usled relativno složenog i hroničnog dejstva PI. Istovremeno, herbivorni insekti - posebno oni kod kojih se digestija zasniva na više od jedne mehanističke klase proteinaza - često su više nego adaptirani da prežive početni kontakt sa biljnim PI. Suočeni sa PI, insekti će pokrenuti različite mehanizme da izbegnu negativan uticaj PI, inaktiviraju ih, kompenzuju nutritivni stres ili ga čak i prekompenzuju - kao što je slučaj sa povećanjem performansi rasta i ishrane larvi krompirove zlatice kada su "izazvane" heterologim orizacistatinima. Ovo nije u potpunosti neočekivano jer se insekt uspešno razvija na krompiru, svom omiljenom domaćinu, uprkos prisustva različitih PI indukovanih povređivanjem (Walsh & Strickland, 1993; Bolter & Jongsma, 1995; Gruden i sar. 2003, 2004) i metaboličkoj ceni overekpresije proteinaza, kao odgovor na krompirove PI, od 14-31% potencijalne adaptivne vrednosti (Ortego i sar. 2001). Dodatno, larve krompirove zlatice pokazuju sposobost višestrukog povećanja digestivnog kapaciteta u zavisnosti od domaćina (Overney i sar. 1997). U prilog plastičnosti i mogućnostima adaptivnih odgovora digestivnog sistema larvi krompirove zlatice na različite PI ukazuje i podatak da gubitak aktivnosti katepsina D - aspartatne proteinaze značajne za inicijaciju hidrolize proteina (Brunelle i sar. 1999) - nakon ingestije rekombinantnog CDI inhibitora, larve krompirove zlatice kompenzuju modulacijom digestivnog profila i smanjujući produkciju CDI-senzitivnih enzima (Brunelle i sar. 2004)

Prema tome, a i na osnovu ranijih studija (Cloutier i sar. 1999, 2000; Cingel, 2006), može se reći da orizacistatini eksprimirani u listovima krompira na krompirovu zlaticu prevashodno deluju kao nutritivni modifikatori, sa privremenim uticajem na digestivni kapacitet larvi, ali bez znakova značajne toksičnosti. Svi ovi podaci, i njihovo poređenje (videti rezultate: OCI/OCII vs OCII) ukazuju i na postojanje maksimuma digestivne inhibicije larvi krompirove zlatice koji se može postići orizacistatinima iz pirinča.

Dodatno pojačavanje inhibitornog kapaciteta (ko-ekspresijom oba OC) - kako bi se, eventualno, predupredila sposobnost larvi krompirovih zlatice da overekspresijom cistatin-senzitivnih proteinaza prevaziđu digestivnu inhibiciju (*Ortego i sar. 2001; Alvarez i sar. 2007*) - bar na ovom nivou, nema značajnije dejstvo.

5.6.5. Krajnja telesna masa larvi i adulta krompirove zlatice

Istovremeno, dobijeni rezultati ukazuju da dostizanje kritične mase vodi do presvlačenja i prelaska larvi iz jednog stupnja u naredni. Ova opservacija je u skladu sa centralnom dogmom endokrinologije insekata (*Nijhout, 1994*): larve rastu do određene mase pre presvlačenja i ulaska u sledeći larveni stupanj, i da kritična masa mora biti postignuta za prestanak ishrane i inicijaciju metamorfoze. Regulacija veličine tela i vremena razvića, dve važne karakteriske koje određuju performansu larvi, a potom i adulta, je koordinisana preko neuroendokrinog sistema insekata (*Davidowitz i sar. 2003, 2004; Davidowitz & Nijhout, 2004*). Hormonsku regulaciju presvlačenja iniciraju abdominalni receptori istežanja koji se aktiviraju dostizanjem određene veličine larvi, a “odluka” larve da krene ka stadijumu lutke dešava se pre dostizanja maksimalne mase larve i ne zavisi od dalje ishrane (*Nijhout, 2003*).

Rast larvi insekta je eksponencijalan i larve nekih insekata 90% uvećanja mase ostvare tokom poslednjeg larvenog stupnja (*Davidowitz i sar. 2003; Nijhout i sar. 2006*). U poslednjem larvenom stupnju insekt dostiže kritičnu masu - telesnu masu na kojoj larva više ne mora da raste ili se hrani kako bi ušla u metamorfozu. Vreme u razviću nakon dostizanja kritične mase označen je kao “period do prestanka rasta” (eng. *Interval to Cessation of Growth*, ICG, *Davidowitz i sar. 2004; Davidowitz & Nijhout, 2004*) i maksimum ostvarene mase larve je određen stepenom dodatnog rasta tokom ICG - perioda u kome larva može skoro udvostručiti svoju masu (*Davidowitz i sar. 2004*). Prema tome, izgleda logično pretpostaviti da je umanjeње maksimuma telesne mase larvi krompirove zlatice na OCI/OCII transformisanim listovima krompira direktno u vezi i sa skraćenjem trajanja L4. Veličina insekta i vreme razvića su najčešće uzajamno zavisne osobine (*Roff, 2000*) i, pod uslovom da su ostali faktori jednaki, duže vreme

rasta vodi i ka većim jedinkama. U obrnutoj situaciji, kao što je to slučaj na OCI/OCII listovima, larve su - raspolažući jednim danom manje za dostizanje maksimuma mase a, za razliku od prethodnih stupnjeva, ne pokazujući bolje performanse rasta i ishrane - završavale rast sa do 19% redukovanom masom. Sličan efekat koji je kao posledicu imao redukciju krajnje mase larvi krompirove zlatice pokazan je i za OCII-transformisane linije krompira (*Cingel, 2006*). Sa druge strane, iako je skratila trajanje L4 krompirove zlatice, ishrana OCI transgenim listovima krompira nije značajno uticala na krajnju masu larvi (*Cloutier i sar. 1999*). Iako insekti poseduju mehanizme regulacije veličine tela koji su u velikoj meri zasnovani na interakciji brzine rasta i vremena razvića i koji vode do za vrstu karakteristične veličine jedinke, ona može varirati u zavisnosti od genetičkih i faktora životne sredine. Kao što je pokazano i u slučaju mnogih PI - koji, sasvim izvesno, za insekta predstavljaju promenu prirodnih uslova - smanjenje brzine rasta vodi do manjih jedinki, i obrnuto, ali nasuprot tome npr. porast temperature povećava brzinu rasta ali, usled skraćanja ICG, rezultuje manjom krajnjom veličinom insekta (*Davidowitz & Nijhout, 2004; Davidowitz i sar. 2004*).

Kako se najveći deo krajnje telesne mase larvi akumulira tokom poslednjeg stupnja, (kod krompirove zlatice više od 70%) varijacije u mehanizmima koji kontrolišu rast i veličinu jedinki poslednjeg larvenog stupnja će imati veći efekat na krajnju veličinu larvi nego varijacije u mehanizmima predhodnih stupnjeva. Izbor trenutka dostizanja kritične mase i regulacija vremena ishrane larve nakon toga (ICG) su dva faktora koji zajedno određuju krajnju masu poslednjeg larvenog stupnja. Prema ovom modelu, čak i male promene u tajmingu "odluke" o prestanku rasta mogu se značajno odraziti na krajnju veličinu insekta (*Nijhout i sar. 2010*). Brzina rasta na različite načine interaguje sa ova dva faktora u određivanju krajnje veličine larvi i ukupnog vremena razvića. Brzina rasta određuje koliko brzo će larva dosegnuti kritičnu masu, ali ne i vrednost kritične mase. Brzina rasta, takođe, određuje količinu akumulirane biomase larvi tokom ICG, ali ne i njegovo trajanje. Prema tome, brzina rasta je presudna u određivanju veličine larvi samo tokom ICG, a određuje vreme razvića samo u periodu pre dostizanja kritične mase (*Nijhout i sar. 2010*). Ovo obrazloženje je u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim prilikom ishrane larvi OCI/OCII listovima: povećanje stope rasta tokom L2 i L3 je dovelo do bržeg ulaska larvi u L4, a potom, povratkom brzine rasta na kontrolni nivo,

L4 larve nisu uspele kompenzovati skraćenje razvića i prestale su sa ishranom na manjoj krajnjoj telesnoj masi nego larve na netrainsformisanim listovima.

Iako mehanizmi kojima larva određuje kritičnu masu nisu poznati (*Nijhout*, 1994), ona nije fiksirana veličina i, pored genetičkih, zavisi i od faktora okoline - kao što je npr. kvalitet ishrane (*Davidowitz* i sar. 2003, 2004). Takođe, pokazno je da je ona u funkciji inicijalnih masa larvenih stupnjeva koji joj prethode (*Nijhout* i sar. 2006), što može ukazati na mogućnost da se smanjenje krajnjih masa L2 i L3 larvi krompirove zlatice na OCI/OCII transformisanim listovima reflektovalo na smanjenje kritične mase i, posledično, na finalnu masu L4.

Sa druge strane, endokrini tkiva kontrolišu brzinu razvića larvi insekata, oslanjajući se na informacije o nutritivnom statusu (*Colombani* i sar. 2003). Uloga IIS (insulin/IGF) signalnog puta u regulaciji hormonskih signala i, posledično, vremenu razvića insekata dokumentovana od strane više autora (*Caldwell* i sar. 2005; *Colombani* i sar. 2005; *Mirth* i sar. 2005; *Layalle* i sar. 2008). Brzina rasta larvi je u velikoj meri kontrolisana IIS (*Brogiolo* i sar. 2001; *Geminard* i sar. 2006) i ovaj signalni put, sa jedne strane, koordiniše rast larvi insekata sa nutritivnim ulovima, tako da npr. povećana ishrana pozitivno reguliše IIS i ubrzava rast (*Colombani* i sar. 2005). Istovremeno, sa druge strane, povećanje u IIS vodi ka bržem razviću larvi i ubrzavanju događaja koji vode ka metamorfozi tako da u uslovima izuzetno visoke brzine rasta larve "biraju" i ekstremno brzo razviće (*Walkiewicz & Stern*, 2009). Na taj način, promene u nutritivnom statusu istovremeno utiču i na hormonsku regulaciju razvića larvi i mogu voditi ka promenama u tajmingu stupnjeva razvića i regulaciji krajnje mase.

Veličina koju larva insekta dostigne pre nego što prestane sa ishranom i krene ka metamorfozi u velikoj meri definiše i veličinu adulta (*Davidowitz* i sar. 2004). Veličina adulta, generalno, određuje reproduktivni potencijal - prirodna selekcija će favorizovati krupnije jedinke, pošto npr. veće ženke pokazuju i veći fekunditet (*Roff*, 1992). Iako direktan uticaj orizacistatina na reproduktivni potencijal adulta krompirove zlatice nije zabeležen (*Cloutier* i sar. 2000), smanjenje mase adulta nakon ishrane larvi OCI/OCII listovima može imati ovakvu posledicu. Smanjenje mase adulta, usled ishrane larvi

krompirove zlatice na manje “omiljenim” domaćinima, vodi do produkcije i manjeg broja jaja (*Latheef & Harcourt, 1972; Brown i sar. 1980*) - što podržava generalni odnos između smanjenja mase i redukcije reproduktivne performanse. Sa druge strane, ranija pojava adulta je očigledna prednost i vodeći ka ranijoj reprodukciji može povećati i broj generacija insekta.

Transgeni listovi koji ekspimiraju cistatine iz pirinča mogu biti uzrok promene performansi insekta ne samo u smislu prisustva “stranog” anti-digestivnog proteina. Postoje podaci koji jasno ukazuju na višestruku ulogu cisteinskih proteinaza u fiziološkim procesima insekata: počev od embriogeneze, preko presvlačenja i metamorfoze, do reproduktivnog procesa (*Kurata i sar. 1992; Izumi i sar. 1994; Yamamoto i sar. 1994; Matsumoto i sar. 1997; Shiba i sar. 2001; Hegedus i sar. 2002*). Sa druge strane, pokazano je da OCI može proći intestinalnu barijeru i naći se u hemolimfi insekta u imunološki aktivnom obliku (*Rahbe i sar. 2003; Azzouz i sar. 2005*) i da, ispoljavajući tropizam ka tkivima uključenim u kvantitativni transport/sekreciju metabolita, OCI može inhibirati ne-digestivnu proteolitičku aktivnost insekta (*Rahbe i sar. 2003*).

Takođe, i neočekivane promene u biljci domaćinu nakon integracije transgena, bilo na genetičkom ili biohemijskom nivou, ne mogu biti isključene. Potencijalne interakcije između heterolognih PI i endogenih proteinaza biljke mogu nastati usled strukturne homologije sa ciljnim digestivnim proteazama insekta (*Goulet i sar. 2008*) i voditi ka inhibiciji (*Belenghi i sar. 2003*) ili pozitivnoj regulaciji (*Munger i sar. 2010*) hipersenzitivnog odgovora indukovano patogenima ili povećanja sadržaja proteina u listovima (*Prins i sar. 2008; Goulet i sar. 2010*) i na taj način dodatno uticati na performanse i biohemiju ciljnog insekta. Plejotropne promene *in planta* mogu direktno doprineti povećanju otpornosti na ciljnog insekta, kao što je npr. povećanje gustine glanduralnih trihoma na listovima duvana - organa koji insektima smanjuju pristupačnost listovima - nakon ekspresije serinskog PI iz *Solanum americanum* (*Luo i sar. 2009*) ili omogućiti otpornost i na ne-ciljne patogene organizme, plejotropnom

konstitutivnom ekspresijom PR (eng. *pathogenesis-related*) proteina kao što su hitinaze i β -glukanaze u listovima krompira koji ekspirira CCII, cistatin iz kukuruza (*Munger i sar. 2010*). Sa druge strane, ekspresija insekticidnih proteina - lektina, aglutinina (GNA) i inhibitora tripsina (CpTi) - u krompiru može uticati na sekundarni metabolizam i redukovati nivo solanidinskih glikoalkaloida, endogenih odbrambenih jedinjenja biljke (*Birch i sar. 2002*). Podaci da larve L4 stupnja krompirove zlatice “podešavaju” svoj digestivni profil prema setu odbrambenih jedinjenja indukovanih u krompiru (*Rivard i sar. 2004*), kao i da, na primer, nizak ili umeren nivo glikoalkaloida u veštačkoj dijeti krompirovih mušica, *M. euphorbiae* and *M. persicae*, stimuliše ishranu i reprodukciju (*Fragoyiannis i sar. 1998; Gunter i sar. 1997*) - podržavaju ideju o mogućem PI-plejotropnom uticaju i na biohemiju insekta.

Transfer heterolognih gena koji povećavaju otpornost prema insektima u ekonomski važne gajene biljke obezbeđuje brz, ekonomičan i po okolinu “prijateljski” pristup oplemenjivanja useva, kao dopunu tradicionalnim metodama ukrštanja. Kako je efektivnost ekspresije jednog proteinaznog inhibitora, bar u nekim slučajevima, dovedena u pitanje, narastajući podaci pokazuju da kombinacija faktora otpornosti može omogućiti višestruku inhibiciju, minimalnu kompenzaciju i efikasnu zaštitu protiv herbivornih predatora *in vivo* (*Urwin i sar. 1998; Inanaga i sar. 2001; Outchkourov i sar. 2004*). Isto tako, neselektivna upotreba jednog insekticidnog transgena, kao u slučaju *Bt*-toksina, može pospešiti evoluciju otpornosti među populacijama insekata.

Strategije zaštite biljaka zasnovane na fuziji komplementarnih proteina, bilo to *Bt*-toksina (*Bohorova i sar. 2001; Naimov i sar. 2001*), *Bt*-toksina i drugih insekticidnih peptida (*Cao i sar. 2010*), PI (*Inagana i sar. 2001; Zhu-Salzman i sar. 2003b*) ili PI i drugih protektivnih proteina (*Fitches i sar. 2002, 2004*) mogu doneti opsežniju i trajniju zaštitu. Tako je hibridni CDI-CCII inhibitor aspartatnih (CDI iz paradajza) i serinskih proteinaza (CCII iz kukuruza) imao snažan negativan uticaj na larve krompirove zlatice iako je stvarni potencijal CDI-CCII ostao da se pokaže *in planta* (*Brunelle i sar. 2005*). Takođe, ekspresija hibridnog LIP inhibitora serinskih proteaza u krompiru uzrokovala je blagu ali značajnu redukciju rasta krompirove zlatice (*Kondrak i sar. 2005*), sugerišući da bi i multifunkcionalni PI životinjskog porekla bili dobra strategija povećanja

otpornosti biljaka na ovog insekta. Ironično, kada je jedan takav polipeptid, ekvistatin, koji jednim svojim domenom inhibira karboksipeptidaze a drugim cisteinske proteaze i čija je visoka efikasnost potvrđena kada je prisutan u ishrani krompirove zlatice (*Gruden i sar. 1998*) eksprimiran u krompiru, endogene proteaze biljke su inaktivirale inhibitor (*Outchkourov i sar. 2003*).

Među mnogim strategijama, predloženim da bi se izbegla ili odložila pojava rezistentnosti među isektima, “slaganje” transgena je, potencijano, najkorisnija. “Slaganje” različitih *Bt*-toksina (*Stewart i sar. 2001; Cao i sar. 2002; Kurtz i sar. 2007; Lian i sar. 2008; Sivasupramaniam i sar. 2008*) ili kombinovanje *Bt*-toksina sa PI, lektinima ili aglutininima (*Zhao i sar. 1998; Maqbool i sar. 2001; Rao i sar. 2001; Liu i sar. 2004; Zhang i sar. 2005; Guo i sar. 2007; Zhu i sar. 2007; Han i sar. 2007; Su i sar. 2011; Xiao i sar. 2012*) dovelo je do dodatnog povećanja otpornosti na ciljnog insekta i/ili povećalo opseg otpornosti biljke.

Kombinovana ekspresija lektina (*gna*) i inhibitora tripsina (*sbti*) donela je transgenom pirinču otpornost na insekte *Nilaparvata lugens* i *Cnaphalocrocis medinalis* (*Li i sar. 2005*). Koekspresija dva PI, inhibitora tripsina i fitocistatina (sporamina i CeCPI), u duvanu obezbedila je zaštitu od napada insekata, bakterijskih i gljivičnih patogena (*Senthilkumar i sar. 2010*). Kombinovano dejstvo PI može se ispoljiti i na sinergistički način (*Oppert i sar. 1993; Orr i sar. 1994; Burgess i sar. 1994; Markwick i sar. 1995*). To se može objasniti tako što kombinacija PI sprečava uspešnost adaptivnog odgovora larvi insekata - prebacivanje na alternativnu klasu digestivnih proteaza insekta usled dejstva jednog PI, biva “pokriveno” drugim PI (*Oppert i sar. 1993, 2003; Dunse i sar. 2010*) ili tako što jedan PI, dodatno štiti drugi od proteolize, inhibirajući proteinaze insekta koje imaju sposobnost da hidrolizuju PI (*Orr i sar. 1994; Amirhusin i sar. 2007*). Sa druge strane kombinacija protektivnih proteina može da ima i suprotan efekat: biljke *Arabidopsis thaliana* koje koeksprimiraju *cryIAc* i inhibitor tripsina (CpTI) trpe veća oštećenja od onih sa samo *cryIAc* (*Santos i sar. 1996*). Moguće objašnjenje je da PI, menjajući sastav proteaza insekta, utiče na obradu *Cry* protoksina i/ili ubrzava degradaciju samog toksina.

Zaključak koji dolazi iz ovoga rada, kao i iz nekih drugih sistema, je da kombinacija dva PI ne mora biti efikasna u izbegavanju kompenzatornog odgovora insekta: insekti u susretu sa subletalnom dozom kombinovanih PI i dalje mogu da prevaziđu inhibiciju indukujući akumulaciju niza dodatnih digestivnih enzima (*Abdeen* i sar. 2005). Isto tako, dodavanje drugog insekticidnog proteina transgenoj liniji koja već eksprimira jedan insekticidni protein istog mehanizma delovanja ne mora dovesti do povećanja otpornosti (*Meiyalaghan* i sar. 2010). Ova mogućnost se, možda uspešnije, može preduprediti kombinovanjem PI sa proteinima koji imaju drugačiji način delovanja, kao što su *Bt*-endotoksini, lektini ili drugi insekticidni proteini.

