

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Slavica S. Dmitrović

ALELOPATSKI EFEKTI
TRANSFORMISANIH KORENOVA
Chenopodium murale* L. *in vitro

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

MSc Slavica S. Dmitrović

ALLELOPATHIC EFFECTS OF
***Chenopodium murale* L. HAIRY ROOTS**
in vitro

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori:

Naučni savetnik dr Slavica Ninković

Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Docent dr Aneta Sabovljević

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Članovi komisije:

Naučni savetnik dr Nevena Mitić

Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Naučni saradnik dr Ana Simonović

Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Viši naučni saradnik dr Vuk Maksimović

Univerzitet u Beogradu
Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo doktorske teze je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i u laboratorijama Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta osnovnih istraživanja „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju ex situ zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja”, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ON173024).

Srdačno se zahvaljujem svom mentoru dr Slavici Ninković, kao i dr Neveni Mitić na uloženom trudu, stručnoj pomoći, interesantnim idejama, smernicama i stečenom znanju, koji su bili ključni za izradu ove teze. Ukazano poverenje mi je bilo podsticajno za celokupan rad.

Zahvaljujem se svom mentoru dr Aneti Sabovljević na korisnim savetima, predusretljivosti i angažovanju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u realizaciji doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Ani Simonović za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti molekularne biologije (ekspresija gena ćelijskog ciklusa) i istraživanja antioksidativnih enzima, kao i za pomoć oko uobličavanja teksta.

Veliku zahvalnost dugujem dr Vuku Maksimoviću na angažovanju u realizaciji eksperimenata iz oblasti fenolnih jedinjenja i šećera, korišćenjem HPLC metode, kao i pomoći u tumačenju i prezentovanju rezultata.

Izuzetnu zahvalnost dugujem svom bivšem dugogodišnjem šefu dr Dragoljubu Grubišiću, koji nam je nauku predstavljao na veoma zanimljiv i zanesen način. Takođe, veliko hvala i profesoru dr Radomiru Konjeviću, mom bivšem šefu Katedre za fiziologiju biljaka na Biološkom fakultetu.

Sadašnjem šefu, dr Danijeli Mišić, se zahvaljujem na razumevanju i podršci tokom završne faze izrade doktorske disertacije.

Mojoj dragoj profesorici, dr Ljubinki Čulafić, se zahvaljujem na uvođenju u svet nauke i optimizmu kojim zrači sve ove godine.

Jeleni Savić i Biljani Filipović, mojim dragim koleginicama, zahvaljujem se na velikoj ljubaznosti i pomoći u eksperimentalnom radu koji se odnosi na oblast antioksidativnih enzima. Jeleni Savić se takođe zahvaljujem i na tehničkoj podršci prilikom predstavljanja rezultata.

Dr Snežani Budimir i dr Dušici Janošević se zahvaljujem na angažovanju oko histocitoloških istraživanja.

*Mirki Đorđević se zahvaljujem na pomoći u transformaciji biljaka *C. murale*, a dr Radomirki Nikolić na pomoći u održavanju kultura transformisanih korenova *C. murale*.*

Dr Suzani Živković se zahvaljujem na pomoći u analizi fenolnih jedinjenja, a Milanu Dragičeviću na korisnim praktičnim sugestijama tokom laboratorijskog rada.

*Dr Snežani Zdravković Korać se zahvaljujem na pomoći oko PCR analiza, a Tatjani Čosić, Martinu Rasporu i Aleksandru Cingelu na pomoći oko RT-PCR analiza u eksperimentima iz oblasti genetičkih transformacija *C. murale*.*

Mojoj dragoj komšinici dr Ireni Novaković, sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem se na pregledu doktorske disertacije.

Svim dragim koleginicama i kolegama iz Odeljenja za fiziologiju biljaka hvala na vedroj radnoj atmosferi, a naročito koleginicama i kolegama iz sobe 112: Biljani Filipović, Jeleni Cvetković, dr Branislavu Šileru i Nabilu Ghalawenji.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene.

Hvala suprugu Nenadu i deci Dragani i Jovanu na bezgraničnoj radosti i ljubavi. Takođe, hvala mojim roditeljima Evi i Siniši, kojima i posvećujem ovaj rad, kao i bratu Čedomiru i Mariji na toploj porodičnoj atmosferi.

Alelopatski efekti transformisanih korenova *Chenopodium murale* L. *in vitro*

REZIME

Korenov sistem *C. murale* proizvodi i luči hemijske materije koje imaju alelopatsku aktivnost. Proučavanje efekata na druge organizme, kao i izolovanje i karakterizacija metabolita koji su izlučeni iz korenova u zemljište je veoma kompleksan proces. Zbog toga je cilj ovog istraživanja bio uspostavljanje kulture transformisanih korenova *C. murale in vitro*, kao novog sistema pogodnog za izučavanje alelopatskog efekta.

Transgeni korenovi su indukovani pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS na eksplantatima korenova, kotiledona, listova i internodija klijanaca *C. murale*. Eksplantati korenova su imali najveću efikasnost transformacije (11,1%). Uspostavljeni su klonovi transformisanih korenova različite morfologije i potencijala rasta koji se gajenjem (subkultivisanjem) u tečnom MS medijumu održavaju više od dve godine. Potvrda transformacije ovih klonova je urađena pomoću PCR, RT-PCR i histohemijske GUS analize. Nije ustanovljena razlika u prisustvu *rol* gena među klonovima.

Ispitivan je alelopatski efekat tečnih medijuma u kojima su rasli transformisani i netransformisani korenovi *C. murale* (fitotoksični medijum) na klijanje i rast klijanaca test biljaka arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh), pšenice (*Triticum aestivum* L.) i salate (*Lactuca sativa* L.). Kod sve tri test biljke ustanovljen je inhibitorski efekat na klijanje semena i rast klijanaca. Klonovi transformisanih klonova: R1 i R8, imali su najveći alelopatski potencijal.