Iako je napredak genetičkog inženjeringa i molekularne biologije, uporedo sa saznanjima o odbrambenim mehanizmima biljaka i sposobnostima insekta da prevaziđu tu odbranu, kao i interakcijama enzim-inhibitor, omogućio unapređenje postojećih i razvijanje novih metoda zaštite biljaka, *Leptinotarsa decemlineata* je i dalje ostala insekt koji još uvek nije uspešno kontrolisan inhibitorima proteaza. Uočene promene u ishrani, performansama rasta i razvića larvi krompirove zlatice mogu biti tumačene kao regulatorni odgovor koji ima za cilj postizanje maksimuma telesne mase uprkos prisustvu rekombinantnih digestivnih inhibitora. Time se pokreću složene interakcije između ishrane, digestivnih procesa i regulatornih mehanizama rasta i razvića koje imaju za cilj da kompenzuju potencijalno smanjenje adaptivne vrednosti usled ishrane transformisanim listovima.

6. ZAKLJUČCI

1. “Slaganje” *OCI* i *OCII* gena, radi dodatnog povećanja otpornosti na štetočine krompira, moguće je uspešno izvesti postupkom ko-transformacije sa dva različita soja *Agrobacterium tumefaciens*. Ovaj postupak je pogodan za sorte Dragačevka i Dezire i zabeležena frekvenca kointegracije orizacistatinskih gena kreće se između 20% i 22%. Za sortu Jelica re-transformacija je efikasniji pristup: frekvenca integracije *OCII* gena nakon re-transformacije *OCI*-transformisane linije iznosila je 91%.
2. “Slaganje” dva orizacistatinska gena, bilo postupkom ko-transformacije ili re-transformacije, moguće je postići koristeći *nptII* gen kao jedini selekcionni marker.
3. Aktivacija regulatornih genskih sekvenci i ekspresija *OCI* i *OCII* gena indukovana je povređivanjem. Akumulacija i biološka aktivnost rekombinantnih *OCI* i *OCII* proteina nakon mehaničkog povređivanja potvrđena je kod svih analiziranih *OCI/OCII* transformisanih linija krompira.
4. Transformisane *OCI/OCII* linije krompira gajene u kulturi *in vitro* i uslovima staklenika nisu ispoljile značajna odstupanja od normalnog fenotipa, što ukazuje na nizak nivo somaklonalnih varijacija i odsustvo uticaja rekombinantnih *OCI* i *OCII* na metabolizam biljke domaćina. Ipak, vidljiva odstupanja od normalnog fenotipa mogu se pokazati prilikom rasta transformisanih linija krompira u prirodnim uslovima, i ona se, najverovatnije, mogu pripisati uticajima kulture *in vitro* i/ili samog procesa transformacije.
5. Iako nije uticala na smrtnost, ishrana larvi krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say) *OCI/OCII* transformisanim listovima krompira imala je značajan uticaj na različite osobine performanse rasta i razvića larvi krompirove zlatice. Larve na transformisanim listovima su brže prolazile kroz stupnjeve razvića, rasle su i konzumirale listove brže i ranije su dostizale maksimum mase, “usporavajući” sa

ishranom i ulazeći u prepupalnu fazu razvića. Takođe, u odnosu na kontrolne, larve hranjene OCI/OCII listovima su ranije dostizale stadijum lutke i, potom, adulta.

6. Za razliku od prethodnih stupnjeva, L4 larve krompirove zlatice hranjene transformisanim listovima nisu povećanjem performansi rasta i ishrane uspele kompenzovati negativne efekte orizacistatina. U odnosu na larve hranjene netransformisanim listovima, larve na OCI/OCII listovima završavale su rast sa do 19,4% redukovanom masom i nanele su do 18,5% manje oštećenja transformisanim listovima krompira. Smanjenje maksimalne mase larvi na OCI/OCII listovima dovelo je i do pojave adulta do 26,3% redukovane telesne mase.
7. Orizacistatini koeksprimirani u listovima krompira na krompirovu zlicu prevashodno deluju kao nutritivni modifikatori, sa privremenim uticajem na digestivni kapacitet larvi. Ingestija rekombinantnih OCI i OCII početno smanjuje ukupnu proteolitičku aktivnost kao i specifičnu aktivnost cisteinskih proteinaza insekta, koja se pri hroničnoj ingestiji inhibitora vraća na kontrolni nivo, što ukazuje na postepene kompenzatorne odgovore proteaza larvi na prisustvo rekombinantnih orizacistatina u ishrani.
8. Uočene promene u ishrani, rastu i razviću larvi krompirove zlatice mogu biti tumačene kao regulatorni odgovor koji omogućava održavanje maksimuma telesne mase na kontrolnom nivou uprkos prisustvu rekombinantnih digestivnih inhibitora. Time se pokreću složene interakcije između ishrane, digestivnih procesa i regulatornih mehanizama rasta i razvića koje mogu da kompenzuju potencijalno smanjenje adaptivne vrednosti usled ishrane transformisanim listovima.

7. LITERATURA

Abbott JC, Barakate A, Pinçon G, Legrand M, Lapierre C, Mila I, Schuch W, Halpin C. 2002. Simultaneous suppression of multiple genes by single transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco. *Plant Physiol.* 128, 844–853.

Abdeen A, Virgos A, Olivella E, Villanueva J, Aviles X, Gabarra R, Prat S. 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Mol. Biol.* 57, 189–202.

Abdel-Meguid M, von der Helm K, Korant BD, Cheronis JC. 2000. *Proteases as Targets for Therapy*. Berlin: Springer-Verlag.

Abe K, Emori Y, Kondo H, Arai S, Susuki K. 1988. The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin suprfamily. *J. Biol. Chem.* 263(16), 7655-7659.

Abe K, Emori Y, Kondo H, Suzuki K, Arai S. 1987. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J. Biol. Chem.* 262, 16793-16797.

Abe M, Abe K, Kudora M, Arai S. 1992. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as novel cystatin sperfamily member of plant origin. *Eur. J. Biochem.* 209, 933-937.

Adang MJ, Brody MS, Cardineau G, Eagan N, Roush RT, Shewmaker C, Jones A, Oakes J, McBride K. 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* 21, 1131–1145.

Aguiar JM., Franco OL, RigdenDJ, Bloch C, Monteiro ACS, Flores VMQ, Jacinto T, Xavier-Filho J, Oliveira AEA, Grossi-de-Sa MF, Fernandes KVS. 2006. Molecular Modeling and Inhibitory Activity of Cowpea Cystatin against Bean Bruchid Pests *PROTEINS*, 63, 662–670.

- Ahloowalia BS. 1982. Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphitica*. 31, 755-759.
- Ahmad R, Kim YH, Kim MD, Kwon SY, Cho K, Lee HS, Kwak, SS. 2010. Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 138, 520–533.
- Ahn JE, Lovingshimer MR, Salzman RA, Presnail JK, Lu AL, Koiwa H, Zhu-Salzman K. 2007. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* counteracts dietary protease inhibitors through modulating propeptides of major digestive enzymes. *Insect Mol. Biol.* 16, 295–304.
- Ahn JE, Salzman RA, Braunagel SC, Koiwa H, Zhu-Salzman K. 2004. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.* 13, 649–657.
- Ahn JE, Zhu-Salzman K. 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *J Insect Physiol.* 55(8), 678-85.
- Ahrenholtz I, Harms K, deVries J, Wackernagel W. 2000. Increased ldling of *Bacillus subtilis* on the hairy roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1862-1865.
- Alfonso-Rubi J, Ortego F, Castanera P, Carbonero P, Diaz I. 2003. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Res.* 12, 23-31.
- Almasia NI, Bazzini AA, Hopp HE, Vazquez-Rovere C. 2008 Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Mol Plant Pathol.* 9(3), 329-38.
- Altpeter F, Diaz I, McAuslane H, Gaddour K, Carbonero P, Vasil IK. 1999. Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe. *Mol. Breed.* 5, 53-63.

- Alvarez-Alfageme F, Martínez M, Pascual-Ruiz S, Castanera P, Díaz I, Ortego F. 2007. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgen. Res.* 16, 1–13.
- Amirhusin B, Shade RE, Koiwa H, Hasegawa PM, Bressan RA, Murdock LL. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *J. Insect Physiol.* 53, 734-740.
- Amirouche L, Stuchbury T, Matthews S. 1985. Comparison of cultivar performance on different nutrient media in a routine method for potato micropropagation. *Potato Res.* 28, 469-478.
- An G, Watson BD, Chiang CC. 1986. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol.* 81:301-305.
- Andersson M, Trifonova A, Andersson AB, Johansson M, Bulow L, Hofvander P. 2003. A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Rep.* 22, 261–267.
- Aoki H, Akaike T, Abe K, Kuroda M, Arai S, Okamura R, Negi A, Maeda H. 1995. Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against herpes simplex virus type 1 in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 846–849.
- Arai S, Abe K. 2000. Cystatin-based control of insects, with special reference to oryzacystatin, in: D. Michaud (Ed.), *Recombinant Protease Inhibitors in Plants*, Landes Bioscience, Georgetown, TX, 27-42.
- Arai S, Watanabe H, Kondo H, Emori Y, Abe K. 1991. Papain inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. *Biochem.* 109, 294-298.
- Arce P, Moreno M, Gutierrez M, Gebauer M, Del Orto P, Torres H, Acuna I, Oliger P, Venegas A, Jordana X, Kalazich J, Holulgue L. 1999. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. *Amer. J. Potato Res.* 76, 169-177.

- Arif M, Thomas PE, Crosslin JM, Brown CR. 2009. Agrobacterium-mediated transformation of potato using PLRV-REP. and PVY CP genes and assessment of replicase mediated resistance against natural infection of PLRV. Pak. J. Bot. 41, 1477-1488.
- Arimura G, Tashiro K, Kuhara S, Nishioka T, Ozawa R, Takabayashi J. 2000. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. Biochem Biophys. Res. Commun. 277, 305-310.
- Ashouri A, Michaud D, Cloutier C. 2001a. Recombinant and classically selected factors of potato plant resistance to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, variously affect the potato aphid parasitoid *Aphidius nigripes*. Biocontrol 46, 401–418.
- Ashouri A, Michaud D, Cloutier C. 2001b. Unexpected effects of different potato resistance factors to the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the potato aphid (Homoptera: Aphididae). Environmental Entomology 30, 524–532.
- Ashouri A, Overney S, Michaud D, Cloutier C 1998. Fitness and feeding are affected in the twospotted stinkbug, *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, Oryzacystatin I. Arch. Insect Biochem. Physiol. 38, 74-83.
- Atkinson HJ, Grimwood S, Johnston K, Green J. 2004. Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. Transgenic Res. 13, 135–142.
- Atkinson HJ, Urwin PE, Hansen E, McPherson MJ. 1995. Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes Trends Biotechnol. 13, 369–374.
- Atkinson HJ, Urwin PE, McPherson MJ. 2003. Engineering plants for nematode resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 41, 615-39.
- Azarkan M, Dibiani R, Goormaghtigh E, Raussens V, Baeyens-Volant D. 2006. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable beta-sheet glycoprotein. Biochim Biophys Acta. 1764(6), 1063-72.

- Azzouz H, Cherqui A, Campan EDM, Rahbe Y, Duport G, Jouanin L, Kaiser L, Giordanengo P. 2005. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman–Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *J. Insect Physiol.* 51, 75–86.
- Badri MA, Rivard D, Coenen K, Michaud D. 2009. Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically-useful proteins: the case of bovine aprotinin travelling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* 9, 746–756.
- Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC, Preston CA. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking Trees” in the genomics era. *Science*, 311, 812-815.
- Banerjee AK, Prat S, Hannapel DJ. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci.* 170,732-738.
- Barampuzam S, Zhang ZJ. 2011. Recent advances in plant transformation. *Methods Mol. Biol.* 701, 1–35.
- Barerett AJ. 1994. Classification of peptidases. In: Barerett, A.J, ed. *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press, vol. 244, p. 1-15.
- Barrell PJ, Conner AJ. 2006. Minimal T-DNA vectors suitable for agricultural deployment of transgenic plants. *BioTechniques* 41, 708–710.
- Barrell PJ, Conner AJ. 2011. A strategy to facilitate the recovery of phenotypically normal transgenic lines in clonal crops. *Theor Appl Genet.* 122, 1171-1177.
- Barrell PJ, Shang YJ, Cooper PA, Conner AJ. 2002. Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. *Plant Cell Tiss. Org.* 70, 61–68.
- Bauer SL, Pankratz HS. 1993. *Nosema scripta* N. Sp. (Microsporida: Nosematidae), a Microsporidian Parasite of the Cottonwood Leaf Beetle, *Chrysomela scripta* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Euk. Microbiol.*, 40(2), 135-141.

Baxter WS, Badenes-Perez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, Wang P, Heckel DG, Jiggins CD. 2011. Parallel evolution of Bt toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics: Published Articles Ahead of Print*, published on August 11, 2011 as 10.1534/genetics.111.130971

Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnell A, Sangwan-Norreel BS. 1998. *Agrobacterium-mediated* transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. *J. Exp. Bot.* 49,1589-1595.

Bede J, Musser R, Felton G, Korth K. 2006. Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 60, 519–531.

Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Delledonne M. 2003. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur. J. Biochem.* 270, 2593-2604.

Belknap WR, Corsini D, Pavek JJ, Snyder GW, Rockhold DR, Vayda ME. 1994. Field performance of transgenic Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. *Am. Potato J.* 71, 285-296.

Bell HA, Down RE, Fitches EC, Edwards JP, Gatehouse AMR. 2003. Impact of genetically modified potato expressing plant-derived insect resistance genes on the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 13, 729–741.

Bell HA, Fitches EC, Down RE, Ford L, Marris GC, Edwards JP, Gatehouse JA, AMR Gatehouse. 2001. Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on the growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Pest Manag. Sci.* 57, 57-65.

Benchekroun A, Michaud D, Nguyen-Quoc B, Overney S, Desjardins Y, Yelle S. 1995. Synthesis of active oryzacystatin I in transgenic potato plants. *Plant Cell Rep.* 14, 585-588.

- Benmoussa M, Vezina LP, Page M, Gelinas P, Yelle S, Laberge S. 2004. Potato flour viscosity improvement is associated with the expression of a wheat LMW-glutenin gene. *Biotechnol. Bioengin.* 87, 495–500.
- Bent AF. 2000. *Arabidopsis in planta* transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* 124, 1540–1547.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. 2002. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* 29, 23-32.
- Beuning LL, Mitra DS, Markwick NP, Gleave AP. 2001. Minor modifications to the cry1Ac9 nucleotide sequence are sufficient to generate transgenic plants resistant to *Phthorimaea operculella*. *Ann. Appl. Biol.* 138, 281-292.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304, 184-187.
- Bhatt AM, Lister C, Crawford N, Dean C. 1998. The transposition frequency of Tag1 elements is increased in transgenic *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* 10, 427–434.
- Bhau BS, Wakhlu AK. 2001. Effect of some antibiotics on the *in vitro* morphogenetic response from callus cultures of *Coryphantha elephantides*. *Biol. Plant.* 44, 19-24.
- 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.
- Biever KD, Chauvin RL. 1990. Prolonged dormancy in Pacific Northwest population of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Can. Entomol.* 122, 175-177.
- Bingham ET. 1983. Maximizing heterozygosity in autopolyploids. pp. 474-489. In: Lewis WH (ed.), *Proc. Intern. Conf. Polyploidy: biological relevance*. Plenum Press. New York.

- Binns AN. 2002. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. Trends Plant Sci. 7, 231–233.
- Birch A, Geoghegan IE, Griffiths DW, Mcnicol JW. 2002. The effect of genetic transformations for pest resistance on foliar solanidine based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*). Ann. Appl. Biol. 140, 143-149.
- Birch ANE, Geoghegan IE, Majerus MEN, Mc-Nicol JW, Hackett CA, Gatehouse AMR, Gatehouse JA. 1999. Tri-trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. Mol. Breed. 5, 75-83.
- Birch RG. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 297-326.
- Birk Y. 1985. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans, Int. J. Pept. Protein Res. 25, 113-131.
- Birk Y. 1993. Protease inhibitors of plant origin and role of protease inhibitors in human nutrition: overview. In W. Troll and A.R. Kennedy (eds.), In Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents. New York: Plenum Press, pp. 97-106.
- Bisht NC, Jagannath A, Burma PK, Pradhan AK, Pental D. 2007. Retransformation of a male sterile *barnase* line with the *barstar* gene as an efficient alternative method to identify male sterile–restorer combinations for heterosis breeding. Plant Cell Rep. 26, 727–733.
- Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. Nat. Biotechnol. 18, 213-217.
- Bode W, Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. J. Biochem. 204, 433-451.
- Bode W, Huber R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochimica et Biophysica Acta 1477, 241-252.

- Bohorova N, Frutos R, Royer M, Estanol P, Pacheco M, Rascon Q, McLean S, Hoisington D. 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1B gene and the cry1B-cry1Ab translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. *Theor. Appl. Genet.* 103, 817-826.
- Bolter C 1993. Methyl jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. *Plant Physiol.* 103,1347-1353.
- Bolter CJ, Jongsma MA. 1995. Colorado potato beetles adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J. Insect Physiol.* 41, 1071–1078.
- Bolter CJ, Latoszek-Green M. 1997. Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomol. Exp. Appl.* 83, 295-303.
- Bonade-Bottino M, Lerin J, Zaccomer B and Jouanin L. 1999. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystain I. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 131–138.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD. 1993. A test of the maximum heterozygosity hypothesis using molecular markers in tetraploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 86, 481-491.
- Botella MA, Xu Y, Prabha TN, Zhao Y, Narasimhan ML, Wilson KA, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM. 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 112, 1201-1210.
- Bouchard E, Cloutier C, Michaud D. 2003b. Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. *Mol. Ecol.* 12, 2439–2446.
- Bouchard E, Michaud D, Cloutier C. 2003a. Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine proteinase inhibitor from rice. *Mol. Ecol.* 12, 2429–2437.

Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X. 1997. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9, 1573-1584.

Bowling SA, Guo A, Cao H, Gordon AS, Klessig DF, Dong X. 1994. A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1845-1857.

Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA. 1997. Differentially regulated inhibitor sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27(7), 625-638.

Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA. 2004. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiol. Entomol.* 29, 278-290.

Bradley D, Harkey MA, Kim MK, Biever KD, Bauer LS. 1995. The insecticidal CryIIIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 162-173.

Bradshaw JE, Mackay GR. 1994. Breeding strategies for clonally propagated potatoes. In: Bradshaw JE, Mackay GR (eds), *Potato Genetics*. CABI, Wallingford, UK pp. 467-497.

Brar DS, Jain SM. 1998. Somaclonal variation: mechanisms and applications in crop improvement. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Kluwer, Boston, pp 17-37.

Breitler JC, Labeyrie A, Meynard D, Legavre T, Guiderdoni E. 2002. Efficient microprojectile bombardment mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theor. Appl. Genet.* 104, 709-719.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254

- Breitler JC, Meynard D, Van Boxtel J, Royer M, Bonnot F, Cambillau L, Guiderdoni E. 2004. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Res.* 13, 271–287.
- Broadway RM, Duffey SS. 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32, 827-833.
- Broadway RM. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J. Insect Physiol.* 2, 107–116.
- Broadway RM. 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 855-874.
- Broggiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. 2001. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11, 213–221.
- Brown CR. 2005. Antioxidants in potato. *Am. J. Potato Res.* 82: 163–172.
- Brown JJ, Jermy T, Butt BA. 1980. The influence of an alternate host plant on the fecundity of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73, 197-199.
- Brunelle F, Girard C, Cloutier C, Michaud D. 2005. A Hybrid, Broad-Spectrum Inhibitor of Colorado Potato Beetle Aspartate and Cysteine Digestive Proteinases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 60, 20–31.
- Brunelle F, Cloutier C, Michaud D. 2004. Colorado Potato Beetles Compensate for Tomato Cathepsin D Inhibitor Expressed in Transgenic Potato. *Arch. of Insect Biochem. Physiol.* 55, 103–113.
- Brunelle F, Nguyen-Quoc B, Cloutier C, Michaud D. 1999. Protein hydrolysis by Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say: Chrysomelidae) digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 88–98.

Brzin J, Kidric M. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 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. *J. Integ. Plant Biol.* 48, 732-739.

Bundock P, Den Delk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJJ. 1995. Trans kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 3206-3214.

Burgess EP, Main CA, Stevens PS, Christeler JT, Gatehouse AMR, Laing WA. 1994. Effect of proteinase inhibitor concentration and combination on survival, growth and gut enzyme activities of the black field cicket, *Telogyllus commodus*. *J. Insect Physiol.* 40, 803-811.

Burgess EPJ, Malone LA, Christeller JT, Lester MT, Murray C, Philip BA, Phung MM, Tregidga EL. 2002. Avidin expressed in transgenic tobacco leaves confers resistance to two noctuid pests, *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Transgenic Res.* 11, 185-198.