Kod test biljaka arabidopsisa i pšenice, koje su bile tretirane fitotoksičnim medijumima, praćena je ukupna aktivnost antioksidativnih enzima – katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza (spektrofotometrijski), kao i zastupljenost i aktivnost pojedinih izoformi navedenih enzima (elektroforetski). Aktivnost ovih enzima (izuzev katalaza kod arabidopsisa) bila je povećana kod klijanaca isključivanih i gajenih na fitotoksičnim medijumima, što je u skladu sa aktiviranjem odbrambenih mehanizama u biljkama kada se

one bile izlažu stresu (fitotoksinima, tj. alelohemikalijama). Fitotoksični medijumi različitih klonova transformisanih korenova doveli su do različitog nivoa povećanja aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod različitih test biljaka.

Pošto su fitotoksični medijumi doveli do inhibicije rasta i razvoja klijanaca, kod tretiranih test biljaka ispitivana je i ekspresija gena regulatora ćelijskog ciklusa. Metodom qPCR-a je pokazano statistički značajno smanjenje ekspresije gena koji regulišu prelaz iz G1 u S fazu kao i prelaz iz G2 u M fazu, što ukazuje na potencijalnu inhibiciju procesa DNK sinteze, kao i same mitoze. Homologi geni arabidopsisa i pšenice (*CDKA;1 / CDC2* kao i *CYCD2;1 / CYCD2*) su pokazivali sličan profil ekspresije.

HPLC analizom fitotoksičnih medijuma utvrđeno je prisustvo fenolnih kiselina, kafeinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline u koncentraciji od 0,07 – 2,85 µmol/l. Sve tri fenolne kiseline, komercijalno proizvedene, primenjene pojedinačno ili u binarnim ili tercijarnim smešama, u koncentraciji od 5 mmol/l za pšenicu i salatu i 0,5 mmol/l za arabidopsis, pokazale su sličan inhibitorni efekat na klijanje semena i rast klijanaca test biljaka, kao i u slučaju primene fitotoksičnih medijuma. Međutim, pošto su koncentracije čistih supstanci fenolnih kiselina koje izazivaju inhibitorni efekat bile znatno veće od koncentracija ovih fenolnih kiselina određenih u fitotoksičnim medijumima, pretpostavljamo da alelopatско svojstvo fitotoksičnih medijuma potiče od nekih drugih hemijskih jedinjenja ili njihovih interakcija, što će biti predmet daljih istraživanja.

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju osnovu za rasvetljavanje hemijske prirode i mehanizma alelopatске interferencije biljaka *C. murale*.

Ključne reči: *Agrobacterium rhizogenes*, alelopatija, antioksidativni enzimi, *Chenopodium murale*, fenolne kiseline, genetička transformacija, geni ćelijskog ciklusa, *hairy roots*, qPCR, *rol* geni

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj: 577.2:581.1(043.3)

Allelopathic effects of *Chenopodium murale* L. hairy roots *in vitro*

ABSTRACT

Root system produces and releases chemical compounds with allelopathic activity. Isolation and characterization of these metabolites, as well as investigation of their effects on other organisms, are very complicated processes. The aim of the present study was to initiate and establish *Chenopodium murale* L. transgenic hairy root *in vitro* culture system, as a new tool for allelopathic assays.

Transgenic hairy roots were induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS from roots, cotyledons, leaves and internodes of *C. murale* seedlings. Roots were found to be the best target explants, providing transformation efficiency of up to 11.1%. Established 13 hairy root clones differed in their morphology and growth potential. The liquid culture system of characterized hairy root clones was maintained for over two years. Molecular characterization of these clones was carried out by PCR, RT-PCR and histochemical GUS analyses. No differences in *rol* gene presence were observed.

We investigated allelopathic effect of wild-type and hairy root growth media (phytotoxic media) against germination and seedling development of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, wheat (*Triticum aestivum* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) test plants. The inhibitory potential varied depending on the test plant and hairy root clone. R1 and R8 clones had strong allelopathic effects. These results revealed that hairy roots as an independent system synthesize some bioactive substances with allelopathic activity and exude them into the growth medium.

In test plants *A. thaliana* and wheat, after treatment with phytotoxic media, activity of different antioxidative enzymes (catalase, peroxidase and superoxide dismutase) were analyzed spectrophotometrically and electrophoretically. Activities of these antioxidative enzymes were higher in comparison to the control, except the catalase activity in *A. thaliana*, which was the same or lower. Phytotoxic media from different hairy root clones cause different changes in activities of catalases, peroxidases and superoxide dismutases in test plants.

Allelopathic interactions implicate the inhibition of cell division by allelochemicals. We investigated expression of cell cycle-related genes (*CDK* and *CYC*) in test plant *A. thaliana* and wheat, after phytotoxic medium treatment of clone R8. We demonstrated, by q-PCR method, that expression of genes involved in G1-to-S and G2-to-M transition were significantly down-regulated by phytotoxic medium of clone R8 in root and shoot apices of test plants, indicating inhibition of DNK synthesis and mitosis. Homologous genes of *A. thaliana* and wheat (*CDKA;1/CDC2* and *CYCD2;1/CYCD2*) had similar expression profiles, after the treatment with phytotoxic medium.

Concentrations of caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids (0.07 – 2.85 µmol/l) identified and quantified by HPLC analyses in the growth media, were significantly lower than the inhibitory active concentration of pure grade phenolic acids when applied to *A. thaliana* (0.5 mmol/l) or wheat and lettuce (5.0 mmol/l, both), suggesting that phenolic acids have a limited role in the allelopathic phenomena of *C. murale*. The presented hairy root system appears to be a suitable tool for further investigation of the potential and nature of root-mediated allelopathic interference of *C. murale*.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, allelopathy, antioxidant enzyme, *Chenopodium murale* L., phenolic acids, genetic transformation, cell cycle-related genes, *hairy roots*, qPCR, *rol* genes

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 577.2:581.1(043.3)

SADRŽAJ

strana

SKRAĆENICE

1. UVOD	1
1.1. <i>Chenopodium murale</i> L. – alelopatska biljka – klasifikacija, botaničke karakteristike i rasprostranjenost	1
1.2. Alelopatija	2
1.2.1. Negativne interakcije između biljaka koje su posredovane eksudatima korena	5
1.2.2. Alelopatski efekat <i>C. murale</i>	7
1.2.3. Fenolna jedinjenja kao alelopatske supstance	7
1.2.4. Fenolne kiseline	9
1.2.5. Metode za proučavanje interakcija koje su posredovane eksudatima korenova	10
1.3. Genetička transformacija biljaka	13
1.3.1. Genetička transformacija biljaka posredstvom agrobakterija	14
1.3.2. Kultura transformisanih korenova (<i>hairy roots</i>)	17
1.3.3. Primene kultura transformisanih korenova	17
1.3.4. Transformacija biljaka roda <i>Chenopodium</i>	20
1.4. Oksidativni stres i antioksidativni sistem biljaka	20
1.4.1. Katalaze (CAT)	23
1.4.2. Peroksidaze (POX)	24
1.4.3. Superoksid dismutaze (SOD)	25
1.5. Geni ćelijskog ciklusa	26
1.5.1. Aktivacija kompleksa CYC/CDK	29
1.5.2. Mogući model ćelijskog ciklusa kod biljaka	30
2. CILJEVI RADA	33
3. MATERIJAL I METODE	34

3.1. Biljni material	34
3.2. Kultura <i>in vitro</i>	35
3.2.1. Hranljive podloge	35
3.2.2. Uslovi gajenja kultura	35
3.2.3. Sterilizacija pribora i medijuma	35
3.3. Tretman citokininima radi regeneracije pupoljaka na transformisanim korenovima <i>C. murale</i>	37
3.4. <i>Agrobacterium</i> vektor	37
3.5. Transformacija i uspostavljanje kultura transformisanih korenova <i>C. murale</i>	37
3.6. Histochemijska analiza potencijalno transformisanih korenova <i>C. murale</i>	38
3.7. Molekularna karakterizacija transformisanih korenova <i>C. murale</i>	39
3.7.1. PCR analiza	39
3.7.2. RT-PCR analiza	42
3.8. Karakterizacija rasta transformisanih korenova <i>C. murale</i>	45
3.9. Histocitološka karakterizacija transformisanih korenova <i>C. murale</i>	46
3.10. Efekti fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka: arabidopsisa, pšenice i salate	46
3.11. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima kod tretiranih test biljaka	48
3.11.1. Izolacija ukupnih proteina	48
3.11.2. Nativna elektroforeza (<i>Native PAGE</i>)	49
3.11.2.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza	49
3.11.2.1.1. Inhibicija različitih izoformi katalaza kod arabidopsisa	50
3.11.2.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza	50
3.11.2.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza	50
3.11.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti antioksidativnih enzima	51
3.11.3.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza	51
3.11.3.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza	50
3.11.3.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza	52

3.12. RT–PCR i qPCR analiza ekspresije gena ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa i pšenice	53
13.12.1. Priprema standarda za qPCR	56
3.13. Analiza fenolnih jedinjenja i šećera u fitotoksičnim medijumima	61
3.13.1. Određivanje količine ukupnih fenolnih jedinjenja	61
3.13.2. HPLC analiza fenolnih jedinjenja	61
3.13.3. HPLC analiza šećera	62
3.14. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje i rast test biljaka	63
3.15. Statistička analiza	63
4. REZULTATI	64
4.1. Transformacija <i>C. murale</i>	64
4.1.1. Transformacija <i>C. murale</i> pomoću <i>A. rhizogenes</i> A4M70GUS i histohemijska (GUS) analiza potencijalnih transformanata	64
4.1.2. Dokazivanje prisustva transgena pomoću PCR i RT–PCR analize	68
4.1.3. Optimizacija i karakterizacija rasta različitih klonova transformisanih korenova <i>C. murale</i>	70
4.1.4. Histocitološka karakterizacija transformisanih korenova <i>C. murale</i>	74
4.1.5. Pokušaj regeneracije izdanaka na transformisanim korenovima <i>C. murale</i>	80
4.2. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka	81
4.2.1. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje semena i rast klijanaca arabidopsisa	81
4.2.2. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje semena i rast klijanaca pšenice	85
4.2.3. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje semena i rast klijanaca salate	88
4.3. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima kod test biljaka tretiranih fitotoksičnim medijumima	89

4.3.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca arabidopsisa	90
4.3.1.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza	90
4.3.1.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza	92
4.3.1.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza	94
4.3.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca pšenice	96
4.3.2.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza	96
4.3.2.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza	98
4.3.2.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza	100
4.3.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca arabidopsisa	102
4.3.3.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza	102
4.3.3.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza	103
4.3.3.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza	104
4.3.4. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca pšenice	105
4.3.4.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza	105
4.3.4.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza	106
4.3.4.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza	108
4.4. Određivanje nivoa ekspresije gena regulatora ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa i pšenice tretiranih fitotoksičnim medijumom	109
4.5. Analiza fenolnih jedinjenja i šećera u fitotoksičnim medijumima	121
4.5.1. Određivanje količine ukupnih fenolnih jedinjenja	121