Burgess EPJ, Philip BA, Christeller JT, Page NEM, Marshall RK, Wohlers MW. 2008. Tri-trophic effects of transgenic insect-resistant tobacco expressing a protease inhibitor or a biotin-binding protein on adults of the predatory carabid beetle *Ctenognathus novaezealandiae*. *J. Insect Physiol.* 54, 518-528.

Cai D, Thureau 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 Mol. Biol.* 51(6), 839-849.

Caldwell PE, Walkiewicz M, Stern M. 2005. *Ras* activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Curr. Biol.* 15, 1785-1795.

Cao CW, Liu GF, Wang ZY, Yan SC, Ma L, Yang CP. 2010. Response of the gypsy moth, *Lymantria dispar* to transgenic poplar, *Populus simonii* x *P. nigra*, expressing fusion protein gene of the spider insecticidal peptide and *Bt*-toxin Cpeptide. *J. Insect Sci.*10:200 available online: insectscience.org/10.200

Cao J, Zhao JZ, Tang JD, Shelton AM, Earle ED. 2002. Broccoli plants with pyramided *cryIAC* and *cryICBt* genes control diamondback moths resistant to Cry1A and Cry1C proteins. *Theor. Appl. Genet.* 105, 258–264.

Capinera JL. 2001. *Handbook of Vegetable Pests*. Academic Press, San Diego. 729 pp.

Carbonero P, Royo J, Diaz I, Garcia-Maroto F, Gonzalez-Hidalgo E, Gutierrez C, Cassanera P. 1993. Workshop on Engineering Plants Against Pests and Pathogens, *In* G.J. Bruening, F. Garcia-Olmedo, and F.J. Ponz (eds.), Instituto Juan March de Estudios Investigaciones, Madrid, Spain, pp. 1-13.

Carlini C, Grossi-de-Sa MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.

Carputo D, Camadro E L, Peloquin SJ. 2010. Terminology for polyploids based on cytogenetic behavior: Consequences in genetics and breeding. *Plant Breed. Rev.* 26, 105-124.

Carrer H, Maliga P. 1995. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. *Biotechnol.* 13, 791-794.

Cervera M, Navarro L, Pena L. 2009. Gene stacking in 1-year-cycling *APETALA1* citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. *J. Biotechnol.* 140, 278–282.

Chabannes M, Barakate A, Lapierre C, Marita, JM, Ralph J, Pean M, Danoun S, Halpin C, Grima-Pettenati J, Boudet AM. 2001. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J.* 28, 257–270.

Chakrabarti SK, Mandaokar AD, Shukla A, Pattanayak D, Naik PS, Sharma RP, Kunlar PA. 2000a. *Bacillus thuringiensis cryIAb* gene confers resistance to potato against *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Potato Res.* 43,143-152.

Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A. 2000b. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3724–3729.

Chakraborty S, Chakraborty N, Agrawal L, Ghosh S, Narula K, Shekhar S, Naik PS, Pande PC, Chakraborti SK, Datta A. 2010. Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene AmA1 is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *PNAS Early Edition* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1006265107.

Chakravarty B, Wang-Pruski G, Flinn B, Gustafson V, Regan S. 2007. Genetic transformation in potato: Approaches and strategies. *Am. J. Potato Res.* 84 (4), 301-311.

Chan YL, Sanjaya LKH, Liao LJ, Chen WH, Chan MT. 2005. Gene stacking in *Phalaenopsis orchid* enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transg. Res.* 14, 279–288.

Chang MM, Culley D, Choi JJ, Hadwiger AL. 2002. Agrobacterium-mediated co-transformation of a pea b-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 Breed.* 5, 357-365.

Chehab EW, Kaspi R, Savchenko T, Rowe H, Negre-Zakharov F, Kliebenstein D, Dehesh K. 2008. Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS ONE* 3, e1904.

Chen MS, Johnson B, Wen L, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Morgan TD, Reeck GR. 1992. Rice cystatin: bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory, and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. *Protein Expr Purif* 3, 41–49.

- Chen L, Marmey P, Taylor NJ, Brizard J-P, Espinoza C, D'Cruz P, Huet H, Zhang S, De Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM. 1998. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat. Biotechnol.* 16, 1060-1064.
- Chen P, Buss GR, Tolin SA. 1993. Resistance to Soybean Mosaic Virus Conferred by Two Independent Dominant Genes in PI 486355. *Heredity* 84, 25–28.
- Chen S, Wang J, Hu R, Song Y, Yang S, Zhang L. 2012. Effects of overexpression of four *Populus* wound-inducible genes in *Arabidopsis* on its resistance against *Plutella xylostella* L. *Acta Physiol. Plant.* 34(4), 1583-1588.
- Chen SC, Liu AR, Wang FH, Ahammed, GJ. 2009. Combined overexpression of chitinase and defensin genes in transgenic tomato enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *African J. Biotechnol.* 8 (20), 5182-5188.
- Cheng W, Wu R. 1997. Systemic induction and kinetics of *PinII* gene expression in transgenic rice plants. *Rice Genet. Newsletter*, 14, p160.
- Chilton MD. 2001. *Agrobacterium*. A memoir. *Plant Physiol.* 125, 9–14.
- Chong DK, Roberts W, Arakawa, Illes K, Bagi G, Slattery CW, Langridge WH. 1997. Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants. *Transgen. Res.* 6, 289–296.
- Christeller JT, Burgess EPJ, Mett V, Gatehouse HS, Markwick NP, Murray C, Malone LA, Wright MA, Philip BA, Watt D et al. 2002: The expression of a mammalian proteinase inhibitor, bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. *Transgenic Res.* 11, 161-173.
- Christou P, Swain WF. 1990. Co-transformation frequencies of foreign genes in soybean cell cultures, *Theor. Appl. Genet.* 79, 337-341.
- Christou P. 1995. Strategies for variety independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilising particle bombardment. *Euphytica* 85, 13–27.

Christova PK, Christov NK, Imai R. 2006. A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta* 223, 1207-1218.

Cingel, A. 2006. Genetička transformacija domaćih sorti krompira (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragačevka i cv. Jelica) orizacistatinskim genima (*OCI* i *OCII*). Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Cingel A, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Miljuš-Đukić J, Ninković S. 2009. Efikasna regeneracija domaćih sorti krompira (*Solanum tuberosum* L.- Dragačevka i Jelica) u kulturi *in vitro*. *J. Sci. Agric. Res.* 70(2), 5-14.

Cingel A, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Čalić-Dragosavac D, Smigočki A, Ninković S. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragačevka and cv. Jelica). *Afr. J. Biotechnol.* (9) 30: 4644-4650.

Cipriani G, Fuentes S, Bello V, Salazar LF, Ghislain M, Zhang DP. 2001. Transgene Expression of Rice Cysteine Proteinase Inhibitors for the Development of Resistance against Sweetpotato Feathery Mottle Virus. CIP Program Report 1999 – 2000, 267-271

Cipriani G, Michaud D, Brunelle F, Golmirzaie A, Zhang DP. 1999. CIP Program Report 1997-98, 1999, 271-277.

Cloutier C, Boudreault S, Michaud D. 2008. Impact de pommes de terre résistantes au doryphore sur les arthropodes non visés: une meta-analyse des facteurs possiblement en cause dans l'échec d'une plante transgénique Bt. *Cahiers Agriculture* 17, 388–394.

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. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 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. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 69-81.

- Colella R, Sakaguchi Y, Nagase H, Bird JWC. 1989. Chicken egg white cystatin. *J. Biol. Chem.* 264, 17164-17117.
- Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, Carre C, Noselli S, Leopold P. 2005. Antagonistic actions of Ecdysone and Insulins determine final size in *Drosophila*. *Science*, DOI: 10.1126/science.1119432
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Leopold P. 2003. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114, 739–749.
- Conner AJ, Christey MC. 1994. Plant breeding and seed marketing options for the introduction of transgenic insect-resistant crops. *Biocontrol Sci. Technol.* 4, 463–473.
- Conner AJ, Jacobs JME. 1999. Genetic engineering of crops as a potential source of genetic hazard in the human diet. *Mut. Res.* 443, 223–234.
- Conner AJ, Williams MK, Abernethy DJ, Fletcher PJ, Genet RA. 1994. Field performance of transgenic potatoes. *N. Z. J. Crop. Hortic. Sci.* 22, 361-371.
- Conner AJ, Williams MK, Gardner RC, Derolles SC, Shaw ML, Lancaster JE. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation of New Zealand potato cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19, 1–8.
- Conner AJ. 1986. Isolation and characterisation of variants from plant cell culture. *NZ J. Technol.* 83–94.
- Conner AJ. 2007. Field-testing of transgenic potatoes. In *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Edited by: Vreugdenhil D. Amsterdam: Elsevier; 687-703.
- Coombs JJ, Douches DS, Li WB, Grafius EJ, Pett WL. 2002. Combining engineered (*Bt-cry3A*) and natural resistance mechanisms in potato (*Solanum tuberosum* L.) for control of the Colorado potato beetle. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127, 62–68.

Cooper SG, Douches DS, Grafius EJ. 2004. Combining genetic engineering and traditional breeding to provide durable resistance in potatoes to Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112, 37–46.

Cooper SG, Douches DS, Zarka K, Grafius EJ. 2009. Enhanced resistance to control potato tuberworm by combining engineered resistance, Avidin, and natural resistance derived from *Solanum chacoense*. *Am. J. Pot. Res.* 86, 24–30.

Corbin DR, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Greenplate JT, Purcell JP. 2001. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 126, 1116-1128.

Corre-Menguy F, Cejudo FJ, Mazubert C, Vidal J, Lelandais-Briere C, Torres G, Rode A, Hartmann C. 2002. Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development, *Plant Mol. Biol.* 50, 687-698.

Cowgill SE, Atkinson HJ. 2003. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on non-target herbivorous insects. *Transgenic Res.* 12, 439–449.

Cowgill SE, Wright C, Atkinson HJ. 2002. Transgenic potatoes with enhanced levels of nematode resistance do not have altered susceptibility to non-target aphids. *Mol. Ecol.* 11, 821–827.

Cowgill SE, Danks C, Atkinson HJ. 2004. Multitrophic interactions involving genetically modified potatoes, nontarget aphids, natural enemies and hyperparasitoids. *Mol. Ecol.* 13, 639–647.

Craig W, Tepfer M, Degrassi G, Ripandelli D. 2008. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Euphytica* 164, 853–880.

Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH.

2007. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.

http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/

Crothers L. 2006. Agricultural biotechnology annual report 2006. GAIN Report. <http://www.fas.usda.gov/gainfiles/200606/146198091.doc>

Czalpa TH, Lang BA. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 83, 2480-2485.

Dafny-Yelin M, Tzfira T. 2007. Delivery of Multiple Transgenes to Plant Cells. *Plant Physiol.* 145, 1118–1128.

Dale PJ, McPartlan HC. 1992. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor. Appl. Genet.* 84, 585-591.

Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, Turner JC. 1998. Cotransformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17, 489–496.

Danilova SA, Dolgikh YI. 2004. The Stimulatory Effect of the Antibiotic Cefotaxime on Plant Regeneration in Maize Tissue Culture. *Russian J. Plant Physiol.* 51, 559–562.

Darbani B, Eimanifar A, Stewart Jr CN, Camargo WN. 2007. Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnol. J.* 2, 83–90.

Datta K, Baisakh N, Maung Thet K, Tu J, Datta S. 2002. Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1–8.

Daveya M R, Anthonya P, Powera JB, Loweb KC. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 23, 131–171.

Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF. 2003. Critical weight in the development of insect body size. *Evol. & Dev.* 5, 188–197.

Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF. 2004. The effects of environmental variation on a mechanism that controls insect body size. *Ecol. Evol. Res.* 6, 49–62.

Davidowitz G, Nijhout HF. 2004. The physiological basis of reaction norms: Where developmental rate and duration of development connect. *Integ. Comp. Biol.* 44, 443-449.

Davidson MM, Jacobs JME, Reader JK, Butler RC, Frater CM, Markwick NP, Wratten SD, Conner AJ. 2002a. Development and evaluation of potatoes transgenic for a cry1Ac9 gene conferring resistance to potato tuber moth. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 127, 590-596.

Davidson MM, Takla MFG, Reader JK, Butler RC, Wratten SD, Conner AJ. 2002b. Evaluation of field grown potato lines transgenic for a cry1Ac9 gene conferring resistance to potato tuber moth. *N. Z. Plant Prot.* 55, 405-410.

Davidson MM, Takla MFG, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD, Conner AJ. 2004. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars with a cry1Ac9 gene confers resistance to potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*). *NZ J. Crop Hortic. Sci.* 32, 39–50.

De Block M, Debrouwer D. 1991. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus. *Theor. Appl. Genet.* 82, 257-263.

De Block M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 76,767-774.

De Bruxelles GL, Roberts MR. 2001. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20, 487-521.

De Buck S, De-Wilde C, Van Montagu M, Depicker A. 2000. Determination of the T-DNA transfer and the T-DNA integration frequencies upon cocultivation of *Arabidopsis thaliana* root explants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 658-665.

De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 449–457.

- De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. 1999. The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J.* 20, 295–304.
- De Buck S, Podevin N, Nolf J, Jacobs Anni, Depicker A. 2009. The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. *The Plant J.* 60, 134–145.
- De Garcia E, Martinez S. 1995. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from stem nodal sections. *J.Plant Physiol.*145, 526–530.
- De Leo F, Bonade-Bottino M, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L. 2001. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochem. Mol. Bio.* 31, 593–602.
- De Leo F, Bonade-Bottino MA, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L. 1998. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiol.* 118, 997–1004.
- De Leo F, Gallerani R. 2002. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. *Insect Biochem. Mol. Bio.* 32, 489–496.
- 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. *Nucl. Acids Res.* 30, 347-348.
- De Luca V, St Pierre B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5, 168-173.
- De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410, 577–80.
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. 1997. T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs, *Plant J.* 11, 15-/29.

De Sousa-Majer MJ, Hardie DC, Turner NC, Higgins TJV. 2007. Bean α -amylase inhibitors in transgenic peas inhibit development of pea weevil larvae. *J. Econ. Entomol.* 100, 1416- 1422.

De Turck S, Giordanengo P, Cherqui A, Ducrocq-Assaf C, Sangwan-Norreel BS. 2002. Transgenic potato plants expressing the nptII-gus marker genes affect survival and development of the Colorado potato beetle. *Plant Sci.* 162, 373–380.

De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, Van Der Meer I, Ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat. Biotechnol.* 21, 439–442.

De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ. 2005. Signal Signature and Transcriptome Changes of *Arabidopsis* During Pathogen and Insect Attack. *MPMI* 18(9), 923–937.

De Wide J, Hsiao TH. 1981. Geographic diversity of the Colorado potato beetle and its infestation in Eurasia. Pp 47-68 in *Advances in Potato Pest Management*, ed. JH Lashomb and R Casagrande. Hutchinson Ross Publ. Co., Stroutsburg, Penna.

Deka S, Barthakur S. 2010. Overview on current status of biotechnological interventions on yellow stem borer *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Crambidae) resistance in rice. *Biotechnol.ogy. Adv.* 28, 70–81.

Delledonne 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. *Mol. Breed.* 7, 35-42.

Demirevska K, Simova-Stoilova L, Fedina I, Georgieva K, Kunert K. 2010. Response of Oryzacystatin I Transformed Tobacco Plants to Drought, Heat and Light Stress. *J. Agronomy & Crop Science* 196, 90–99.

- Denis M, Renard M, Krebbers E. 1995. Isolation of homozygous transgenic *Brassica napus* lines carrying a seed-specific chimeric 2S albumin gene and determination of linkage relationships. *Mol. Breeding* 1, 143-153.
- Depicker A, Herman L, Jacobs A, Schell J, Van Montagu M. 1985. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol. Gen. Genet.* 201, 477-484.
- Deryabin AN, Trunova TI, Dubinina IM, Burakhanova EA, Sabelnikova EP, Krylova EM, Romanov GA. 2003. Chilling Tolerance of Potato Plants Transformed with a Yeast-Derived Invertase Gene under the Control of the B33 Patatin Promoter. *Russian J. Plant Physiol.* 50 (4), 449-454.
- Dicke M, Agrawal AA, Bruin J. 2003. Plants talk, but are they deaf? *Trends. Plant Sci.* 8, 403-405.
- Dicke M, van Loon JJA. 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.* 97, 237-49.
- Dietz-Pfeilstetter A. 2010. Stability of transgene expression as a challenge for genetic engineering. *Plant Sci.* 179, 164-167.
- Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB, White FF, Wang X, Morgan TD, Kramer KJ, Muthukrishnan S. 1998a. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res.* 7, 77-84.
- Ding LC, Hu CY, Yeh KW, Wang PJ. 1998b. Development of insect-resistant transgenic cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from local sweet potato. *Plant Cell Rep.* 17, 854-860.
- Diop NN, Kidric M, Repellin A, Gareil M, d’Arcy-Lameta A, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y. 2004. A multicycstatin is induced by droughtstress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves, *FEBS Lett.* 577, 545-550.

- Dixon RA, Maxwell CA, Weiting N, Oommen A, Paiva NL. 1994. Genetic manipulation of lignin and phenylpropanoid compounds involved in interactions with microorganisms, in: B.E. Ellis, G.W. Kuroki, H.A. Stafford (Eds.) Recent Advances in Phytochemistry, Plenum Press, New York, pp. 153-178.
- Doreste V, Ramos PL, Enriquez GA, Rodriguez R, Peral R, Pujol M. 2002. Transgenic potato plants expressing the potato virus X (PVX) coat protein gene developed resistance to the viral infection. *Phytoparasitica* 30, 1-9.
- Doshi KM, Eudes E, Laroche A, Gaudet D. 2007. Anthocyanin expression in marker free transgenic wheat and triticale embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43, 429–435.
- Douches DS, Li W, Zarka K, Coombs J, Pett W, Grafius E, El-Nasr T. 2002. Development of Bt-cry5 insect-resistant potato lines ‘Spunta-G2’ and ‘Spunta-G3’. *HortSci.* 37, 1103–1107.
- Douches DS, Westedt AL, Zarka K, Schroeter B, Grafius E. 1998a. Transformation of *Cry V-Bt* transgene combined with natural resistance mechanisms for resistance to tuber moth in potato (*Solanum tuberosum* L.). *HortSci* 33(6), 1063-1056.
- Douches DS, Westedt AL, Zarka K, Schroeter B, Grafius EJ. 1998b. Potato transformation to combine natural and engineered resistance for controlling tuber moth. *Hort. Science* 33, 1053–1056.
- Douglas E, Halpin C. 2010. Gene stacking. In: *Molecular techniques in crop improvement*, 2nd edn. Springer, The Netherlands, pp 613–629
- Down RE, Gatehouse AMR, Hamilton WDO, Gatehouse JA. 1996. Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *J. Insect Physiol.* 42, 1035–1045.
- 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 Biotechnol.* 14, 494-498.

- Ducreux LJ, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, Millam S, Taylor MA. 2005a. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. *J. Exp. Bot.* 56, 81–89.
- Ducreux LJ, Morris WL, Taylor MA, Millam S. 2005b. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum phureja*. *Plant Cell. Rep.* 24, 10–14.
- 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. *PNAS Early Edition*. doi/10.1073/pnas.1009241107.
- Dutt M, Li ZT, Dhekney SA, Gray DJ. 2008. A co-transformation system to produce transgenic grapevines free of marker genes. *Plant Sci.* 175, 423–430.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M. 1997. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6, 2117-2121.
- Ehrenfeld N, Romano E, Serrano C, Arce-Johnson P. 2004. Replicase-mediated resistance against potato leafroll virus in potato Desiree plants. *Biol. Res.* 37, 71-82.
- Eisemann CH, Donaldson RA, Pearson RD, Cadagon LC, Vuocolo T, Tellam RL. 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: Mechanism of action. *Entomol. Exp. Appl.* 72, 1-11.
- El-Kharbotly A, Jacobs JME, Te Lintel Hekkert B, Jacobsen E, Ramanna MS, Stiekema WJ, Pereira A. 1996. Localization of Ds-transposon containing T-DNA inserts in the diploid transgenic potato: linkage to the R1 resistance gene against *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Genome* 39, 249–257.
- Elmayan T, Vaucheret H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* 9, 787-797.
- Eltayeb AE, Yamamoto S, Eltayeb Habora ME, Yin L, Tsujimoto H, Tanaka K. 2010. Transgenic potato overexpressing Arabidopsis cytosolic AtDHAR1 showed higher tolerance to herbicide, drought and salt stresses. *Breed. Sci.* 61, 3–10.