4.5.2. HPLC analiza fenolnih jedinjenja	122
4.5.3. HPLC analiza šećera	124
4.6. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca test biljaka	126
4.6.1. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca arabidopsisa	126
4.6.2. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca pšenice	129
4.6.3. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca salate	132
5. DISKUSIJA	135
5.1. Genetička transformacija <i>C. murale</i> pomoću <i>A. rhizogenes</i> A4M70GUS	135
5.2. Alelopatški efekti fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka	140
5.3. Analiza antioksidativnih enzima kod test biljaka tretiranih fitotoksičnim medijumima	143
5.4. Određivanje ekspresije gena regulatora ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa i pšenice	145
5.5. Analiza fenolnih jedinjenja i šećera u fitotoksičnim medijumima i ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca test biljaka	149
6. ZAKLJUČCI	153
7. LITERATURA	156
BIOGRAFIJA AUTORA	183
Prilog 1 – Izjava o autorstvu doktorskog rada	
Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Prilog 3 – Izjava o korišćenju doktorskog rada	

SKRAĆENICE

$^1\text{O}_2$ – singlet kiseonik

35S *CaMV* (*cauliflower mosaic virus*) – promotor 35S mozaičnog virusa karfiola

4-CPPU – N-(2-hloro-4-piridil)-N-fenilurea

AA – askorbinska kiselina

AOX – alternativne oksidaze

APX – askorbat peroksidaza

AT – aminotriazol

BM – bazalni medijum

BOA – 2-*tert*-butil-4-hidroksianizol

BSA (*bovine serum albumin*) – goveđi serum albumin

C (*caffeic acid*) – kafeinska kiselina

CAT (*catalase*) – katalaza

CDC (*cell division cycle*) geni – geni ćelijske deobe

CDK (*cyclin dependent kinase*) geni – geni kinaza zavisnih od ciklina

cDNK (*complementary DNA*) – komplementarni lanac DNK

CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) – heksadecil-trimetil-amonijum bromid

CYC (*cyclin*) – ciklin

CYC geni – ciklinski geni

DEPC (*diethylpyrocarbonate*) – dietil dikarbonat

DHA – dehidroaskorbinska kiselina

DIBOA – 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on

DIMBOA – 2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – dezoksiribonukleniska kiselina

DTT – ditiotreititol

E2F – faktor transkripcije

EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamin tetrasirćetna kiselina

EGA (*equivalent of gallic acid*) – ekvivalent galne kiseline

FM – fitotoksičan medijum

GPX – glutation peroksidaza

GSH – redukovani glutation

GSSG – oksidovani glutation

GUS – β -D-glukuronidaza-kisela hidrolaza iz *E. coli*

H₂O₂ – vodonik peroksid

HO₂[·] – perhidroksil radikal

HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) – tečna hromatografija pod visokim pritiskom

ICK – protein koji inhibira CDK

K-P pufer – kalijum-fosfatni pufer

MDHA – monodehidro askorbat

MS hranljiva podloga – *Murashige* i *Skoog* hranljiva podloga

mT – meta-topolin

NADPH – koenzim nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NBT (*nitrotetrazolium blue chloride*) – nitrotetrazolijum hlorid

O₂^{·-} – superoksidni anjon radikal

O₃ – ozon

OH[·] – hidroksil radikal

PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

p-C (*p-coumaric acid*) – p-kumarinska kiselina

PCR (*polymerase chain reaction*) – reakcija lančanog umnožavanja

PEB – pufer za ekstrakciju proteina

PMSF – fenilmetansulfonil fluorid

POX – peroksidaza

PrxR – peroksiredoksin

PVPP – polivinil polipirrolidon

qPCR (*quantitative PCR*) – kvantitativni PCR

Rb protein – retinoblastoma protein

RNK – ribonukleinska kiselina

RO[•] – alkoksil radikal

rol geni – (*root locus*) geni

ROS – (*reactive oxygen species*) – reaktivne kiseonične vrste

RT (*reverse transcription*) – reverzna transkripcija

SOD – superoksid dismutaza

TBE – Tris–boratni–EDTA pufer

T–DNK (*transferred DNA*) – deo Ti plazmida koji se integriše u biljni genom

TDZ – tiazuron

TEMED – N,N,N',N'–tetrametiletan–1,2–diamin

Thr – treonin

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

Tyr – tirozin

vir (*virulence*) geni –geni virulencije

X–Gluc – cikloheksilamonijumska so 5–bromo–4–hloro–3–indolil–β–D–glukuronske kiseline

YEB – *yeast extract broth* podloga

β–ME – β–merkaptetanol

1. UVOD

1.1. *Chenopodium murale* L. – alelopatska biljka – klasifikacija, botaničke karakteristike i rasprostranjenost

Chenopodium murale L. pripada rodu *Chenopodium*, porodici *Amaranthaceae*, redu *Caryophyllales*, klasi *Magnoliopsida* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>). Naziv roda potiče od grčke reči "chen" (guska) i "podion" (nožica) zbog toga što izgled lista podseća na guščiju nogu (Josifović i sar., 1972).

Chenopodiaceae su jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, retko su šiblje ili nisko drveće. Kod nas *Chenopodiaceae* rastu kao korovi rašireni na napuštenim zemljištima, pored puteva i na gradskim ulicama.

Rod *Chenopodium* obuhvata preko 200 vrsta rasprostranjenih većinom u umerenoj klimatskoj zoni. Najpoznatiji predstavnici su: *Chenopodium album*, loboda – kosmopolitski korov, *Chenopodium murale* – pepeljuga, *Beta vulgaris* var. *altissima* – šećerna repa i *Spinacia oleracea* – spanać.



Slika 1. *Chenopodium murale* L.

Biljka *C. murale* (Slika 1) je visoka 20 – 80 cm, otvorenozelene boje, sa listovima koji su u početku brašnastog izgleda, a kasnije sjajnog. Stablo je uspravno i jako razgranato. Listovi su manje–više jednake veličine, jajasto–rombični, deltoidni ili trouglasto–deltoidni, šiljati, po obodu zupčasti. Petiola je mnogo kraća od lista. Cvetovi su dvopolni, krupni, petodelni, sakupljeni u grozdaste ili račvaste cvasti. Lisni omotač potpuno prekriva plod. Semenka je široka 1,0 – 1,5 mm, oštra, rošavog oboda i gusto–tačkaste, nejasne površine. Biljka može proizvoditi i do 24000 semena.

C. murale se kao dugodnevna biljka pokazala kao dobar objekat za proučavanje fotoperiodske i hormonalne regulacije cvetanja (Machačkova i sar., 1993; Mitrović i sar., 2000a, b; Mitrović i sar., 2003).

Vrste roda *Chenopodium* sadrže različite sekundarne metabolite kao što su: različite vrste flavonoida, fenolnih jedinjenja, saponina, ugljenih hidrata, sterola, alkaloida i kumarina (Ahmad i sar., 2003; Ibrahim i sar., 2007), pa se zbog toga koriste u narodnoj medicini. Zbog antibakterijskih svojstava *C. murale* se primenjuje u meksičkoj tradicionalnoj medicini za tretmane gastrointestinalnih tegoba (Alanis i sar., 2005; Calzada i sar., 2006). Određeni flavonoidi, koji su izolovani iz *C. murale*, imaju antihipertenzivnu aktivnost (Ahmad i Elmazar, 1997). Mladi listovi *C. murale* su jestivi (Grlić, 1986).

1.2. Alelopatija

Alelopatija (od latinske reči “*allelon*” – jedni na druge i “*pathos*” patiti, podnositi) podrazumeva, u širem smislu, inhibiciju jednog organizma posredstvom hemijskih jedinjenja drugog organizma (biljka–biljka, biljka–mikroorganizam, mikroorganizam–mikroorganizam i slično), dok u užem smislu podrazumeva inhibiciju razvoja jedne biljke hemijskim jedinjenjima druge biljke (Bais i sar., 2006).

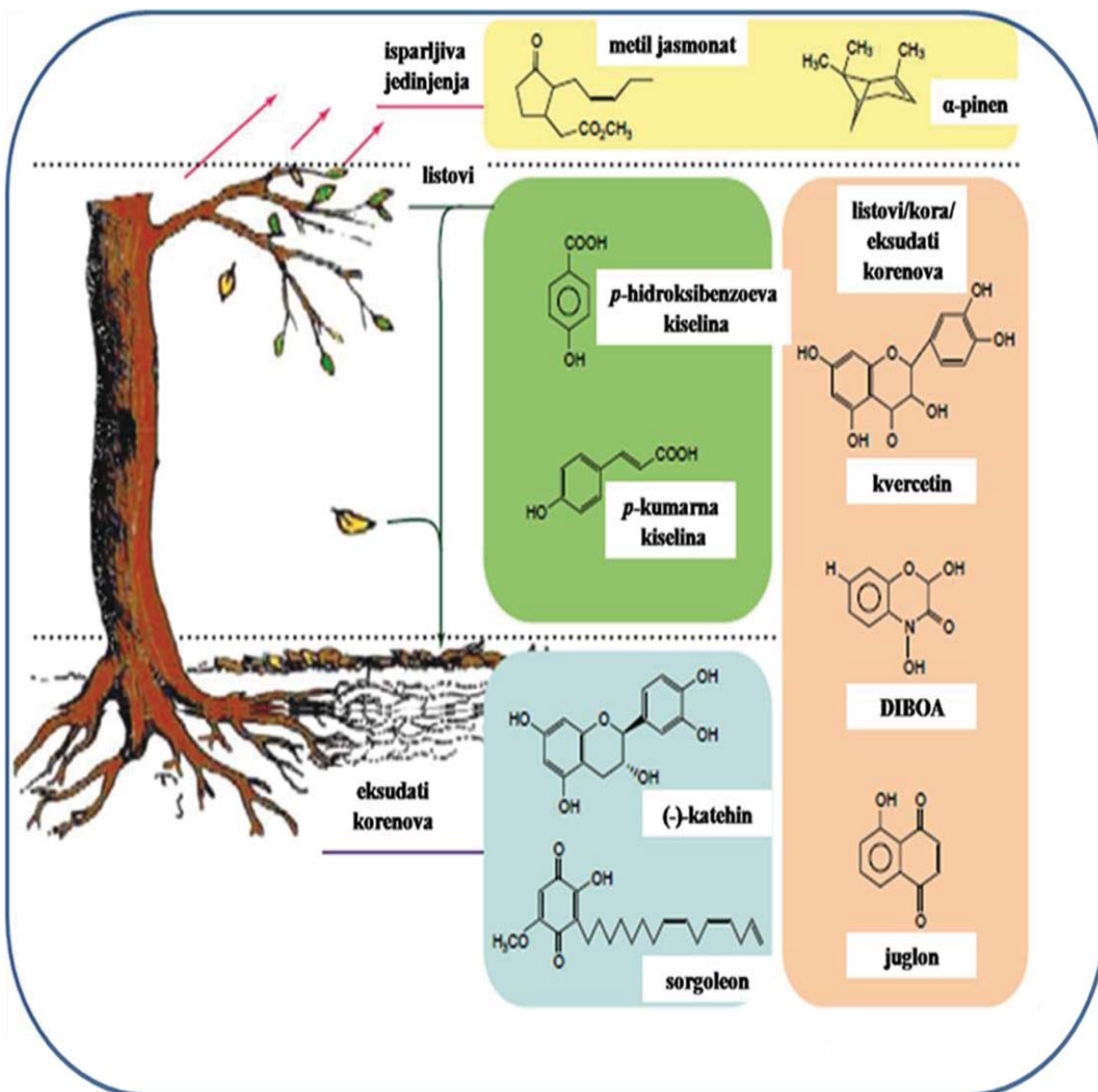
Tokom dve hiljade godina alelopatija je označavana kao biljna interferencija ili sukob interesa biljaka (Li i sar., 2010). Najranija zapažanja o alelopatiji korova i useva sreću se kod Teofasta, “oca botanike”, koji je 300. godine pre nove ere pisao u svojim botaničkim radovima o tome kako leblebija (*Cicer arietinum*) iscrpljuje zemljište i uništava