Estrada MA., Zarka K, Cooper S, Coombs J, Douches DS. 2007. Potato Tuberworm (Lepidoptera: Gelichiidae) Resistance in Potato Lines with the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac Gene and Natural Resistance. HortSci. 42(5), 1306–1311.

Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW, Kroziel MG. 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. Nature Biotechnol. 15,137–141.

Estruch JJ, Waren GW, Mullis MA, Nye GJ, Craing JA, Koziel MG. 1996. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. P. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5389-5394.

Evans DA, Sharp WR. 1988. Somaclonal and gametoclonal variation. In Handbook of Plant Cell Culture. Volume 4. Edited by: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV. New York: Macmillan Publishing Company; 97-132.

Evans DA. 1989. Somaclonal variation: genetic basis and breeding applications. Trend. Gen. 5, 46-50.

Faccioli G. 2001. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. In: Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Seed-potatoes. (G. Loebenstein, P.H. Berger, A.A. Brunt, R.G. Lawson, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, 365–390.

Faize M, Burgos L , Faize L, Piqueras A, Nicolas E, Barba-Espin G, Clemente-Moreno MJ, Alcobendas R, Artlip T, Hernandez JA. 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. J.Exp. Bot. 1-15.

Fang HJ, Li DL, Wang GL, Li YH. 1997. An insectresistant transgenic cabbage plant with the cowpea trypsin inhibitor (CpTi) gene. Acta Bot. Sin. 39, 940-945.

Fang J, Xu X, Wang P, Zhao J-Z, Shelton AM, Cheng J, Feng M-G, Shen Z. 2007. Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. Appl. Environ. Microbiol. 73, 956–961.

Fang RX, Nagy F, Sivasubramaniam S, Chua NH. 1989. Multiple *cis* regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* 1, 141–150.

FAOSTAT data, 2006. <http://faostat.fao.org>

Felcher K, Douches D, Kirk W, Hammerschmidt R, Li W. 2003. Expression of a fungal glucose oxidase gene in three potato cultivars with different susceptibility to late blight (*Phytophthora infestans* Mont. deBary). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(2), 238–245

Feldmann KA. 1991. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J.* 1, 71-82.

Fernandes KVS, Sabeli PA, Barrat P, Richardson M, Xavier-Filho J, Shewry R. 1993. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetle is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Mol. Biol.* 23, 215-219.

Ferradini N, Nicolìa A, Capomaccio S, Veronesi F, Rosellini D. 2011a. Assessment of simple marker-free genetic transformation techniques in alfalfa. *Plant Cell Rep.* DOI 10.1007/s00299-011-1107-x

Ferradini N, Nicolìa A, Capomaccio S, Veronesi F, Rosellini D. 2011b. A point mutation in the *Medicago sativa* GSA gene provides a novel, efficient, selectable marker for plant genetic engineering. *J. Biotechnol.*, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.08.015.

Ferro DN, Logan JA, Voss RH, Elkinton JS. 1985. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) temperature-dependent growth and feedings rates. *Environ. Entomol.* 14, 343-348.

Ferro DN, Tuttle AF, Weber DC. 1991. Ovipositional and flight behavior of overwintered Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 20, 1309-1314.

Ferry N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. 2004. Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr. Op. Biotechnol.* 15, 1–7.

Ferry N, Jouanin L, Ceci R, Mulligan EA, Emami K, Gatehouse JA, Gatehouse AM. 2005. Impact of oilseed rape expressing the insecticidal serine protease inhibitor, mustard trypsin inhibitor-2 on the beneficial predator *Pterostichus madidus*. *Mol. Ecol.* 14, 337–349.

Ferry N, Raemaekers RJ, Majerus ME, Jouanin L, Port G, Gatehouse JA, Gatehouse AM. 2003. Impact of oilseed rape expressing the insecticidal cysteine protease inhibitor oryzacystatin on the beneficial predator *Harmonia axyridis* (multicoloured Asian ladybeetle). *Mol. Ecol.* 12, 493–504.

Fitches E, Audsley N, Gatehouse JA, Edwards JP. 2002. Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1653–1661.

Fitches E, Edwards MG, Mee C, Grishin E, Gatehouse AMR, Edwards JP, Gatehouse JA. 2004. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxic to insect haemolymph following oral digestion. *J. Insect. Physiol.* 50, 61–71.

Forgash AJ. 1985. Insecticide resistance of the Colorado potato beetle. In *Proc. Symp. on the Colorado potato beetle, 18th Int. Congr. Ent.*, (Eds DN Ferro and RH Voss) Amherst: Mass Agri. Exp. Stn. Res. Bull. 704, pp. 33-52.

Fragoyiannis DA, McKinlay RG, D’Mello JPF. 1998. Studies on the growth, development and reproductive performance of the aphid *Myzus persicae* on artificial diets containing potato glycoalkaloids. *Entom. Exp. Appl.* 88, 59-66.

Frame BR, Drayton PR, Bagnall SV, Lewnau CJ, Bullock WP, Wilson HM, Dunwell JM, Thompson JA, Wang K. 1994. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant J.* 6, 941–948.

Francois I, Willem FB, Bruno PAC. 2002. Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. *Plant Sci.* 163, 281-295.

- Frey M, Stettner C, Pare PW, Schmelz EA, Tumlinson JH, Gierl A. 2000. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 14801-14806.
- Friedman M. 2006. Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. *J.Agr. Food Chem.* 54, 8655-8681.
- Gaddour K, Vicente-Carbojosa J, Lara P, Isabel-Lamoneda I, Diaz I, Carbonero P. 2001. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Mol. Biol.* 45, 599-608.
- Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang JH, Rommens CMT. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18, 1307–1310.
- Gasic K, Hernandez A, Korban SS. 2004. RNA Extraction From Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22, 437a–437g
- Gatehouse AMR, Boulter D, Hilder VA. 1992. In: Gatehouse AMR, Hilder VA, Boulter D (Eds.). *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. CAB International, pp. 155–181.
- Gatehouse AMR, Davison GM, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Burgess EPJ, Gilbert RJC, Gatehouse JA. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: Growth room trials. *Mol. Breed.* 3, 49–63.
- Gatehouse AMR, Davison GM, Stewart JN, Gatehouse LN, Kumar A, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse IA. 1999. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Mysus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. *Mol. Breeding* 5, 153-165.
- Gatehouse AMR, Down RE, Powell KS, Sauvion N, Rahbe Y, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Gatehouse JA. 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 79, 295-307.

- Gatehouse AMR, Fenton KA, Jepson I, Pavey DJ. 1986. The effects of α -amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of α -amylase *in vitro* i effects on development *in vitro*. J. Sci. Food Agric. 35: 373-380.
- Gatehouse AMR, Hilder VA, Powell KS. 1994. Insect resistant transgenic plants; choosing the gene to do the 'job'. Biochem.Soc. Trans. 22, 944–949.
- Gatehouse JA. 1991. Breeding for resistance to insects. In: Murray D.R. (Ed), Advanced methods in plant breeding and biotechnology p.p. 250-276. CAB International, Wallingford UK, 1011-1014.
- Gatehouse JA. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. New Phytol. 156, 145-169.
- Gatehouse JA. 2008. Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. Plant Physiol.146, 881-887.
- Gelvin SB, Kim SI. 2007. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. Biochem. et Biophysica Acta 1769, 410–421.
- Geminard C, Arquier N, Layalle S, Bourouis M, Slaidina M, Delanoue R, Bjordal M, Ohanna M, Ma M, Colombani J, Leopold P. 2006. Control of Metabolism and Growth Through Insulin-Like Peptides in *Drosophila*. Diabetes, 55, Supplement 2.
- Genoud T, Metraux JP. 1999. Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. Trends Plant Sci. 4, 503–507.
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37, 615–636.
- Girard C, Bonade-Bottino M, Pham-Delegue M-H, Jouanin L. 1998. Two strains of cabbage seed weevil (Coleoptera: Curculionidae) exhibit differential susceptibility to a transgenic oilseed rape expressing Oryzacystatin I. J. Insect Physiol. 44, 569–577.

Girard C, Le Metayer M, Bonade-Bottino M, Pham-Delegue MH, Jouanin L. 1998b. High level of resistance to proteinase inhibitors conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 229–237.

Girard C, LeMetayer M, ZaccomerB, Bartlet E, Williams I, Bonade-Bottino M, Pham-DelegueMH, Jouanin L. 1998a. Growth stimulation of beetle larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. *J. Insect Physiol.* 44, 263–270.

Girard C, Rivard D, Kiggundu A, Kunert K, Gleddie SC, Cloutier C, Michaud D. 2007. A multicomponent, elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*, *New Phytol.* 173, 841-851.

Giri AP, Harsulkar AM, Deshpande VV, Sainani MN, Gupta VS, Ranjekar PK. 1998. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol.* 116, 393–401.

Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, Morris BAM. 1999. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: Transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol. Biol.* 40, 223-235.

Goderis IJWM, De Bolle MFC, Francois IEJA, Wouters PFJ, Broekaert WF, Cammue BPA. 2002. A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *Plant Mol. Biol.* 50(1),17-2.

Goldberg RJ, Tjaden G. 1990. Are B.t.t. plants really safe to eat. *Biotechnology* 8, 1011-1014.

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

Gonzalez-Coloma A, Reina M, Cabrera R, Castanera P, Gutierrez C. 1995. Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. *J. Chem. Ecol.* 21(9), 1255-1270.

- Gopal J, Khurana SMP. 2006. Handbook of Potato Production, Improvement, And Postharvest Management Binghamton, NY, USA: Haworth Press, pp 605.
- Gouka R J, Gerk C, Hooykaas PJJ, Bundok P, Musters W, Verrips CT, de Groot MJ. 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens* mediated homologous recombination. Nat. Biotech. 17, 598–601.
- Goulet C, Benchabane M, Anguenot R, Brunelle F, Khalf M, Michaud D. 2010. A companion protease inhibitor for the protection of cytosol-targeted recombinant proteins in plants. Plant Biotechnol. J. 8(2), 142-54.
- Goulet M-C, Dallaire C, Vaillancourt L-P, Khalf M, Badri MA, Preradov A, Duceppe M-O, Goulet C, Cloutier C, Michaud D. 2008. Tailoring the specificity of a plant cystatin toward herbivorous insect digestive cysteine proteases by single mutations at positively selected amino acid sites. Plant Physiol. 146, 1010–1019.
- Graham J, Gordon SC, Nicol RJ. 1997. The effect of the CpTi gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus* F. Coleoptera: Curculionidae). Ann. Appl. Bot. 131, 133-139.
- Graham J, Gordon SC, Smith K, McNicol RJ, McNicol JW. 2002. The effect of the cowpea trypsin inhibitor in strawberry on damage by vine weevil under field conditions. J. Hort. Sci. Biotechnol. 77, 33–40.
- Graham JS, Ryan CA. 1981. Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1164-1170.
- Grandbastien MA. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trend Plant Sci. 3, 181–187.
- Green J, Wang D, Lilley CJ, Urwin PE, Atkinson HJ. 2012. Transgenic Potatoes for Potato Cyst Nematode Control Can Replace Pesticide Use without Impact on Soil Quality. PLoS ONE 7(2), e30973. doi:10.1371/journal.pone.0030973

Green TR, Ryan CA. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175, 776–777.

Greenstone MH, Szendrei Z, Payton ME, Rowley DL, Coudron TC, Weber DC. 2010. Choosing natural enemies for conservation biological control: use of the prey detectability half-life to rank key predators of Colorado potato beetle. *Entom. Exp. Appl.* 136(1), 97–107.

Grevelding C, Fantes V, Kemper E, Schell J, Masterson R. 1993. Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Mol. Biol.* 23, 847-860.

Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijerinck AGM. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotech.* 16, 839–842.

Gruden K, Kuipers AG, Guncar G, Slapar N, Strukelj B, Jongsma MA. 2004. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34(4), 365-75.

Gruden K, Popovic T, Cimerman N, Krizaj I, Strukelj B. 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defence mechanism. *Biol. Chem.* 384(2), 305-10.

Gruden K, Strukelj B, Popovic T, Lenarcic B, Bevec T, Brzin T, Kregar I, Herzog-Velikonja J, Stiekema WJ, Bosch D, Jongsma MA. 1998. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 549–560.

Gruden K, Strukelj B, Ravnkar M, Poljsak-Prijatelj M. 1997. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterisation and immunocytochemical localisation studies. *Plant Mol. Biol.* 34, 317-323.

Guerrero C, de la Calle M, Reid MS, Valpuesta V. 1998. Analysis of the expression of two thiolproteinase genes from daylily (*Hemerocallis* spp.) during flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 36, 565–571.

- Gunter C, Gonzalez A, Reis RD, Gonzalez G, Vazquez A, Ferreira F, Moyna P. 1997. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. J. Chem. Ecol. 23, 1651-1659.
- Guo J, Zhu X, Guo W, Zhang T. 2007. Inheritance analysis and resistance of the transgenic cotton harboring Bt + sck double genes to *Helicoverpa armigera*. Cotton Sci. 19, 88–92.
- Guo WL, Wu R, Zhang YF, Liu XM, Wang HY, Gong L, Zhang ZH, Liu B. 2007. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. Plant Cell Rep. 26, 1297–1307.
- Gustafson V, Mallubhotla S, MacDonnell J, Sanyal-Bagchi M, Chakravarty B, G Wang-Pruski, Rothwell C, Audy P, De Koeyer D, Siahbazi M, Flinn B, Regan S. 2006. Transformation and regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L cv. 'Shepody'. Plant Cell Tissue Org. Cult. 85, 361-366.
- Gutierrez C, García-Casado G, Sanchez-Monge R, Gomez L, Castanera P, Salcedo G. 1993. Three inhibitor types from wheat endosperm are differentially active against α -amilases of Lepidoptera pests. Entomol. Exp. Appl. 66, 47-52.
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Perez-Martinez JDJ, Gomez-Lim MA. 2001. Pleiotropic effects in transgenic tobacco plants expressing oryzacystatin I gene. HortSci. 36, 118–119.
- 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 Biotech. 17, 1223-1226.
- Habib H, Khalid MF. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2 (3), 68-85.
- Hagh ZG, Rahnama H, Panahandeh J, Rouz BBK, Jafari KMA, Manha N. 2009. Green-tissue-specific, C4-PEPC-promoter driven expression of Cry1Ab makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea operculella*, Zeller). Plant Cell. Rep. 28, 1869–1879.

- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994.
- Halitschke R, Schittko U, Pohnert G, Boland W, Baldwin IT. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty Acid-Amino Acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiol.* 125, 711-717.
- Halpin C, Barakate A, Askari BM, Abbott JC, Ryan MD. 2001. Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways. *Plant Mol. Biol.* 47, 295-310.
- Halpin C, Boerjan W. 2003. Stacking transgenes in forest trees. *Trends Plant Sci.* 8, 363-365.
- Halpin C. 2005. Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* 3, 141-155.
- Halterman DA, Kramer LC, Wielgus S, Jiang J. 2008. Performance of transgenic potato containing the late blight resistance gene *RB*. *Plant Dis.* 92, 339-343.
- Han L, Wu K, Peng Y, Wang F, Guo Y. 2007. Efficacy of transgenic rice expressing Cry1Ac and CpTI against the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee). *J. Invertebr. Pathol.* 96, 71-79.
- Han LZ, Wu KM, Peng YF, Wang F, Guo YY. 2006. Evaluation of transgenic rice expressing Cry1Ac and CpTI against *Chilo suppressalis* and intrapopulation variation in susceptibility to Cry1Ac. *Environ. Entomol.* 35, 1453-1459.
- Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J, Tanaka I. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42, 523-528.
- Hanisch Ten Cate CH, Ramulu KS. 1987. Callus growth, tumour development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar Bintje. *Plant Science* 49, 209-216.
- Hanneman, R E. 1989. The potato germplasm resource. *Amer. Potato J.* 66, 655-667.

- Hansen G, Wright MS. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4, 226–231.
- Hansen J, Nielsen B, S Nielsen VS. 1999. *In vitro* shoot regeneration of *Solanum tuberosum tuberosum* cultivars: interactions of medium composition and leaf, leaflet, and explant position. *Potato Res.* 42, 141-151.
- Haq SK, S Atif M, Khan RH. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Bioph.* 431, 145–159.
- Hare JD. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 81-100.
- Hare PD, Chua NH. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 20, 575–580.
- Hass GM, CA Ryan. 1980. Carboxypeptidase inhibitor from ripened tomatoes: purification and properties. *Phytochemistry* 19, 1329-1333.
- Hass GM, CA Ryan. 1983. Carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Methods Enzymol* 80, 778-791.
- Hassairi A., Masmoudi K, Alboui J, Robaglia C, Jullien M, Ellouz R. 1998. Transformation of two potato cultivars 'Spunta' and 'Claustar' (*Solanum tuberosum*) with lettuce mosaic virus coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. *Plant Sci. Limerick* 136, 31-42.
- Hawkes JG. 1990. *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Hawkes JG. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: *Potato Genetics*, edited by Bradshaw JE & Mackay GR, CAB International ISBN 085198 869 5.

- Heeres P, Schippers-Rozenboom M, Jacobsen E, Visser R. 2006. Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica* 124, 13-22.
- Hegedus D, O'Grady M, Chamankhah M, Baldwin D, Gleddie S, Braun L, Erlandson M. 2002. Changes in cysteine protease activity and localization during midgut metamorphosis in the crucifer root maggot (*Delia radicum*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1585–1596.
- Hemavathi, Upadhyaya CP, Akula N, Kim HS, Jeon JH, Ho OM, Chun SC, Kim DH, Park SW. 2011. Biochemical analysis of enhanced tolerance in transgenic potato plants overexpressing D-galacturonic acid reductase gene in response to various abiotic stresses. *Mol. Breed.* 28, 105–115.
- Hemavathi, Upadhyaya CP, Akula N, Young KE, Chun SC, Kim DH, Park SW. 2010. Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnol. Lett.* 32, 321–330.
- Hemavathi, Upadhyaya CP, Ko EY, Nookaraju A, Kim HS, Heung JJ, Oh MO, Reddy AC, Chun SC, Kim DH, Park SW. 2009. Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Sci.* 177, 659–667.
- Herde O Cortes HP, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J. 1999. Electric signaling and *Pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol.* 119, 213–18.
- Hermesen JGT. 1984. Nature, evolution and breeding of polyploids. *Iowa State J. Res.* 58, 411-412.
- Herrera-Estrella L, Block MD, Messens E, Hernalsteens JP, Montagu MV, Schell J 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.*, 2, 987-995.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J. 1982. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnol.* 24, 377–381.

- Hiatt AC, Cafferkey R, Bowdish K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants, *Nature* 342, 76-78.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Baker RF, Boulter D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330, 160–163.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Boulter D. 1992. Transgenic plants conferring insect tolerance: protease inhibitor approach. In: *Transgenic Plants*, S. Kung and R. Wu (eds), pp. 310-338. Academic Press, New York, USA.
- Hilder VA, Powell KS, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Gatehouse LN, Shi Y, Hamilton WDO, Merryweather A, Newell CA, Timans JC, Peumans WJ, van Damme E, Boulter D. 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res.* 4, 18-25.
- Hildmann, T., Ebneith, M., Pena-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J.L., Willmitzer, L., 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157-1170
- Hinks CF, Hupka D, 1995. The effects of feeding leaf sap from oats and wheat, with and without soybean trypsin inhibitor, on feeding behaviour and digestive physiology of adult males of *Melanoplus sanguinipes*. *J. Insect Physiol.* 41, 1007–1015.
- Hirashiki I, Ogata F, Yoshida N, Makisumi S, Ito A. 1990. Purification and complex formation analysis of cysteine proeinase inhibitor (Cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. *J. Biochem.* 108, 604-608.
- Hird DL, Paul W, Hollyoak JS, Scott RJ. 2000. The restoration of fertility in male sterile tobacco demonstrates that transgene silencing can be mediated by T-DNA that has no DNA homology to the silenced transgene. *Transgen. Res.* 9, 91-102.
- Hobbs SLA, Warkentin TD, DeLong CMO. 1993. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.* 21, 17–26.