korov. Katon Stariji (234 – 140. god. pre nove ere), čuveni rimski političar i književnik, u svojoj knjizi je, takođe, pisao kako leblebija i ječam (*Hordeum sativum*) uništavaju zemljište na kome rastu. On pominje i da su stabla oraha (*Juglans regia*) toksična za druge biljke. Austrijski biljni fiziolog Hans Molisch je 1937. godine za ovaj oblik međusobnog biljnog uticaja u savremenu nauku uveo termin alelopatija i zbog toga se on smatra ocem alelopatije. Međunarodno društvo za alelopatiju je 1996. godine definisalo alelopatiju kao bilo koji proces u kome učestvuju sekundarni metaboliti produkovani od strane biljaka, mikroorganizama, virusa ili gljiva, koji deluje pozitivno ili negativno, na rast i razvoj poljoprivrednih i bioloških sistema, isključujući životinje (Torres, 1996). Mada se definicija alelopatije menjala kroz vreme, definicija koju je Molisch dao kao inhibitorski uticaj jedne biljke na drugu biljku, predstavlja osnovnu definiciju kojom se služe brojni autori, koji se danas bave proučavanjem alelopatijskih interakcija među biljkama (Blum, 2011). Mi ćemo dalje u ovom radu govoriti o alelopatiji u užem smislu, odnosno o interakciji biljka–biljka.

Supstance koje se oslobađaju iz biljaka i imaju alelopatijsko dejstvo su označene kao alelohemikalije. Većina njih pripada sekundarnim metabolitima. Uloga većine sekundarnih metabolita u samoj biljci je nepoznata, ali se zna da neki od njih mogu imati strukturnu ulogu (u lignifikaciji) ili učestvuju u opštem odbrambenom odgovoru biljke na napad herbivora ili patogena (Niemeyer i Perez, 1995).

Alelohemikalije se mogu naći u raznim delovima biljaka, uključujući koren, rizom, listove, koru stabla, cvetove, plod i polen. One se oslobađaju u spoljašnju sredinu evaporacijom iz nadzemnih delova biljke (etarska ulja), eksudacijom iz korena i raspadanjem izumrlih delova biljke (npr. otpali listovi), što je prikazano na Slici 2.

Alelohemikalije mogu delovati na nivou klijanja, rasta i razvoja osetljivih biljaka. Najčešće promene koje izazivaju su inhibicija ili retardacija klijanja semena, izduživanja koleoptila, razvoja korena i izdanka klijanaca.



Slika 2. Alelohemikalije mogu biti zastupljene u različitim delovima biljaka: kori, listovima, korenovima ili plodovima i mogu se izlučivati preko eksudata korenova ili se mogu oslobađati kao isparljiva jedinjenja. Na slici je predstavljeno nekoliko alelohemikalija, kao i njihovi načini oslobađanja iz biljke. Modifikovano prema Weir i sar. (2004).

Alelopatske interakcije između biljaka su izučavane i u kontrolisanim i u prirodnim uslovima. U poljoprivrednim sistemima alelopatske interakcije mogu da budu deo interferencije između gajenih kultura, ali i između useva i korova. Na taj način one mogu

značajno da utiču na produktivnost poljoprivrednih kultura. Nedavno je iz toga i proizašla ideja o alelopatiji kao perspektivnoj strategiji za kontrolu korova (Inderjit i Keating, 1999; Kruse i sar., 2000). Tako se alelopatska aktivnost pojedinih useva, kao što je na primer pirinač, već delimično koristi u kontroli korova. Postoji mogućnost da se pomoću genetičkog inženjeringa dobiju biljke sa unapređenim alelopatskim svojstvima. Izolacijom, identifikacijom i sintezom aktivnih komponenti iz alelopatskih biljaka mogu se dobiti jedinjenja koja bi se koristila kao "prirodni herbicidi" (Duke, 1998).

1.2.1. Negativne interakcije između biljaka koje su posredovane eksudatima korena

Korenov sistem u kontinuitetu stvara i oslobađa u spoljašnju sredinu biološki aktivne produkte (Bais i sar., 2001). Iz korenova se izlučuju joni, kiseonik, voda, enzimi i različiti primarni i sekundarni metaboliti (Bertin i sar., 2003; Uren, 2000). Značajan gubitak sadržaja ugljenika iz biljke se dešava tokom eksudacije (Marschner, 1995) i on varira u zavisnosti od tipa zemljišta na kome biljka raste, kao i od fiziološkog stanja i starosti biljke.

Prema načinu na koji se izlučuju kroz ćelijsku membranu, postoje tri klase eksudata korenova. Prvu grupu čine jedinjenja, kao što su amino kiseline, organske kiseline, šećeri i fenolna jedinjenja. Oni se iz ćelija korena, gde je njihova koncentracija veća, izlučuju u spoljašnju sredinu (zemljište), gde je njihova koncentracija manja, putem difuzije tj. pasivnog transporta (Guern i sar., 1987). Drugu grupu eksudata čine soli organskih kiselina: citrati, malati, oksalati i slična jedinjenja, koja se izlučuju u zemljište pomoću jonskih kanala (Neuman i sar., 1999). Treću grupu predstavljaju jedinjenja velike molekulske mase, kao što su polisaharidi i proteini. Oni se izlučuju putem vezikularnog transporta (Battey i Blackbourn, 1993).

Različiti fitotoksini iz eksudata korenova utiču na produkciju metabolita, fotosintezu, disanje, transport kroz membranu, klijanje, rast korenova, rast izdanaka i ćelijsku smrt kod osetljivih biljaka (Einhellig, 1995; Weir, 2004). Identifikovane

alelohemikalije koje ispoljavaju ove uticaje se na osnovu svoje strukture i svojstava mogu svrstati u 10 kategorija (Li i sar., 2010) što je prikazano u Tabeli 1.

Tabela 1. Kategorije alelohemikalija na osnovu strukture i svojstava prema Li i sar. (2010).

1.	organske kiseline rastvorljive u vodi
	nerazgranati alkoholi
	alifatični aldehidi
	ketoni
2.	prosti nezasićeni laktoni
3.	masne kiseline dugog niza i poliacetileni
4.	benzohinoni, antrahinoni i kompleksni kinini
5.	fenoli
6.	cinamična kiselina i njeni derivati
7.	kumarini
8.	flavonoidi
9.	tanini
10.	steroidi i terpenoidi (seskviterpenski laktoni, diterpeni i triterpenoidi)

Svi mehanizmi dejstva alelopatskih supstanci još uvek nisu dovoljno proučeni. Alelohemikalije mogu izazvati nekoliko efekata na ćelijskom nivou, kao što su gubitak integriteta plazma membrane i nekontrolisano odavanje jona (Galindo i sar., 1999), inhibiciju fotosintetskog i respiratornog elektronskog transporta (Abrachim i sar., 2000; Galindo i sar., 1999; Penuelas i sar., 1996), kao i inhibiciju ćelijskih deoba (Anaya i Pelayo–Benavides, 1997).

Jedan od potencijalno direktnih alelohemijskih efekata koji dovodi do ćelijske smrti se ostvaruje stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (*reactive oxygen species, ROS*) koje dovode do oksidativnog stresa u ciljnoj ćeliji. Bais i sar. (2002) su pokazali da katehini, oslobođeni iz korenova *Centaurea maculosa*, mogu izazvati povećanje *ROS* produkcije u korenovima osetljivih biljaka. Da alelohemikalije dovode do povećanja oksidativnog stresa pokazali su i Cruz–Ortega i sar. (2002) i Romero–Romero (2005). Kamal i sar. (2009) i

Weir i sar. (2004) su pokazali da stres u okruženju biljke dovodi do aktiviranja antioksidativnog enzimskog sistema koji uključuje katalaze (CAT), superoksid dismutase (SOD) i peroksidaze (POX). Tokom oksidativnog stresa izazvanog alelohemikalijama dolazi do lipidne peroksidacije u ćelijskim membranama čime se narušava integritet membrana i aktivan transport kroz njih. Alelohemikalije rastvorene u vodi tada u većoj meri ulaze u koren (Cruz–Ortega i sar., 2002; Polyticka, 1996), a elektroliti se gube iz napadnutih korenova. Kod biljaka arabidopsisa, tretiranih katehinom, dolazi do povećane ekspresije gena koji su uključeni u regulaciju antioksidativnih procesa (Bais i sar., 2003b).

1.2.2. Alelopatski efekat *C. murale*

Nekoliko studija ukazalo je na alelopatski efekat *C. murale* na korovske i gajene biljke (Porwal i Gupta, 1986; Datta i Ghosh 1987; Qasem, 1990, 1995; Holm i sar., 1997). El–Kathib i sar. (2004a) su ustanovili da zemljište na kome su rasle biljke *C. murale*, kao i zemljišta sa ostacima biljaka *C. murale*, inhibiraju rast klijanaca *Trifolium alexandrinum*, *Triticum aestivum*, *Melilotus indicus*, *Lycopersicum esculentum* i *Cucumis sativus*. Dalja istraživanja (El–Khatib i sar., 2004b) su pokazala da alelohemikalije poreklom iz *C. murale* imaju fitotoksičan efekat na rast i razvoj test biljaka: *Melilotus indicus*, *Trifolium alexandrinum*, *Triticum pyramidal*, *Lycopersicon esculentum* i *Cucumis sativus*. Nedavna istraživanja Batisha i sar. (2007a, b) su otkrila da *C. murale* alelopatski utiče na pšenicu, leblebiju i grašak, oslobađajući fenolne kiseline kao moguće alelohemikalije u zemljište.

1.2.3. Fenolna jedinjenja kao alelopatske supstance

Fenolna jedinjenja čine značajnu grupu alelohemikalija. Oni su najzastupljenija grupa sekundarnih metabolita koji se u biljkama sintetišu tokom različitih faza rastenja i razvića. Fenolna jedinjenja pokazuju izuzetnu raznolikost, kako između različitih biljnih vrsta, tako i u različitim tkivima iste biljne vrste. U hemijskom pogledu fenolna jedinjenja

su jedinjenja sa jednom ili više hidroksilnih grupa koje su direktno vezane za aromatični ugljovodonični prsten. S obzirom na veliku raznovrsnost biljnih fenolnih jedinjenja, njihova klasifikacija je veoma kompleksna. Stoga se u literaturi često navode različite klasifikacije ovih jedinjenja. Jedna od prihvaćenih klasifikacija je prikazana u Tabeli 2.