- Hoekema A, Huisman M, Molendijk L, Elzen van den P, Cornelissen B. 1989. The genetic engineer of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *Bio/Technology* 7, 273–278.
- Hohn B, Levy AA, Puchta H. 2001. Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 139–143.
- Holm PB, Olsen O, Schnorf M, Brinch-Pedersen H, Knudsen S. 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res.* 9, 21–32.
- Honee G. 1999. Engineered resistance against fungal plant pathogens. *Eur. J. Plant Path.* 105, 319–326.
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A and Hoffman N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223, 496–498.
- Hossain MA, Maiti MK, Basu A, Sen S, Ghosh AK, Sen SK. 2006. Transgenic expression of onion leaf lectin gene in Indian mustard offers protection against aphid colonization. *Crop Sci.* 46, 2022–2032.
- Hsiao TH. 1981. Ecophysiological adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle. North America. *Advances in Potato Pest Management*, ed. Lashomb JH and Casagrande R. Hutchinson Ross Publ. Co, Stoutsburg Penna, 68–85.
- Hsiao TH. 1985. Ecophysiological and genetic aspects of geographic variation of the Colorado potato beetle. Pp 63–78 in *Proceedings of the symposium on the Colorado potato beetle, XVIIth International Congress of Entomology*, ed. DN Ferro and RH Voss. Res. Bull. 704, Mass. Agric. Expt. Sta., Amherst, Mass.
- 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, 965–967.
- Huang Y, Xiao B, Xiong L. 2007. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta* 226, 73–85.

Hussain IA, Muhammad H, Rashid Z, Chaudhry SM, Saqlan N, Asghar R. 2005. Morphogenic potential of three potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from diverse explants a prerequisite in genetic manipulation Pak. J. Botany 37 (4), 889-898.

Hussey G, Stacey NJ. 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 48, 787-796.

Iapichino G, Lee SP, Chen THH, Fuchigami LH. 1991. *In vitro* plant regeneration in *Solanum commersonii*. *J. Plant Physiol.* 137, 734-738.

Ichikawa T, Nakazawa M, Muto S, Gohda K, Suzuki K, Ishikawa A, Kobayashi H, Yoshizumi T, Tsumoto Y, Tsuchihara Y, Lizumi H., Goto Y, Matsui M. 200). Sequence database of 1172 T-DNA insertion sites in *Arabidopsis* activation-tagging lines that showed phenotypes in T1 generation. *Plant J.*36, 421-429.

Ignacimuthu S, Arockiasamy S. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of an elite indica rice for insect resistance. *Curr Sci.* 90, 829-835.

Imai T, Aida R, Ishige T. 1993. High frequency of tetraploidy in *Agrobacterium*-mediated transformants regenerated from tuber discs of diploid potato lines. *Plant Cell Rep.* 12, 299-302.

Inagana H, Kobayasi D, Kouzuma Y, Aoki-Yasunaga C, Iryama K, Kimura M. 2001. Protein engineering of novel proteinase inhibitors and their effects on the growth of *Spodoptera exigua* larvae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2259–2264.

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 Mol. Biol.* 30, 149-157.

ISAAA. 2010. Global status of commercialized biotech/ GM crops International service for the acquisition of agri-biotech applications. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>.

Ishimoto M, Chrispeels MJ. 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of alpha-amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiol.* 111, 393–401.

- Izumi S, Yano K, Yamamoto Y, Takahashi SY. 1994. Yolk proteins from insect eggs: Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.* 40, 735–746.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leak R, Schell J, Mass C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinational expression of different barley anti-fungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109.
- Jacinto T, Fernandes KVS, Machado OLT, Siqueira-Junior CL. 1998. Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin accumulate high levels of cystatin, *Plant Sci.* 138, 35-42.
- Jacobs JME, Takla MFG, Docherty LC, Frater CM, Markwick NP, Meiyalaghan S, Conner AJ. 2009. Potato transformation with modified nucleotide sequences of the cry9Aa2 gene improves resistance to potato tuber moth. *Potato Res.* 52, 367–378.
- Jacobs JME, van Eck HJ, Arens P, Verkerk-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastiaanssen HJM, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ. 1995. A genetic map of potato (*S. tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor. Appl. Genet.* 91, 289–300.
- James C. 2007. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2007. ISAAA Brief 37: Executive Summary.
- Jansky S. 2000. Breeding for disease resistance in potato. *Plant Breed. Rev.* 19, 69-155.
- Jarret RL, Hasegawa PM, Erickson HT. 1980. Effect of medium components on shoot formation from cultured tuber discs of potato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105, 238-242.
- JayaSree T, Pavan U, Ramesh M, Rao AV, Reddy KJM, Sadanandam A. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tiss. Org.* 64, 13–17.
- Jeong DH, An S, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An G. 2002. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol.* 130(4), 1636-1644.

- Jeong MJ, Park SC, Byun MO. 2001. Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene transfer. *Molecules and Cells*, 12, 185–189.
- Jermy T. 1980. The introduction of *Perillus bioculatus* into Europe to control the Colorado beetle Bull. OEPP/EPPO Bull. 10, 475-479.
- Jha S, Chattoo BB. 2009. Transgene stacking and coordinated expression of plant defensins confer fungal resistance in rice. *Rice* 2(4), 143-154.
- Jia H, Liao M, Verbelen J-P, Vissenberg K. 2007. Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. *Plant Cell Rep.* 26, 1961–1965.
- Jobling SA, Westcott RJ, Tayal A, Jeffcoat R, Schwall GP. 2002. Production of a freeze–thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nat. Biotechnol.* 20, 295–299.
- Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuisson J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V. 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet.* 5, e1000530
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9871-9875.
- Johnston KA, Gatehouse JA, Anstee JH. 1993. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *J Insect Physiol.* 39, 657–664.
- Jones-Villeneuve E, Huang B, Prudhome I, Bird S, Kemble R, Hattori J, Miki B. 1995. Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 40, 97–100.

Jongedijk E, de Schutter AAJM, Stolte T, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Biotechnology*, 10, 422-429.

Jongedijk E, Tigelaar H, van Roekel JSC, Bres-Vloemans SA, Dekker I, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC, Melchers LS. 1995. Synergistic activity of chitinases and beta-1, 3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica* 85, 173-180.

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. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8041–8045.

Jongsma MA, Bolter C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 885-895.

Joshi B, Sainani M, Bastwade K, Gupta VS, Ranjekar PK. 1998. Cysteine Protease inhibitor from Pearl Millet: A new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 382–387.

Jouanin L, Laberche JC, Giordanengo P, Saguez J, Cherqui A, Lehraiki S, Vincent C, Beaujean A. 2010. Effects of mti-2 Transgenic Potato Plants on the Aphid *Myzus persicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). *Inter. J. Agron.* doi:10.1155/2010/653431

Kaepler SM, Phillips RL. 2000. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8773–8776.

Kaethner M. 1992. Fitness reduction and mortality effects of neem-based pesticides on the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Appl. Ent.* 113, 456-465.

Kaiser J. 2000. Panel urges further study of biotech corn. *Science* 290, 1867.

Kaniewski W, Lawson C, Sammons B, Haley L, Hart J, Delannay X, Tumer NE. 1990. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus-X and potato virus-Y. *Bio/Technology* 8, 750–754.

- Kaniewski W, Thomas PE. 2004. The potato story. *AgBioForum* 7, 41–46.
- Karp A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 7, 1-58.
- Kato H, Shintani A, Minamikawa T. 1999. The structure and organization of two cysteine endopeptidase genes from rice. *Plant Cell Physiol.* 40, 462–467.
- Kawchuk LM. 2002. Potato transformation produces value-added traits. In: Khachatourians GG, McHughen A, Scorza R, Nip W-K, Hui YH (eds) *Transgenic plants and crops*. Dekker, New York, pp 673–697.
- Kazan K, Manners JM. 2008. Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol.* 146, 1459–1468.
- Keil M, Sanchez-Serrano J, Schell J, Willmitzer L. 1990. Localization of elements important for the wound-inducible expression of a chimeric potato proteinase inhibitor II-CAT gene in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 2, 61-70.
- Keil M, Sanchez-Serrano J, Willmitzer L. 1989. Both woundinducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8, 1323-1330.
- Kennedy AR. 1994. Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res.* 54, 1999–2005.
- Kereša S, Grdiša M, Barić M, Igrc-Barčić J, Marchetti S. 2008. Transgenic plants expressing insect resistance genes. *Sjemenarstvo* 25(2), 139-153.
- Kessler A, Baldwin IT. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291, 2141–44.
- Kessler A, Baldwin IT. 2002. Plant responses to insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 299–328.

Khadeeva NV, Kochieva EZ, Yu M, Tcherednitchenko MY, Yu E, Yakovleva EY, Sydoruk KV, Bogush VG, Dunaevsky YE, Belozersky MA. 2009. Use of buckwheat seed protease inhibitor gene for improvement of tobacco and potato plant resistance to biotic stress. *Biochem. (Moscow)* 74, 260–267.

Kiggundu A, Goulet M-C, Goulet C, Dubuc J-F, Rivard D, Benchabane M, Pepin G, van der Vyver C, Kunert K, Michaud D. 2006. Modulating the proteinase inhibitory profile of a plant cystatin by single mutations at positively selected amino acid sites. *Plant J.* 48, 403–413.

Kiggundu A, Muchwezi J, Van der Vyver C, Viljoen A, Vorster, Schluter U, Kunert K, Michaud D. 2010. Deleterious effect of plant cystatins against the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 73(2), 87–105.

Kikuta Y, Okazawa Y. 1982. Shoot-bud formation and plantlet regeneration in potato tuber tissue cultured *in vitro*. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 61, 166-179.

Kimura M, Ikeda T, Fukumoto D, Yamasaki N, Yonekura M. 1995. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). *Biosci Biotechnol Biochem.* 59 (12), 2328-2329.

Klopfenstein NB, Allen KK, Avila FJ, Heuchelin SA, Martinez J, Carman RC, Hall RB, Hart ER, McNabb HS. 1997. Proteinase inhibitor II gene in transgenic poplar: chemical and biological assays. *Biomass & Bioenergy* 12, 299-311.

Kohli A, Leech M, Vain P, Laurie DA, Christou P. 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7203–7208.

Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2, 379-384.

Kollner TG, Held M, Lenk C, Hiltbold I, Turlings TCJ, Gershenzon J, Degenhardt J. 2008. A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*, 20, 482-494.

Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.

Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Korber H, Redei GP, Schell J. 1989. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8467–8471.

Kondo H, Abe K, Nishimura I, Watanabe H, Emori Y, Arai S. 1990. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *J. Biol. Chem.* 265, 15832-15837.

Kondrak M, Kutas J, Szenthe B, Patthy A, Banfalvi Z, Nadasy M, Graf L, Asboth B. 2005. Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. *Biotechnol. Lett.* 27, 829–834.

Konig A. 2003. A framework for designing transgenic crops – science, safety and citizen's concerns. *Nat. Biotechnol.* 21, 1274–1279.

Konrad R, Connor M, Ferry N, Gatehouse AMR, Babendreier D. 2009. Impact of transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin-1 (OC-1) and of insecticidal proteins on longevity and digestive enzymes of the solitary bee *Osmia bicornis*. *J. Insect Physiol.* 55, 305–313.

Konrad R, Ferry N, Gatehouse AMR, Babendreier D. 2008. Potential effects of oilseed rape expressing oryzacystatin-1 (OC-1) and of purified insecticidal proteins on larvae of the solitary bee *Osmia bicornis*. *PLoS ONE* 3, e2664.

Kost C, Heil M. 2006. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defense in neighbouring plants. *J. Ecol.* 94, 619-628.

Kouzuma Y, Kawano K, Kimura M, Yamasaki N, Kadowski T, Yamamoto K. 1996. Purification, characterization and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, Sca i Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *J. Biochem.* 6, 1106-1113.

Kramer KJ, Morgan TD, Throne JE, Dowell FE, Bailey M, Howard JA. 2000. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nat. Biotechnol.* 18, 670-674.

Krattiger AF. 1997. Insect Resistance in Crops: A Case Study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries. ISAAA Briefs No. 2. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 42.

Krizova K, Fojtova M, Depicker A, Kovarik A. 2009. Cell culture induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles. *Plant Physiol.* 149, 1493-1504.

Kubis SE, Castilho AMMF, Vershinin AV, Heslop-Harrison JS. 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol. Biol.* 52, 69-79.

Kuhl JC, Zarka K, Coombs J, Kirk WW, Douches DS. 2007. Late blight resistance of *RB* transgenic potato lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132, 783-789.

Kumar A. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato genotypes. In: Gartland KMA, Davey MR (Eds) *Methods in Molecular Biology* (Vol 44), Humana Press Inc., New York Totowa, pp 121-128.

Kumar GNM, Houtz RL, Knowles NR. 1999. Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. *Plant Physiol.* 119, 89-99.

Kumar M, Chimote V, Singh R, Mishra GP, Naik PS, Pandey SK, Chakrabarti SK. 2010. Development of Bt transgenic potatoes for effective control of potato tuber moth by using cry1Ab gene regulated by GBSS promoter. *Crop Prot.* 29,121-127.

Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1871-1876.

Kunze I, Ebner M, Heim U, Geiger M, Sonnewald U, Herbers K. 2001. 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. *Mol. Breed.* 7, 221-227.

Kurata S, Saito H, Natori S. 1992. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Developmental Biol.* 153, 115–121.

Kurtz RW, McCaffery A, O'Rilley D. 2007. Insect resistance management for sygenta's VipCot transgenic cotton. *J. Inverteb. Pat.* 95, 227-230.

Kusnierczyk A, Winge P, Midelfart H, Armbruster WS, Rossiter JT, Bones AM. 2007. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *J. Exp. Bot.* 58, 2537-2552.

Lacey LA, Horton DR, Chauvin RL, Stocker JM. 1999. Comparative efficacy of *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, and aldicarb for control of Colorado potato beetle in an irrigated desert agroecosystem and their effects on biodiversity. *Entom. Exp. Appl.* 93, 189–200.

Laing WA, McManus MT. 2002. In *Protein Protein interactions in plants*, (McManus MT, Laing WA and Allan AC eds.) Sheffield Academic Press. 7, 77-119.

Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leple JC, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L. 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid-O- methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol.* 119, 153–163.

Larocque AM, Houseman JG. 1990. The effect of ingested soybean, ovomucoid and corn trypsin inhibitor on digestive processes of the European corn borer. *J Insect Physiol* 36, 691–697.

Lashomb JH, Ng YS, Ghidui G, Green E. 1984. Descriptoin of the spring emergence by the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), in New Jersey. *Environ. Entomol.* 12, 907–910.

Latheef MA, Harcourt DG. 1972. A quantitative study of food consumption and growth in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on two host plants. *Can. Entomol.* 104, 1271-1276.

- Lawrence PK, Koundal KR. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. Biotechnol.*, 5(1), 93-109.
- Lawrence SD, Novak NG, Blackburn MB. 2007. Inhibition of Proteinase Inhibitor Transcripts by *Leptinotarsa decemlineata* Regurgitant in *Solanum lycopersicum* J. Chem. Ecol. 33, 1041–1048.
- Lawson C, Kaniewski W, Haley L, Rozman R, Newell C, Sanders P.1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar, resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank potato. *Bio/Technology* 8, 127-134.
- Lawson EC, Weiss JD, Thomas PE, KaniewskiWK. 2001. NewLeaf Plus Russet Burbank potatoes: replicase-mediated resistance to potato leafroll virus. *Mol. Breed.* 7, 1–12.
- Layalle S, Arquier N, Leopold P. 2008. The TOR Pathway Couples Nutrition and Developmental Timing in *Drosophila*. *Develop. Cell* 15, 568–577.
- Lecardonnell A, Chauvin L, Jouanin L, Beaujean A, Prevost G, Sangwan-Norreel B. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.* 140, 87-98.
- Ledoigt G, Griffaut B, Debiton E, Vian C, Mustel A, Evray G, Maurizis JC, Madelmont JC. 2006. Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *Int. J. Biol. Macromols.* 38, 268-271.
- Lee SI, Lee SH, Koo JC, Chun HJ, Lim CO, Mun JH, Song YH, Cho MJ. 1999. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SHTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. *Mol. Breed.* 5, 1-9.
- Leij FR van der, Visser RGF, Oosterhaven K, Kop DAM, Jacobsen E, Feenstra WJ. 1991. Complementation of the amylose-free starch mutant of potato (*Solanum tuberosum*) by the gene encoding granule-bound starch synthase. *Theor. Appl. Gen.* 82, 289-295.
- Lemaux P. 2008. Genetically engineered plants and foods: A scientist's analysis of the issues (Part I). *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 771–812.

Leple JC, Bonade-Bottino M, Augustin S, Pilate G, Le Tan VD, Delplanque A, Cornu D, Jonanin L. 1995. Toxicity of *Chrysomila tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed* 1, 319-328.

Li DH, Fu Q, Wang F, Yao Q, Lai FX, Wu JC, Zhang ZT. 2004a. Resistance of transgenic rice containing both *sck* and *cry1Ac* genes against *Chilo suppressalis* and *Cnaphalocrocis medinalis*. *Chinese J. Rice Sci.* 18, 43–47.

Li FF, Wu SJ, Chen TZ, Zhang J, Wang HH, Guo WZ, Zhang TZ. 2009. *Agrobacterium*-mediated co-transformation of multiple genes in upland cotton. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 97, 225–235

Li G, Xu X, Xing H, Zhu H, Fan Q. 2005. Insect resistance to *Nilaparvata lugens* and *Cnaphalocrocis medinalis* in transgenic indica rice and the inheritance of *gna+sbt1* transgenes. *Pest Manag. Sci.* 61, 390–396.

Li L, Zhou YH, Cheng XF, Sun JY, Marita JM, Ralph J, Chiang VL. 2003. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4939–4944.

Li W, Zarka K, Douches DS, Coombs JJ, Pett WL, Grafius EJ. 1999. Co-expression of potato PVY coat protein gene and *cry V-Bt* genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124(3), 218-223.

Li X, Wang XD, Zhao X, Dutt Y. 2004b. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration. *Plant Cell. Rep.* 22, 691–697.

Li X, Yu X, Wang N, Feng Q, Dong Z, Liu L, Shen J, Liu B. 2007. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90, 153–168.

Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR. 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, 419, 712-715.

- Li YE, Zhu Z, Chen ZX, Wu X, Wang, Li SJ. 1998. Obtaining transgenic cotton plants with c W owpea trypsin inhibitor gene. *Acta Gossyp. Sin.* 10, 237-243.
- Liang C, Brookhart G, Feng GH, Reeck GR, Kramer KJ. 1991. Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *FEBS Lett.* 278, 139-142.
- LianY, Jia ZW, He KL, Liu YJ, Song FP, Wang BM, Wang GY. 2008. Transgenic tobacco plants expressing synthetic *CryIAc* and *CryIIe* genes are more toxic to cotton bollworm than those containing one gene. *Chinese Sci. Bull.* 53(9), 1381-1387.
- Liapkova NS, Loskutova NA, Maisurian AN, Mazin VV, Korableva NP, Platonova TA, Ladyzhenskaia EP, Evsyunina AS. 2001. Isolation of genetically modified potato plant containing the gene of defensive peptide from *Amaranthus* (in Russia). *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 349–354.
- Lilley CJ, Urwin PE, Johnston KA, Atkinson HJ. 2004. Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. *Plant Biotechnol. J.* 2, 3–12.
- Lin L, Liu Y-G, Xu X, Li B. 2003. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *PNAS* 100(10), 5962–5967.
- Lin YH, Li HT, Huang YC, Hsieh YC, Guan HH, Liu MY, Chang T, Wang AHJ, Chen CJ. 2006. Purification, crystallization and preliminary Xray crystallographic analysis of rice Bowman-Birk inhibitor from *Oryza sativa*. *Acta Cryst.* F62, 522-524.
- Linacero R, Freitas-Alves E, Vazques AM. 2000. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. *Theor. Appl. Genet.* 100, 506–511.
- Linsley K, Wei W, Clarke MC, Mcardle HF, Rooke LM, Topping JF. 1993. Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Res.* 2(1), 33-47.

- Linsmaier EM, Skoog F. 1965. Organic growth factor requirement for tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 18, 100-128.
- Liu D, Burton S, Glanc T, Li Z-S, Hampton R, Meade T, Merlo DJ. 2003. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photobacterium luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21, 1222–1228.
- Liu X, Jin W, Liu J, Zhao H, Guo A. 2011. Transformation of wheat with the HMW-GS 1Bx14 gene without markers. *Genetika* 47, 206-212.
- Liu YB, Alford AR, Rajab MS, Bentley MD, 1990, Effects and modes of action of citrus limonoids against *Leptinotarsa decemlineata*. *Physiol. Entomol.* 15, 37-45.
- Liu YF, Wang F, You MS, Wang Q, Hu XQ, Liu WH, Zhao UX. 2005. Resistance of cry1Ac+skk transgenic rice and its filial generation to the rice leaf roller *Cnaphalocrossis medinalis*. *Sci. Agri. Sin.* 38, 725–729.
- Liu Z, Guo WZ, Zhu XF, Zhu Z, Zhang TZ. 2004. Stable inheritance and expression of Bt and GNA resistance genes in transgenic cotton line. *Acta Agron. sin.* 30, 6–10.
- Lorence A, Verpoorte R. 2004. Gene transfer and expression in plants. *Methods Mol. Biol.* 267, 329–350. From: *Methods in Molecular Biology, vol. 267: Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, Second Edition* Edited by: P. Balbás and A. Lorence © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Lorito M, Broadway RM, Hayes CK, Woo SL, Noviello C, Williams DL, Harman GE. 1994. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 525–527.
- Lorito M, Woo SL, Garcia-Fernandez I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7860-7865.
- Lu L, Lei J, Ming S, Li L, Cao B. 2005. Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *African J. Biotechnol.*, 4, 45-49.

Lucker J, Schwab W, van Hautum B, Blaas J, van der Plas LH, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA. 2004. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiol.* 134, 510–519.

Luo M , Wang Z, Li H, Xia KF, Cai Y, Xu ZF. 2009. Overexpression of a Weed (*Solanum americanum*) ProteinaseInhibitor in Transgenic Tobacco Results in Increased GlandularTrichome Density and Enhanced Resistance to *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1896-1910.

Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M. 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, 407, 649-651.

Macedo MLR, Freire MGM. 2011. Insect digestive enzymes as a target for pest control. *Inv. Surv. J.* 8, 190-198.

MacKenzie DJ, Tremaine JH, McPherson J. 1991. Genetically engineered resistance to potato virus-S in potato cultivar Russet Burbank. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 95–102.

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 Rep.* 26, 773–782.

Maleck K, Dietrich RA. 1999. Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4, 215–19.

Malone LA, Burgess EPJ. 2000. Interference of protease inhibitors on non-target organisms. In: Michaud D, ed. *Recombinant protease inhibitors in plants*. Georgetown TX: Landes Bioscience, 89–106.

Malone M, Alarcon JJ. 1995. Only xylem-borne factors can account for systemic wound signalling in the tomato plant. *Planta* 196, 740–46

- Mandal S, Kundu P, Roy B, Mandal RK. 2002. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insectresistant plants. *J. Bio. Chem.* 277, 37161–37168.
- Maniruzzaman ME, Haque MA, Habib MM, Haque S, Chakrabarti K. 2010. *Agrobacterium* Mediated *RB* Gene Transformation into Indian Potato Variety (Kufribahar) for Late Blight Resistance. *Thai J. Agric. Sci.* 43, 183-188.
- Maqbool SB, Christou P. 1999. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol. Breed.* 5, 471–480.
- Maqbool SB, Riazuddin S, Loc NT, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Christou P. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Mol. Breed.* 7, 85–93.
- Marchetti S, Delledonne M, Fogher C, Chiaba C, Chiesa F, Savazzini F, Glordano A. 2000. Soybean Kunitz, C-II and PI-IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* 101, 519-526.
- Mares M, Meloun B, Pavlik M, Kostka V, Baudys M. 1989. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* 251(1-2), 94–98.
- Markwick NP, Docherty LC, Phung MM, Lester MT, Murray C, Ya, J-L, Mitra DS, Cohen D, Beuning LL, Kutty-Amma S, Christeller JT. 2003. Transgenic tobacco and apple plants expressing biotin-binding proteins are resistant to two cosmopolitan insect pests, potato tuber moth and lightbrown apple moth, respectively. *Transgenic Res.* 12, 671-681.
- Markwick NP, Reid SJ, Laing WA, Christeller JT. 1995. Effects of Dietary Protein and Protease Inhibitors on Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econom. Entomol.* 88, 33-39.

- Martinez M, Lopez-Solanilla E, Rodriguez-Palenzuela P, Carbonero P, Diaz I. 2003. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin HvCPI (gene *Icy*) is not associated with its cysteineproteinase inhibitory properties. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 876-883.
- Martines M, Zamira A, Gamabardella M, Echaide M, Carbonero P, Dias I. 2005a. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *J. Exp. Bot.* 56, 1821-1829.
- Martinez M, Rubio-Somoza I, Fuentes R, Lara P, Carbonero P, Diaz I. 2005b. The barley cystatin gene (*Icy*) is regulated by DOF transcription factors in aleurone cells upon germination. *J. Exp. Bot.* 56, 547-556.
- Maruthasalam S, Kalpana K, Kumar KK, Loganathan M, Poovannan K, Raja JA, Kokiladevi E, Samiyappan R, Sudhakar D, Balasubramanian P. 2007. Pyramiding transgenic resistance in elite indica rice cultivars against the sheath blight and bacterial blight. *Plant Cell Rep.* 26(6), 791-804.
- Marvier M, McCreedy C, Regetz J, Kareiva P. 2007. A metaanalysis of effects of Bt cotton and maize on non-target invertebrates. *Science* 316, 1475–1477.
- Masoud SA, Johnson LB, White FF, Reeck GR. 1993. Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I) in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 21, 655–663.
- Massonneau A, Condamine P, Wisniewski JP, Zivy M, Rogowsky PM. 2005. Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. *Biochim. Biophys. Acta* 1729, 186-199.
- Mathias TJ, Boyd LA. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). *Plant Sci.* 46, 217-233.
- Matsumoto I, Emori Y, Abe K, Arai S. 1997. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. *J. Biochem.* 121, 464–476.

Matzke AJM, Matzke MA. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1, 142–148.

Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM. 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* 43, 401–415.

Maximova SN, Dandekar AM, Guiltinan MJ. 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are ratelimiting. *Plant Mol. Biol.* 37, 549-559.

Mazumdar-Leighton S, Broadway RM. 2001. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol* 31, 645–657.

McCormac AC, Elliott MC, Chen DF. 1997. pBECKS. A flexible series of binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Biotechnol.* 8, 199-213.

McCormac AC, Fowler MR, Chen DF, Elliott MC. 2001. Efficient cotransformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation. *Transgenic Res.* 10, 143–155.

McGurl B, Orozco-Cardenas M, Pearce G, Ryan CA. 1994. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9799–802.

McKnight TD, Lillis MT, Simpson RB. 1987. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains. *Plant Mol. Biol.* 8, 439–445.

McManus MT, Burgess EPJ. 1999. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: Effects on larval development of *Spodoptera litura*. *Transgenic Res.* 8, 383-395.

- McManus MT, White DWR, McGregor PG. 1994. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Res.* 3, 50-58.
- Meeusen RL, Warren G. 1989. Insect control with genetically engineered crops. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 373–381.
- Meiyalaghan S, Barrell PJ, J Jacobs ME, AJ Conner. 2011. Regeneration of multiple shoots from transgenic potato events facilitates the recovery of phenotypically normal lines: assessing a cry9Aa2 gene conferring insect resistance. *BMC Biotechnology*, 11, 93.
- Meiyalaghan S, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD, Conner AJ. 2006a. Expression of cry1Ac9 and cry9Aa2 genes under a potato light-inducible Lhca3 promoter in transgenic potatoes for tuber moth resistance. *Euphytica* 147, 297–309.
- Meiyalaghan S, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD, Conner AJ. 2006b. Transgenic potato lines expressing cry1Ba1 or cry1Ca5 genes are resistant to potato tuber moth. *Potato Res.* 49, 203–216.
- Meiyalaghan S, Pringle MJ, Barrell JP, Jacobs MEJ, Conner JA. 2010. Pyramiding transgenes for potato tuber moth resistance in potato. *Plant Biotechnol. Rep.* 4, 293–301.
- Meiyalaghan S, Takla MF, Barrell PJ, Keijzer RM, Jacobs JME, Conner AJ. 2005. Resistance to tuber moth following the transfer to potato of a cry9Aa2 gene under the control of constitutive and light inducible promoters. *Acta Hort.* 670,71–77.
- Mendel MJ, Alford AR, Rajab MS, Bentley MD. 1991. Antifeedant effects of citrus limonoids differing in A-ring structure on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 84(4), 1158-1162.
- Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z, Matthews K. 2003. Are *Bt* crops safe? *Nat. Biotechnol.* 21, 1003-1009.
- Michaud D, Nguyen-Quoc B, Yelle S.1993. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *FEBS Lett.* 331, 173-176.

- Michaud D, Nguyen-Quoc B, Yelle S. 1994a. Production of Oryzacystatins I and II in *Escherichia coli* Using the Glutathione S-Transferase Gene Fusion System. *Blotechnol. Rog. IO*, 155-159.
- Michaud D, Nguyen-Quoc B, Bernier-Vadnais N, Faye L, Yelle S. 1994b. Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. *Physiol. Plant.* 90, 497-503.
- Michaud D, Bernier-Vadnais N, Overney S, Yelle S. 1995a. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 1041-1048.
- Michaud D, Cantin L, Vrain TC. 1995b. Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by Oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 322(2), 469-474.
- Michaud D, Nguyen-Quoc B, Vrain TC, Fong D, Yelle S. 1996. Response of Digestive Cysteine Proteinases From the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the Black Vine Weevil (*Otiorynchus sukafus*) to a Recombinant Form of Human Stefin A *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 451-464.
- Michaud D. 1997. Avoiding protease mediated resistance in herbivorous pests. *Trends in Biotechnology* 15, 4-6.
- Michaud D, Vrain TC. 1998. Expression of recombinant proteinase inhibitors in plants. In: Cunningham C, Porter AJR, editors. *Methods in biotechnology*, vol. 3. Recombinant proteins from plants: production and isolation of clinically useful compounds. Totowa, NJ: Humana Press. p 49-64.
- Mickel CE, Standish J. 1947. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin. 178, 1-20.
- Miki B, Abdeen A, Manabe Y, MacDonald P. 2009. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnol. J.* 7(3), 211-218.

- Miki B, McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnology* 107, 193–232.
- Miller M, Tagliani L, Wang N, Berka B, Bidney D, Zhao Z-Y. 2002. High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transg. Res.* 11, 381–396.
- Miller PR, Amirouche L, Stuchbury T, Matthews S. 1985. The use of plant growth regulators in micropropagation of slow-growing potato cultivars. *Potato Res.* 28, 479-486.
- Mirth C, Truman JW, Riddiford LM. 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15, 1796–1807.
- Misaka T, Kuroda M, Iwabuchi K, Abe K, Arai S. 1996. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soyabean, is distinct in proteine structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur. J. Biochem.* 240. 609-614.
- Missiou A, Kalantidis K, Boutla A, Tzortzakaki S, Tabler M, Tsagris M. 2004. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding* 14, 185–197.
- Mitten DH, Horn M, Burrell MM, Blundy KS. 1990. Strategies for potato transformation and regeneration. *In: Belknap WR, Vayda ME, Park WD. ed. The molecular and cellular biology of the potato.* Wallingford, United Kingdom, CAB International. pp. 181–191.
- Mochizuki A. 1998. Characteristic of digestive proteinases in the gut of some insects orders. *Appl. Entom. Zool.* 33, 401-407.
- Mohammed A, Douches DS, Pett W, Grafius E, Coombs J, Liswidowati J, Li W, Madkour MA. 2000. Evaluation of potato tuber moth (Lepidoptera, Gelechiidae) resistance in tubers of Bt-cry5 transgenic potato lines. *J.Econ. Entomo.*193, 472-476.
- Momčilović I, Ristić Z. 2007. Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development. *J. Plant Physiol.* 164, 90-99.

- Moreno J, Chrispeels MJ. 1989. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. P. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7885-7889.
- Morris LW, Ducreuxa JML, Fraserb DP, Millame S, Taylor AM. 2006. Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. Metabolic Engineering 8, 253–263.
- Morton RL, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E, Higgins TJV. 2000. Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. P. Natl. Acad. Sci. 97, 3820-3825.
- Mulligan EA, Ferry N, Jouanin L, Walters KFA, Port GR, Gatehouse AMR. 2006. Comparing the impact of conventional pesticide and use of a transgenic pest-resistant crop on the beneficial carabid beetle *Pterostichus melanarius*. Pest Management Sci. 62, 999–1012.
- Mulvenna JP, Foley FM, Craik DJ. 2005. Discovery, structural determination, and putative processing of the precursor protein that produces the cyclic trypsin inhibitor sunflower trypsin inhibitor 1. J. Biol. Chem. 280, 32245-32253.
- Munger A, Goulet C, Vaillancourt L-P, Schluter U, Kiggundu A, Kunert K, Goulet M-C, Coenen K, Michaud D. 2010. Constitutive expression of endogenous defense proteins in transgenic potato lines expressing the Cys protease inhibitor corn cystatin II. Asp. Appl. Biol. 96, 157-164.
- Murashige T, Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Phys. Plant. 15, 473-479.
- Murdock LL, Brookhart G, Dunn PE, Foard DE, Kelly S, Kitch L, Shade RE, Shukle RH, Wofson JL. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. Comp. Biochem. Physiol. 87, 783-787.
- Murray KD, Groden E, Drummond FA, Alford AR, Conley S, Storch RH, Bentley MD. 1995. Citrus limonoid effects on Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) colonization and oviposition. Environ. Entomol. 24(5),1275-1283.

Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW. 2002. Caterpillar saliva beats plant defences. *Nature* 416, 599-600.

Nagatani N, Honda H, Shimada T, Kobayashi T. 1997. DNA delivery into rice cells and transformation using silicon carbide whiskers. *Biotechnol. Tech.* 11, 781-786.

Nagib A, Hossain MF, Alam MM, Islam R, Sultana RS. 2003. Virus free potato tuber seed production through meristem culture in tropical Asia. *Asian J. Plant Sci.* 2(8), 616-622.

Naimov S, Dukiandjiev S, de Maagd RA. 2003. A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotechnol J.* 1, 51-57.

Naimov S, Weemen-Hendriks M, Dukiandjiev S, de Maagd RA. 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5328-5330.

Naranjo SE. 2009. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4, 23.

Natarajan S, Turna J. 2007. Excision of selectable marker genes from transgenic crops as a concern for environmental biosafety. *J Sci Food Agric.* 87, 2547-2554.

Navratil O, Vojtechova M, Fischer L, Blafkova J, Linhart M. 1998. Characterization of transgenic potato plants with an additional bacterial gene coding for phosphofructokinase. *Chem. Pap.* 52, 598-598.

Newell C, Lowe J, Merryweather A. 1995. Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Sci.* 107, 215-227.

Newell CA, Rozman R, Hinchee MA, Lawson EC, Haley L, Sanders P, Kaniewski W, Tumer NE, Horcsh RB, Fraley RT. 1991. *Agrobacterium* mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. "Russet Burbank". *Plant Cell Rep.* 10, 30-34.

- Ngezahayo F, Xu C, Wang H, Jiang L, Pang J, Liu B. 2009. Tissue culture-induced transpositional activity of mPing is correlated with cytosine methylation in rice. *BMC Plant Biol.* 9, 91.
- Ni M, Cui D, Einstein J, Narasimhulu S, Vergara CE, Gelvin SB. 1995. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. *Plant J.* 7, 661–676.
- Nijhout H F. 1994. *Insect Hormones*. Princeton: Princeton University Press.
- Nijhout HF, Davidowitz G, Roff DA. 2006. A quantitative analysis of the mechanism that controls body size in *Manduca sexta*. *J. Biol.* 5, 16. (doi:10.1186/jbiol43)
- Nijhout HF, Davidowitz G, Roff DA. 2006. A quantitative analysis of the mechanism that controls body size in *Manduca sexta*. *J Biol*, 5, 16.
- Nijhout HF, Roff DA, Davidowitz G. 2010. Conflicting processes in the evolution of body size and development time. *Phil. Trans. R. Soc.* 365, 567–575.
- Nijhout HF. 2003. The control of body size in insects. *Dev. Biol.* 261, 1-9.
- Ninković S, Miljuš-Djukić J, Radović S, Maksimović V, Lazarević J, Vinterhalter B, Nešković M, Smigočki A. 2007. *Phytodecta fornicata* Bruggemann resistance mediated by oryzacystatin II proteinase inhibitor transgene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 91, 289-294.
- Ninković S. 2002. Ekspresija orizacistatinskih gena u transgenim biljkama lucerke (*Medicago sativa* L.). Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Nishida R. 2002. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47:57-92.
- Noriyuki F, Soh H. 2004, Efficient production of transgenic soybean using a co-transformation method. *Breed. Sci.* 54, 91-98.

Novillo C, Castanera P, Ortego F. 1997. Characterisation and distribution of chymotrypsin and other digestive proteinases in Colorado potato beetle larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 36, 181–201.

Ntui VO, Azadi P, Thirukkumaran G, Khan RS, Chin DP, Nakamura I, Mii M. 2011. Increased resistance to fusarium wilt in transgenic tobacco lines co-expressing chitinase and wasabi defensin genes. Plant Pathology 60, 221–231.

O’Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA. 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on non-target organisms. Ann. Rev. Entomol. 50, 271–292.

O’Neil RJ, Canas LA, Obrycki JJ. 2005. Foreign exploration for natural enemies of the Colorado potato beetle in Central and South America. Biol. Contr. 33(1), 1–8.

OECD Environmental Health and Safety Publications: Consensus Document on the Biology of the *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*. 1997. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.8.

Ojima A, Shiota H, Higashi K, Kamada H, Yoh-Ichi Wadamasata S, Satoh S. 1997. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell culture and seeds of carrot. Plant Mol. Biol. 34, 99-109.

Oliveira AS, Filho JX, Sales MP. 2003. Cysteine proteinases cystatins. Braz. Arch. Biol. Technol. 46(1), 91-104.

Oliveira-Neto OB, Batista JA, Rigden DJ, Fragoso RR, Silva RO, Gomes EA, Franco OL, Dias SC, Cordeiro CM, Monnerat RG, Grossi-De-So MF. 2004. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. Insect Biochem. Mol. Biol. 34(9), 903-918.

Ooms G, Bossen ME, Burrell MM, Karp A. 1986. Genetic manipulation in potato with *Agrobacterium rhizogenes*. Potato Res. 29, 367–379.

Ooms G, Burrell MM, Karp A, Bevan M, Hille J. 1987. Genetic transformation of two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. Theor Appl Genet 73,744-750.

Ooms G, Karp A, Roberts J. 1983. From tumour to tuber; tumour cell characteristics and chromosome numbers of crown-gall-derived tetraploid potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). *Theor Appl Genet.* 66,169-172.

Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272, 23473–23476.

Oppert B, Kramer KJ, Johnson D, Upton SJ, McGaughey WH. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 571–583.

Oppert B, Morgan TD, Culbertson C, Kramer KJ. 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 379–385.

Oppert B, Morgan TD, Hartzler K, Lenarcic B, Galesa K, Brzin J, Turk V, Yoza K, Ohtsubo K, Kramer KJ. 2003. Effects of proteinase inhibitors on growth and digestive proteolysis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 134C, 481–490.

Oppert TB, Morgan TD, Hartzler K, Kramer KJ. 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 140, 53–58.

Orozco-Cardenas M, McGurl B, Ryan CA. 1993. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8273–76.

Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 13, 179-191.

Orr G, Strickland J, Walsh T. 1994. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by multicystatin from potato tubers. *J. Insect Physiol.* 40, 893–900.

- Ortego F, Rodriguez B, Castanera P. 1995. Effects of neo-Clerodane diterpenes from *Teucrium* on feeding behavior of Colorado potato beetle larvae. *J. Chem. Ecol.* 21(9), 1375-1386.
- Ortego F, Novillo C, Castanera P. 1996. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 133, 163–180.
- Ortego F, Novillo C, Sanchez-Serrano JJ, Castanera P. 2001. Physiological response of Colorado potato beetle and beet armyworm larvae to depletion of wound-inducible proteinase inhibitors in transgenic potato plants. *J. Insect Physiol.* 47, 1291–1300
- Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S. 2000. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nat. Biotechnol.* 18(11), 1162-1166.
- Osusky M., Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S. 2004. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transg. Res.* 13, 181–190.
- Outchkourov NS, de Kogel WJ, Wiegers GL, Abrahamson M, Jongsma MA. 2004. Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials. *Plant Biotechnol. J.* 2, 449–458.
- Outchkourov NS, Rogelj B, Strukelj B, Jongsma MA. 2003. Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant*
- Overney S, Fawe A, Yelle S, Michaud D. 1997. Diet-related plasticity of the digestive proteolytic system in larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36, 241–250.
- Overney S, Yelle S, Cloutier C. 1998. Occurrence of cysteine digestive proteases in *Perillus bioculatus*, a natural predator of the Colorado potato beetle. *Comp. Biochem. Physiol.* B120, 191-196.

- Padegimas L, Shulga, OA, Skriabin KG. 1994. Creation of transgenic plants *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*, resistant to the herbicide phosphinothricin. *Mol. Biol.* 28, 437–443.
- Panasiuk O. 1984. Response of Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), to volatile components of tansy, *Tanacetum vulgare*. *J. Chem. Ecol.* 10(9), 1325-1333.
- Park J, Lee YK, Kang BK, Chung W. 2004. Co-transformation using a negative selectable marker gene for the production of selectable marker gene free transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1562–1567.
- Park Y, Choi BH, Kwak JS, Kang CW, Lim HT, Cheong HS, Hahm KS. 2005. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *J. Agric. Food. Chem.* 53, 6491-6496.
- Park YD, Ronis DH, Boe AA, Cheng ZM. 1995. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am. Potato J.* 72, 329-338.
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT. 2007. Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *Plant J.* 51, 79–91.
- Paul L, Angevin F, Collonnier C, Messean A. 2012. Impact of gene stacking on gene flow: the case of maize. *Transgenic Res.* 21, 243–256.
- Paul ND, Hatcher PE, Taylor JE. 2000. Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives. *Trends Plant Sci.* 5, 220–25.
- Peach C, Velten J. 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17, 49–60.
- Peferoen M, Huybrechts R, De Loof A. 1981. Longevity and fecundity in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entom. Exp. Appl.* 29, 321-329.

- Peferoen M, Jansens S, Reynaerts A, Leemans J. 1990. Potato plant with engineered resistance against insect attack. In *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. Edited by: Vayda ME, Park WD. Wallingford, UK: CAB International; 1990:193-204.
- Peloquin SJ, Jansky SH, Yerk GL. 1989. Potato cytogenetics and germplasm utilization. *Amer. Potato J*, 66, 629-638.
- Pena-Cortes H, Sanchez-Serrano J, Rocha-Sosa M, Willmitzer L. 1988. Systemic induction of proteinase inhibitor II gene expression in potato plants by wounding. *Planta* 174, 84-89.
- Pena-Cortes H, Fisahn J, Willmitzer L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4106-4113.
- Perl A, Perl-Treves R, Dalili S. 1993. Enhanced oxidative stressdefense in transgenic potato expressing Cu,Zn superoxide dismutase. *Theor. Appl. Genet.* 85, 568–576.
- Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, Fischhoff DA. 1993. Genetically improved potatoes: Protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22, 313–321.
- Pernas M, Lopez-Solanilla E, Sanchez-Monge R, Salcedo G, Rodriguez-Palenzuela P, Antifungal activity of a plant cystatin. 1999. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 624-627.
- Pernas M, Sanchez-Monge R, Gomes L, Sacedo G. 1998. A chesnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. *Plant Mol. Biol.* 38(6), 1235-1242.
- Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G. 2000. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut, *FEBS Lett.* 467, 206-210.
- Phumichai C, Hosaka K. 2006. Cryptic improvement for fertility by continuous selfing of diploid potatoes using *Sli* gene. *Euphytica* 149, 251-258.

- Pincon G, Chabannes M, Lapierre C, Pollet B, Ruel K, Joseleau JP, Boudet AM, Legrand M. 2001. Simultaneous downregulation of caffeic/5-hydroxy ferulic acid-O-methyltransferase I and cinnamoyl-coenzyme A reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiol.* 126, 145–155.
- Plunkett G, Senear DF, Zuroske G, Ryan CA. 1982. Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 463-472.
- Poirier Y, Ventre G, Nawrath C. 2000. High-frequency linkage of coexpressing T-DNA in transgenic *Arabidopsis thaliana* transformed by vacuum-infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 100, 487–493.
- Popelka JC, Xu J, Altpeter F. 2003. Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgenic Res.* 12, 587–596.
- Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40, 1-22.
- Potter R, Jones MGK. 1991. An assessment of genetic stability of potato in vitro by molecular and phenotypic analysis. *Plant Sci.* 76, 239-248.
- Powel KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, Gatehouse JA. 1993. Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. *Entomol. Exp. Appl.* 66, 119-126.
- Powell ALT, Kalamaki MS, Kurien PA, Gurrieri S, Bennett AB. 2003. Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7450–7455.

Prins A, van Heerden PDR, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH. 2008. Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *J. Exp. Bot.* 59, 1935–1950.

Pusztai A, Grant G, Brown DJ, Stewart JC, Bardocz S. 1992. Nutritional evaluation of the trypsin (EC 3.4.21.4) inhibitor from cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *British J. Nutrition* 68, 783-791.

Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier JA, Stobart AK, Lazarus CM. 2004. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat. Biotechnol.* 22, 739–745.

Radchuk VV, Van DT, Klocke E. 2005. Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous in planta transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Plant Sci.* 168, 1515–1523

Rahbe Y, Deraison C, Bonade-Bottino M, Girard C, Nardon C, Jouanin L. 2003. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Sci.* 164, 441–450.

Raj SS, Kibushi E, Kurasawa T, Suzuki A, Yamane T, Odani S, Iwasaki Y, Ashida T. 2002. Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 Å resolution. *J. Biochem.*, 132, 927-933.

Ramana Rao MV, Sripriya CPR, Veluthambi K. 2001. Transgene stacking and marker elimination in transgenic rice by sequential *Agrobacterium*-mediated co-transformation with the same selectable marker gene. *Plant Cell Rep.* 30, 1241–1252.

Ramana Rao MV, Veluthambi K. 2010. Selectable marker elimination in the T₀ generation by *Agrobacterium*-mediated co-transformation involving Mungbean yellow mosaic virusTrAP as a non-conditional negative selectable marker and bar for transient positive selection. *Plant Cell Rep.* 29(5), 473-48.

Rao H, Wu N, Huang M, Fan Y, Wang M. 2001. Two insect-resistant genes were transferred into poplar hybrid and transgenic poplar show insect-resistance. *Prog. Biotechnol.* 18, 239-246.

Rao R, Manzi A, Filippone E, Manfredi P, Spasiano A, Colucci G, Monti LM, Malva C. 1996. Synthesis and expression of gene encoding putative insect neuropeptide precursor in tobacco. *Gene* 175, 1-5.

Reese JC. 1983. In: P.A. Hedlin (ed), *Plant resistance to insects*, Am. Chem. Soc., Washington DC, 231-244.

Regierer B, Fernie AR, Springer F, Perez-Melis A, Leisse A, Koehl K, Willmitzer L, Geigenberger P, Kossmann J. 2002. Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 20, 1256–1260.

Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404–411.

Rhodes JD, Thain JF, Wildon DC. 1999. Evidence for physically distinct systemic signalling pathways in the wounded tomato plant. *Ann. Bot.* 84, 109–116.

Ribeiro E, Pereira JG, Galvan TL, Picano MC, Picoli EAT, Da Silva, DJH, Fari MG, Otoni WC. 2006. Effect of eggplant transformed with oryzacystatin gene on *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *J. Appl. Entomol.* 130(2), 84-90.

Richardson M. 1980. Protein inhibitors of enzymes. *Food Chem.* 6, 235-253.

Richardson MJ. 1991. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Richardson MJ, ed. *Methods in Plant Biochemistry*, New York, Academic Press, pp. 259-305.

Ritonja A, Krizaj I, Mesko P, Kopitar M, Lucovnik P, Strukelj B, Pungercar J, Buttler DJ, Barrett AJ, Turk V. 1990. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* 267(1), 13–15.

Rivard D, Anguenot R, Brunelle F, Le VQ, Vezina L-P, Trepanier S, Michaud D. 2006. An in-built proteinase inhibitor system for the protection of recombinant proteins recovered from transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.* 4, 359–368.

Rivard D, Cloutier C, Michaud D. 2004. Colorado Potato Beetles Show Differential Digestive Compensatory Responses to Host Plants Expressing Distinct Sets of Defense Proteins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 114–123.

Rivard D, Girard C, Anguenot R, Vezina LP, Trepanier S, Michaud D. 2007. MsCYS1, a developmentally-regulated cystatin from alfalfa. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 508-514.

Rivero M, Furman N, Mencacci N, Picca P, Toum L, Lentz E, Bravo-Almonacid F, Mentaberry A. 2012. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *J. Biotechnol.* 157(2), 334-343.

Robins RJ, Walton NJ, Parr AJ, Aird ELH, Rhodes MJC, Hamill JD. 1994. Progress in the genetic engineering of the pyridine and tropane alkaloid biosynthetic pathways of solanaceous plants, in: B.E. Ellis, G.W. Kuroki, H.A. Stafford (Eds.) *Recent Advances in Phytochemistry*, Plenum Press, New York, pp. 153-178.

Rochasosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer L. 1989. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class-I patatin gene. *EMBO J.* 8, 23–29.

Roff DA. 2000. Trade-offs between growth and reproduction: an analysis of the quantitative genetic evidence. *J. Evol. Biol.* 13, 434–445.

Roff DA. 1992. *The evolution of life histories*. Chapman and Hall, New York.

Romano A, Raemakers K, Bernardi J, Visser R, Mooibroek H. 2003. Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transg. Res.* 12, 461–473.

- Romano et al. (neobjavljeni rezultati) prema: Romano A, Raemakers K, Bernardi J, Visser R, Mooibroek H. 2003. Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transg. Res.* 12, 461–473.
- Rosati C, Simoneau P, Treutter D, Poupard P, Cadot Y, Cadic A, Duron M. 2003. Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of the flavonoid pathway. *Mol. Breed.* 12, 197–208.
- Ross H. 1986. *Potato Breeding-Problems and Perspectives: Advances in Plant Breeding*, Supplement 13 to *J. Plant Breed.*, Paul Parey, Berlin and Hamburg. 132 pp.
- Roudier F, Teixeira FK, Colot V. 2009. Chromatin indexing in *Arabidopsis thaliana*: an epigenomic tale of tails and more. *Trends Genet.* 25, 511–517.
- Rung JH, Draborg HH, Jorgensen K, Nielsen TH. 2004. Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose- 2,6-bisphosphatase. *Physiol. Plant.* 121, 204–214.
- Ryan CA, An G. 1988. Molecular biology of wound-inducible proteinase inhibitors in plants. *Plant Cell Envir.* 11, 345-349.
- Ryan CA. 1989. Insect-induced chemical signals regulating natural plant protection responses. , in: R.F Denno, M.S. McLure (Eds.), *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems*, Academic Press, New York, pp. 43–60.
- Ryan CA. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425 – 449.
- Ryan CA. 1992. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* 19, 123-133.
- Ryan CA. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477:112–21

Sala F, Arencibia A, Castiglione S, Christou P, Zheng Y, Han Y. 1999. Molecular and Wold analysis of somaclonal variation in transgenic plants. In: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds) Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century. Kluwer, Dordrecht, pp259–262

Sala F, Arencibia AD, Castiglione S, Yifan H, Labra M, Savini C, Bracale M, Pelucci P. 2000. Somaclonal variation in transgenic plants. Acta Horticulture 530, 411- 419.

Salmenkallio-Marttila M., Aspegren K, Kerman S, Kurt U, Mannonen L, Ritala A., Teeriz TH, Kauppinen V. 1995. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts Plant Cell Rep. 15, 301–304.

Samac DA, Smigocki AC. 2003. Expression of Oryzacystatin I and II in Alfalfa Increases Resistance to the Root-Lesion Nematode. Phitopatology 93(7), 799-804.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samis K, Bowley S, Mckersie B. 2002. Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa. J. Exp. Bot. 53, 1343–1350.

Sane, V.A., P. Nath, Aminuddin, and P.V. Sane. 1997. Development of insect resistant.transgenic plants using plant genes expression of cowpea trypsin inhibitor in transgenic tobacco plants. Curr. Sci. 72, 741-747.

Santini M, Camadro EL, Marcellan ON, Erazzii LE. 2000. Agronomic characterization of diploid hybrid families derived from crosses between haploids of the common potato and three wild Argentinean tuber-bearing species. Amer. J. Potato Res. 77, 211-218.

Santos MO, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Parrott WA. 1996. Testing transgenes for insect resistance using *Arabidopsis*. Mol. Breed. 3, 183–194.

Savić J, Smigocki AC. 2012. *Beta vulgaris* L. serine proteinase inhibitor gene expression in insect resistant sugar beet. Euphytica, DOI: 10.1007/s10681-012-0679-z.

- Sawahel WA. 2001. Stable genetic transformation of cotton plants using polybrene spermidine treatment. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 377a–377f.
- Schittko U, Hermsmeier D, Baldwin IT. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. *Plant Physiol.* 125, 701-710.
- Schluter U, Benchabane M, Munger A, Kiggundu A, Vorster J, Goulet MC, Cloutier C, Michaud D. 2010. Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. *J. Exp. Bot.* 61(15), 4169–4183.
- Schocher RJ, Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Potrykus I. 1986. Co-expression of unlinked foreign genes into plants by direct gene transfer, *Biotechnol.* 4, 1093-1096.
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm I. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 16, 168–175.
- Schulke RH, Murdock LL. 1983. Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environ. Entomol.* 12, 787-791.
- Schwall G, Safford R, Westcott R, Jeffcoat R, Tayal A, Shi Y-C. 2000. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nat. Biotechnol.* 18, 551–554.
- Scott JG, Wen ZM. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest. Manag. Sci.* 57:958-967.
- Seabrook JEA, Douglass LK. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Rep* 20, 175–182.
- Secor GA, Shepard JF. 1981. Variability of protoplast derived potato clones. *Crop Sci.* 21, 102-105.

- 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 Biotechnol. J.* 8, 65–75.
- Serrano C, Arce-Johnson P, Torres H, Gebauer M, Gutierrez M, Moreno M, Jordana X, Venegas A, Kalazich J, Holulgue L. 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Amer. J. Potato Res.* 77, 191-199.
- Shade RE, Schroeder HE, Pueyo JJ, Tabe LM, Murdoch LL, Higgins TVJ, Chrispeels MJ. 1994. Transgenic peas expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Biotechnology* 12, 793-796.
- Shan L, Li C, Chan F, Zhao S, Xia G. 2008. A Bowman–Birk protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. *Plant Cell Env.* 31, 1128–1137.
- Sharma SK, Bryan GJ, WinWeld MO, Millam S. 2007. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226,1449–1458.
- Sharma SK, Millam S. 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep.* 23, 115–119.
- Sheerman S, Bevan MW. 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Plant Cell Rep.* 7, 13-16.
- Shen BZ, Zheng ZW, Dooner HK. 2000. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14807-14812.
- Shepard JF, Bidney D, Shahin E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208, 17-24.

- Shiba H, Uchida D, Kobayashi H, Natori M. 2001. Involvement of cathepsinB- and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori*. Arch. Biochem. Biophys 390, 28–34.
- Shimamoto K, Teralda R, Izawa T, Fujimoto H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. Nature 338, 274–276.
- 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 Biochem. 15 (1), 93–101.
- Shyu DJH, Chou WN, Yiu TJ, Lin CPC, Tzen JTC. 2004. Cloning, functional expression and characterization of cystatin in sesame seeds. J. Agr. Food Chem. 52, 1350-1356.
- Simoes RA, Silva-Filho MC, Moura DS, Delalibera Jr I. 2008. Effects of soybean proteinase inhibitors on development of the soil mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida). Exp. Appl. Acarol. 44, 239–248.
- Simpson SJ, Raubenheimer D. 1993. The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. Physiol. Entomol. 18, 395–403.
- Simpson SJ, Simpson CL. 1989. The mechanisms of nutritional compensation by phytophagous insect. In: Bernays EA, editor. Insect-plant interactions, vol. II. Boston: CRC Press. p 111–160.
- Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK. 2003. Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (14), 672–14 677.
- Sivasupramaniam S, Moar WJ, Ruschke LG, Osborn JA, Jiang C, Sebaugh JL, Brown GR, Shappley ZW, Oppenhuizen ME, Mullins JW, Greenplate JT. 2008. Toxicity and Characterization of Cotton Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 Proteins for Control of Lepidopteran Pests. J. Econom. Entomol. 101(2), 546-554.

Slater S, Mitsky TA, Houmiel KL, Hao M, Reiser SE, Taylor NB, Tran M, Valentin HE, Rodriguez DJ, Stone DA, Padgett SR, Kishore G, Gruys KJ. 1999. Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nat. Biotechnol.* 17, 1011–1021.

Smilde WD, Brigneti G, Jagger L, Perkins S, Jones J.G. 2005. *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 252–258.

Smith O. 1977. Potatoes: Production, Storing, Processing. The AVI publishing company, Inc., West Port, Connecticut.

Smith R, Mellor FC. 1970. Eradication of potato spindle tuber virus by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathology* 60, 1857-1858.

Smulders, JM, Klerk JG, 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 63, 137–146.

Soares-Costa AL, Beltramini M, Thiemann OH, Henrique-Silva F. 2002. A shugaricane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 269(5), 1194-1199.

Solomon M, Belenghi B, Delladonne M, Menachen E, Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteinase and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell.* 11, 431-443.

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

Song JQ, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang HH, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang JM. 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9128–9133.

- Spooner DM, Baniberg JB. 1994. Potato genetic resources: sources of resistance and systematics. *Amer. Potato J*, 71, 325-337.
- Sridevi G, Parameshwari C, Sabapathi N, Raghupathy V, Veluthambi K. 2008. Combined expression of chitinase and β -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistant against *Rhizoctonia solani*. *Plant Sci*. 175, 283-290.
- Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS. 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cell Mol. Biol. Lett*. 11(1), 132-154.
- Srinivasan T, Kumar KRR, Kirti PB. 2009. Constitutive expression of a trypsin protease inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol*. 50, 541–553.
- Sripriya R, Raghupathy V, Veluthambi K. 2008. Generation of selectable marker-free sheath blight resistant transgenic rice plants by efficient co-transformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector T-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain. *Plant Cell Rep*. 27, 1635–1644.
- Sripriya R, Sangeetha M, Parameswari C, Veluthambi B, Veluthambi K. 2011. Improved *Agrobacterium*-mediated co-transformation and selectable marker elimination in transgenic rice by using a high copy number pBin19-derived binary vector. *Plant Sci*. 180, 766–774.
- Steppuhn A, Baldwin IT. 2007. Resistance management in a native plant: Nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecol. Lett*. 10, 499–511.
- Stewart FC, Caplin SM. 1951. A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and of coconut milt. *Science* 111, 518-520.
- Stewart SD, Adamczyk JJ, Knighten KS. 2001. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol*. 94, 752-760.

- Stoger E, Williams S, Christou P, Down R, Gatehouse JA. 1999. Expression of insecticidal lectins from snowdrop (*Galantus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effect on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Mol. Breeding* 5, 65-73.
- Struik PC, Wiersema SG. 1999. Seed potato technology. Wageningen Pers, Wageningen.
- Stuiver MH, Custers JHHV. 2001. Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411, 865-868.
- Su X, Chu Y, Li H, Hou Y, Zhang B, Huang Q, Hu Z, Huang R, Tian Y. 2011. Expression of Multiple Resistance Genes Enhances Tolerance to Environmental Stressors in Transgenic Poplar (*Populus x euramericana* 'Guariento'). *PLoS ONE* 6(9), e24614.
- Sundar IK, Sakthivel N. 2008 Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J Plant Physiol.* 165(16),1698-1716.
- Suzuki A, Tsunogae Y, Tanaka I, Yamane T, Ashida T. 1987. The structure of Bowman-Birk type protease inhibitor A-II from peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3-A resolution. *J. Biochem.* 101, 267-274.
- Suzuki K, Ishimoto M, Kikuchi F, Kitamura K. 1993. Growth inhibitory effect of an α -amylase inhibitor from the wild common bean resistant to the Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*). *Jpn. J. Breed.* 43, 257-265.
- Šip V. 1972. Eradication of potato virus A and S by thermotherapy and sprout tip culture. *Potato Res.* 15, 270-273.
- Tabashnik BE, Van Rensburg JB, Carriere Y. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data. *J. Econ. Entomol.* 102, 2011–2025.
- Tagu D, Bergounioux C, Cretin C, Perennes C, Gadal P. 1998. Direct gene transfer in *Petunia hybrida* electroporated protoplasts: Evidence for co-transformation with a phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA from sorghum leaf. *Protoplasma* 146, 101-105.

- Tang L, Kim MD, Yang KS, Kown SY, Kim SH, Kim JS, Yun DJ, Kwak SS, Lee HS. 2008. Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgen. Res.* 17, 705–715.
- Tanurdzic M, Vaughn MW, Jiang H, Lee TJ, Slotkin RK, Sosinski B Thompson WF, Doerge RW, Martienssen RA. 2008. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biol.* 6, 2880–2895.
- Tavazza R, Tavazza M, Ordas RJ, Ancora G, Benvenuto E. 1988. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): an efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Sci.* 59, 175-182.
- Taverniers I, Papazova N, Bertheau Y, De Loose M, Holst- Jensen A. 2008. Gene stacking in transgenic plants: towards compliance between definitions, terminology and detection within the EU regulatory framework. *Environ. Biosafety Res.* 7, 197–218.
- Taylor SL, Hefle SL. 2002. Genetically engineered foods: implications for food allergies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2, 249-252.
- Thie NM, Houseman JG. 1990. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem.* 20, 313–318.
- Thomas JC, Adams DG, Keppenne VD, Wasmann CC, Brown JK, Kanost MR, Bohnert HJ. 1995. *Miuca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Bioch.* 33, 611-614.
- Thomas JC, Wasmann CC, Echt C, Dunn RL, Bohnert HJ, McCoy TJ. 1994. Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa. *Plant Cell Rep.* 14, 31–36.
- Thomas PE, Kaniewski WK, Lawson EC. 1997. Reduced field spread of potato leafroll virus in transgenic potatoes expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Pl. Dis.* 81, 1447-1453.

Thomas PE, Lawson EC, Zalewski JC, Reed GL, Kaniewski WK. 2000. Extreme resistance to potato leafroll virus in potato cv. Russet Burbank mediated by the viral replicase gene. *Virus Res.* 71, 49–62.

Thomson JM, Lafayette PR, Schmidt, MA, Parrott WA. 2002. Artificial gene-clusters engineered into plants using a vector system based on intron- and intein-encoded endonucleases. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 38, 537–542.

Thorbjornsen T, Asp T, Jorgensen K, Nielsen TH. 2002. Starch biosynthesis from triose-phosphate in transgenic potato tubers expressing plastidic fructose-1,6-bisphosphatase. *Planta* 214, 616–624.

Thornton M. 2003. The Rise and Fall of NewLeaf Potatoes. NABC Report 15: Biotechnology: Science and Society at a Crossroad, pp. 235–243.

Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK. 2000. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22, 531–541.

Trujillo C, Rodriguez-Arango E, Jaramillo S, Hoyos R, Orduz S, Arango R. 2001. One-step transformation of two Andean potato *cultivars* (*Solanum tuberosum* L. subsp, andigena). *Plant Cell Rep.* 20, 637-641.

Tu J, Datta K, Oliva N, ZhangG, Xu C, Khush GS, Zhang Q, Datta SK. 2003. Site-independently integrated transgenes in the elite restorer rice line Minghui 63 allow removal of a selectable marker from the gene of interest by self-segregation. *Plant Biotechnol. J.* 1, 155–165.

Turhan H. 2005. Salinity Response of Transgenic Potato Genotypes Expressing the Oxalate Oxidase Gene. *Turk. J. Agric. For.* 29, 187-195.

Turk B, Turk V, Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain like cysteine proteinases and their protein inhibitors, *Biol. Chem.* 378, 141-150.

- Uchimiya H, Hirochika H, Hashimoto H, Hara A, Masuda T, Kasumimoto T, Harada H, Ikeda JE, Yoshioka M. 1986. Coexpression and inheritance of foreign genes in transformants obtained by direct DNA transformation of tobacco protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 205, 1-8.
- Urwin P, McPherson MJ, Atkinson HJ. 1998. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 204, 472–479.
- Urwin PE, Atkinson HJ, McPherson MJ. 1995a. Involvement of the NH₂-terminal region of oryzacystatin-I in cysteine proteinase inhibition. *Protein Engineering* 8, 1303-1307.
- Urwin PE, Atkinson HJ, Waller DA, McPherson MJ. 1995b. Engineered oryzacystatin-1 expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *Plant J.* 8, 121–131.
- Urwin PE, Green J, Atkinson HJ. 2003. Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. *Mol. Breeding* 12, 263–269.
- Urwin PE, Levesely A, McPherson MJ, Atkinson HJ. 2000. Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *Arabidopsis thaliana* plants expressing proteinase inhibitors. *Mol. Breed.* 6, 257–264.
- Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ. 1997. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.* 12(2), 455-461.
- Urwin PE, Troth KM, Zubko EI, Atkinson HJ. 2001. Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Mol. Breed.* 8, 95-101.
- Ussuf KK, Laxmi NH, Mitra R. 2001. Proteinase inhibitors. Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Curr. Sci.* 80(7), 847-853.
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, Beukleer MD, Dean C. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.

Vain P, Worland B, Clarke M, Richard G, Beavis M, Liu H, Kholi A, Leech M, Snape J, Christou P, Atkinson HJ. 1998. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-IDD86) for nematode resistance in transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* 96, 266-271.

Valdes-Rodriguez S, Guerrero-Rangel A, Melgoza-Villagomez C, Chagolla-Lopez A, Delgado-Vargas F, Martinez-Gallardo N, Sanchez-Hernandez C, Delano-Frier J. 2007. Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 790-798.

Van Attikum H and Hooykaas PJJ. 2003. Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.* 31, 826–832.

Van der Vossen E, Sikkema A, Hekkert BTL, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, Allefs S. 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 36, 867–882.

Van der Vyver C, Schneidereit J, Driscoll S, Turner J, Karl Kunert, Foyer CH. 2003. Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 1, 101–112.

Van der Wilk F, Willink DP, Huisman MJ, Huttinga H, Goldbach R. 1991. Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral-infection. *Plant Mol. Biol.* 17, 431–439.

Van Larebeke N, Genetello C, Hernalsteens JP, De Picker A, Zaenen I, Messens E, Van Montagu M, Schell J. 1977. Transfer of Ti plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization of the conjugative plasmid RP4. *Mol. Gen. Genet.*, 152, 119–124.

Van Rie J, Jansens S, Reynaerts A. 1994. Engineered resistance against potato tuber moth. In *Advances in Potato Pest Biology and Management*. Edited by: Zehnder GW, Powelson ML, Jansson RK, Raman KV. Minnesota, USA, APS Press; 499-509.

- Vargas TE, De Garcia E, Oropeza M. 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. *J. Plant Physiol.* 162, 449–456.
- Vidal JR, Kikkert JR, Wallace PG, Reisch BI. 2003. High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep.* 22, 252–260.
- Vila L, Quilis J, Meynard D, Breitler JC, Marfa V, Murillo I, Vassal JM, Messeguer J, Guiderdoni E, San Segundo B. 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (*mpi*) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnol. J.* 3, 187-202.
- Vinokurov KS, Elpidina EN, Oppert B, Prabhakar S, Zhuzhikov DP, Dunaevsky YE, Belozersky MA. 2006. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 145, 126–137
- Vinterhalter D, Vinterhalter B, Čalović M. 1997. The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv. Desiree shoot cultures. *Acta Horticulturae* 462, 319-323.
- Vinterhalter D, Zdravković-Korać S, Mitić N, Dragičević I, Cingel A, Raspor M, Ninković S. 2008. *Protocols for Agrobacterium-mediated Transformation of Potato. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* © Global Science Books.
- Visal S, Taylor MAJ, Michaud D. 1998. The proregion of papaya IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 434(3), 401-405.
- Visser R, Suurs L, Bruinenberg P, Bleeker I, Jacobsen E. 1997a. Comparison between amylose-free and amylose containing potato starches. *Starch* 49, 438–443.
- Visser R, Suurs L, Steeneken P, Jacobsen E. 1997b. Some physicochemical properties of amylose-free potato starch. *Starch* 49, 443–448.

- Visser RGF, Hesseling-Meinders A, Jacobsen E, Nijdam H, Witholt B, Feenstra WJ. 1989a. Expression and inheritance of inserted markers in binary vector carrying *Agrobacterium rhizogenes*-transformed potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Gen.* 78, 705-714.
- Visser RGF, Jacobsen E, Hesseling-Meinders A, Schans MJ, Witholt B, Feenstra WJ. 1989b. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Mol. Biol.* 12, 329-337.
- Vries-Uijtewaal E, Gilissen LJW, Flipse E, Sree Ramulu K, Stiekema WJ, De Groot B. 1989. Fate of introduced genetic markers in transformed root clones and regenerated plants of monoploid and diploid potato genotypes. *Theor. Appl. Gen.* 78, 185-193.
- Walbot V, Cullis C. 1985. Rapid genomic changes in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 367-396.
- Walden R, Hayashi H, Schell J. 1991. T-DNA as a gene tag. *Plant J.* 1, 281-288.
- Waldrom C, Wegrich LM, Merlo PAO, Walsh TA. 1993. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Mol. Biol.* 23, 801-812.
- Walker AJ, Ford L, Majerus MEN, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. 1998. Characterisation of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Bioch. Mol. Bio.* 28, 173-180.
- Walkiewicz MA, Stern M. 2009. Increased Insulin/Insulin Growth Factor Signaling Advances the Onset of Metamorphosis in *Drosophila*. *PLoS ONE* 4(4), 1-6.
- Walling LL. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19, 195-216.
- Wallis JG, Wang H, Guerra DJ. 1997. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. *Plant Mol. Biol.* 35, 323-330.

- Walsh TA, Strickland JA. 1993. Proteolysis of 85 kilodalton crystalline proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domain. *Plant Physiol.* 103, 1227-1234.
- Wang Q, Li P, Hanania U, Sahar N, Mawassi M, Gafny R, Sela I, Tanne E, Perl A. 2005. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. *Plant Sci.* 168: 565-571.
- Watanabe KN, Zanbrano V, Benavides J, Siguenas C, El-Nashaar H, Dodds JH. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation with antibacterial genes for controlling bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) on tetraploid potato varieties. *Mem. Research Inst. B.O.S.T. Kinky University.* 3, 11-18.
- Waterer D, Benning NT, Wu G, Luo X, Liu X, Gusta M, McHughen A, Gusta LV. 2010. Evaluation of abiotic stress tolerance of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Mol Breed.* 25, 527–540.
- Webb KJ, Osifo EO, Henshaw GG. 1983. Shoot regeneration from leaflet discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Plant Sci. Lett.* 30, 1-8.
- Wegorek P. 2002. Insecticide resistance management strategy for Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in Poland. *The Resistant Pest Management Newsletter*, 11(2), 22-30.
- Wei AJ, He CM, Li B, Li N, Zhang RJ. 2011. The pyramid of transgenes TsVP and BetA effectively enhances the drought tolerance of maize plants. *Plant Biotechnol. J.* 9, 216–229.
- Wei Z, Wang X, Xing S. 2012. Current progress of biosafe selectable markers in plant transformation. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 4(1), 1-8.
- Weigel D, Anh JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Fernandez C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA., Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J. 2000. Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122(4), 1003-1013.

Wenzler H, Mignery G, May G, Park W. 1989. A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. *Plant Sci.* 63, 79-85.

Werner R, Cuitton M-C, Mühlbach H-P. 1993. Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. *Plant Physiol.* 103, 1473.

Whalon M, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, Duynslager L. 2008. Arthropod Pesticide Resistance Database. <http://www.pesticideresistance.org>.

Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, Duynslager L. 2007. Arthropod Pesticide Resistance Database. <http://www.pesticideresistance.org>

Wheeler VA, Evans NE, Foulger D, Webb KJ, Karp A, Franklin J, Bright SWJ. 1985. Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. *Ann. Bot.* 55, 309-320.

Wierenga JM, Norris DL, Whalon ME. 1996. Stage-specific mortality of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on transgenic potatoes. *J Econ. Entomol.* 89, 1047–1052.

Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb RI, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ. 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360, 62-65.

Wilson A, Jonathan R, Latham R, Steinbrecher AR. 2006. Transformation-induced mutations in transgenic plants: Analysis and biosafety implications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 23, 209-234.

Wilson K, Long D, Swinburne J, Coupland G. 1996. A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2. *The Plant Cell* 8(4), 659-71.

Windels, P., De Buck, S., Depicker, A., 2008. *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation: Patterns of T-DNA Integration into the Host Genome, *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Tzfira, T. and Citovsky, V., Eds., 2008, pp. 441–481.

- Winterer J, Bergelson J. 2001. Diamondback moth compensatory consumption of protease inhibitor-transformed plants. *Mol. Ecol.* 10, 1069–1074.
- Wolfson JL, Murdock LL. 1987. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive protease inhibitors. *Entomol Exp Appl* 44: 235–240.
- Wolfenbarger LL, Naranjo SE, Lundgren JG, Bitzer RJ, Watrud LS. 2008. Bt crops effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *PLoS ONE* 3, e2118.
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitz-simmons KC, Shah DM. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7, 1357–1368.
- Wu J, Haard NF. 2004. Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate-treated tomato plants, *Comp. Biochem. Physiol. C* 127, 209-220.
- Wu L, Nandi S, Chen L, Rodriguez RL, Huang N. 2002. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. *Transgenic Res.* 11, 533–541.
- Wu Y, Llewellyn D, Matthews A, Dennis ES. 1997. Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to a proteinase inhibitor expressed in transgenic tobacco. *Mol. Breeding* 3, 371–380.
- Wu R, Guo WL, Wang XR, Wang XL, Zhuang TT, Jihong Liu Clarke, Liu B. 2009. Unintended consequence of plant transformation: biolistic transformation caused transpositional activation of an endogenous retrotransposon Tos17 in rice ssp. japonica cv. Matsumae. *Plant Cell Rep.* 28, 1043–1051.
- Xiao Y, Wang K, Ding R, Zhang H, Di P, Chen J, Zhang L, Chen W. 2012. Transgenic tetraploid *Isatis indigotica* expressing Bt Cry1Ac and *Pinellia ternata* agglutinin showed enhanced resistance to moths and aphids. *Mol. Biol. Rep.* 39, 485–491.
- Xu D, McElroy D, Thornburg RW, Wu R. 1993. Systemic induction of a potato *pin2* promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* 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. *Mol. Breed.* 2, 167-173.
- Xu XJ, Dong YM, Abraham EG, Kocan A, Srinivasan P, Ghosh AK, Sinden RE, Ribeiro JMC, Jacobs-Lorena M, Kafatos FC. 2005. Transcriptome analysis of *Anopheles stephensi-Plasmodium berghei* interactions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 142, 76–87.
- Yadav NR, Sticklen MB. 1995. Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. ‘Bintje’. *Plant Cell Rep.* 14, 645-647.
- Yamamoto Y, Takimoto K, Izumi S, Toriyama-Sakurai M, Kageyama T, Takahashi SY. 1994. Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm. *Bombyx mori*. *J. Biochem.* 116, 1330–1335.
- Yang AH, Yex KW. 2005. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from Taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no.1). *Planta* 221, 493-501.
- Yang L, Fang Z, Dicke M, van Loon JJA, Jongsma MA. 2009. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 55–61.
- Yao JH, Pang YZ, Qi HX, Wan B, Zhao X, Kong W, Sun X, Tang K. 2003. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids. *Transgenic Res.* 12, 715–722.
- Ye XD, Al Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287, 303–305.
- Yee S, Stevens B, Coleman S, Seabrook JEA, Li X-Q. 2001. High efficiency regeneration *in vitro* from potato petioles with intact leaflets. *Amer. J. Potato Res.* 78, 151-157.

- Yeh KW, Lin MI, Tuan SJ, Chen YM, Lin CY, SS Kao. 1997. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.* 16, 696-699.
- Yepes LM, Aldwinckle S. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37, 257-269.
- Yoder JJ, Goldsbrough AP. 1994. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Technol.* 12, 263-267.
- Yonezawa H, Kaneda M, Uchikoba T. 1998. A cysteine proteinase from young stems of asparagus: Isolation, properties, and substrate specificity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 28–33.
- Yu D, Xie Z, Chen C, Fan B, Chen Z. 1999. Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Mol. Bio.* 139, 477-488.
- Yu O, Shi J, Hession AO, Maxwell CA, McGonigle B, Odell JT. 2003. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochem.* 63, 753–763.
- Zangerl AR. 1990. Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for an induced defense against herbivores. *Ecology* 71, 1926-1932.
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui D, Baldwin IT. 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiol.* 134, 1181-1190.
- Zhang BY, Su XH, Li YL, Zhang YA, Qu LJ. 2005. Transformation of poplar (*Populus alba* P. glandulosa cv. '84K') with binary insect resistance genes and analysis of insect resistance. *Forest Res.* 18, 364–368.
- Zhang X, Liu S, Takano T. 2008. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol. Biol.* 68, 131–143.

Zhao JZ, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat Biotechnol.* 21, 1493–1497.

Zhao JZ, Fan YL, Fan XL, Shi XP, Lu MG. 1999. Evaluation of transgenic tobacco expressing two insecticidal genes to delay resistance development of *Helicoverpa armigera*. *Chinese Sci.Bull (English edition)* 44, 1871–1874.

Zhao JZ, Shi XP, Fan XL, Zhang CY, Zhao RM, Fan YL. 1998. Insecticidal activity of transgenic tobacco co-expressing Bt and CpTI genes on *Helicoverpa armigera* and its role in delaying the development of pest resistance. *Rice Biotechnol. Quart.* 34, 9-10.

Zhao Y, Botella MA, Subramanian L, Niu X, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM. 1996. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homologue. *Plant Physiol.* 111, 1299-1306.

Zhen W, Chen X, Liang H, Hu Y, Gao Y, Lin Z. 2000. Enhanced late blight resistance of transgenic potato expressing glucose oxidase under the control of pathogen-inducible promoter. *Chin. Sci. Bull.* 45, 420-425.

Zhou X, Cao G, Lin R, Sun Y, Li W. 1994. A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. In: Javornik, B., Bohanec, B., Kreft, I., (eds), *Proceedings of impact of plant biotechnology on agriculture*. Biotechnical Faculty, Ljubljana, 171-175.

Zhu Q, Maher A, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *BioTechnol.* 12, 807-812.

Zhu S, Li Y, Vossen JH, Visser RGF, Jacobsen E. 2010. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Res.* DOI 10.1007/s11248-011-9510-

1

Zhu YC, Abel CA, Chen MS. 2007. Interaction of Cry1Ac toxin (*Bacillus thuringiensis*) and proteinase inhibitors on the growth, development, and midgut proteinase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. Pestic. Biochem. Physiol. 87, 39–46.

Zhu-Salzman K, Koiwa H, Salzman RA, Shade RE, Ahn JE. 2003a. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. Insect Mol. Biol. 12(2), 135-45.

Zhu-Salzman K, Ahn JE, Salzman RA, Koiwa H, Shade RE, Balfe S. 2003b. Fusion of a soybean cysteine protease inhibitor and a legume lectin enhances anti-insect activity synergistically. Agric. Forest Entomol. 5, 317–323.

Zhu-Salzman K, Luthe DS, Felton GW. 2008. Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores Plant Physiol. 146, 852–858.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Aleksandar D. Cingel rođen je 24. 09. 1969. godine u Sremskoj Mitrovici, gde je i završio osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisao je školske 1988/89 godine. Diplomirao je 2000. godine i stekao zvanje diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa. Magistar bioloških nauka je postao 2006. godine uspešno odbranivši magistarsku tezu pod naslovom „Genetička transformacija domaćih sorti krompira (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragačevka i cv. Jelica) orizacistatinskim genima (*OCI* i *OCII*)“ pod mentorstvom i neposrednim rukovodstvom dr Slavice Ninković. Mr Aleksandar Cingel je zaposlen od 2004. godine kao laborant a od 2006 kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Od 2007. godine radi kao istraživač-saradnik na istom mestu.

Mr Aleksandar Cingel je trenutno angažovan na nacionalnim projektima „Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste“ (OH173015) i „Razvoj i primena biotehnoloških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka“ (TR 31019), kao i na međunarodnom projektu „Priming of heat and drought tolerance in potato“ (SCOPES IZ73Z0_1 28031). U prethodnom periodu mr Aleksandar Cingel je bio angažovan na nacionalnim projektima „Regulacija morfofenetskih procesa i sekundarnog metabolizma i genetičke transformacije biljaka u kulturi *in vitro*“ (2006–2010) i „Unapređenje proizvodnje ukrasnih biljaka primenom novih tehnologija“ (2005–2008). Mr Aleksandar Cingel je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Srpskog biološkog društva i The Federation of European Societies of Plant Biology.