Tabela 2. Podela fenolnih jedinjenja prema Robards-u (1999).

osnovni skelet	klasa	primer
C6	jednostavna fenolna jedinjenja	katehol
	benzohinoni	hidrohinon, rezorcinol
C6-C1	fenolne kiseline	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
C6-C2	fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -hidroksifenilsirćetna kiselina
C6-C3	fenilpropeni	eugenol, mirsticin
	kumarini	umbeliferon, eskuletin, skopolin
	hromoni	eugenin
C6-C4	naftohinoni	juglon
C6-C1-C6	ksantoni	mangostin, mangiferin
C6-C2-C6	stilbeni	resveratrol
	antrahinoni	emodin, hrizofanol, rein
C6-C3-C6	flavonoidi	sinensetin, nobiletin, izosinensitin
	flavoni	tangeretin, diosmin
	flavonoli	kvercetin, kempferol
	flavonol glikozidi	rutin
	flavanoli	dihidroksikvercetin i dihidroksikempferol glikoizdi
(C6-C3) ₂	lignini	pinorezinol
(C6-C3-C6) ₂	biflavonoidi	agatisflavon

Fenolna jedinjenja uključeni u alelopatske interakcije izazivaju sledeće promene kod osetljivih biljaka:

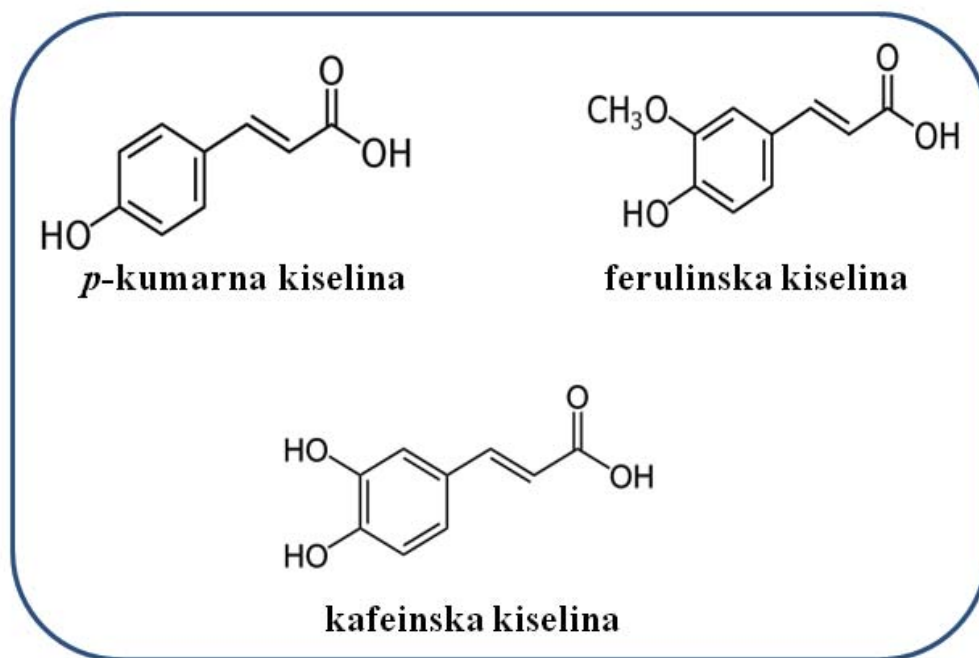
1. promene u propustljivosti ćelijske membrane i inhibiciju apsorpcije hranljivih materija
2. inhibiciju elongacije, ćelijskih deoba i promene u ćelijskoj strukturi

3. promene u procesima fotosinteze i respiracije
4. promene u funkciji i aktivnosti različitih enzima
5. promene u sintezi endogenih biljnih hormona
6. promene u sintezi proteina.

1.2.4. Fenolne kiseline

Kao najzastupljenije fenolne alelohemikalije kod *C. murale* pominju se fenolne kiseline (Batish i sar., 2007a, b). Fenolne kiseline se dele na derivate cimetine i hidroksibenzoeve kiseline. Najzastupljeniji derivati hidroksibenzoeve kiseline su *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. U prirodi su derivati cimetine kiseline: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina, više zastupljeni u odnosu na derivate hidroksibenzoeve kiseline. Kafeinska kiselina (Slika 4) je izolovana iz kafe i u slobodnom i esterifikovanom obliku je najzastupljenija fenolna kiselina koja čini 75 do 100% ukupnog sadržaja derivata cimetine kiseline u voću. Ferulinska kiselina (Slika 4) je glavna fenolna kiselina koja nastaje u ćelijskim zidovima monokotila. Ona se nalazi u pšenici, kukuruzu, raži, spanaću, šećernoj repi i kestenu u esterifikovanom obliku, a retko u slobodnoj formi kao što je u ječmu (Daayf i Lattanzio, 2008). *p*-Kumarinska kiselina (Slika 4) se sreće kod velikog broja biljaka koje se koriste u ishrani, kao što su paradajz, šargarepa, kikiriki i beli luk.

Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku, dok je većina vezana estarskom, etarskom ili acetatnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka: celulozom, proteinima i ligninom, ili sa manjim organskim molekulima: glukozom, hininskom, maleinskom i vinskom kiselinom, kao i drugim prirodnim proizvodima – npr. terpenima (<http://agroekonomija.wordpress.com/2011/01/18/fenolne-kiseline/>).



Slika 4. Struktura *p*-kumarinske, ferulinske i kafeinske kiseline.

Postoje brojni radovi u kojima su opisani alelopatski efekti fenolnih kiselina na klijanje i razvoj različitih test biljaka, kao i mehanizmi njihovog delovanja (Blum, 2011).

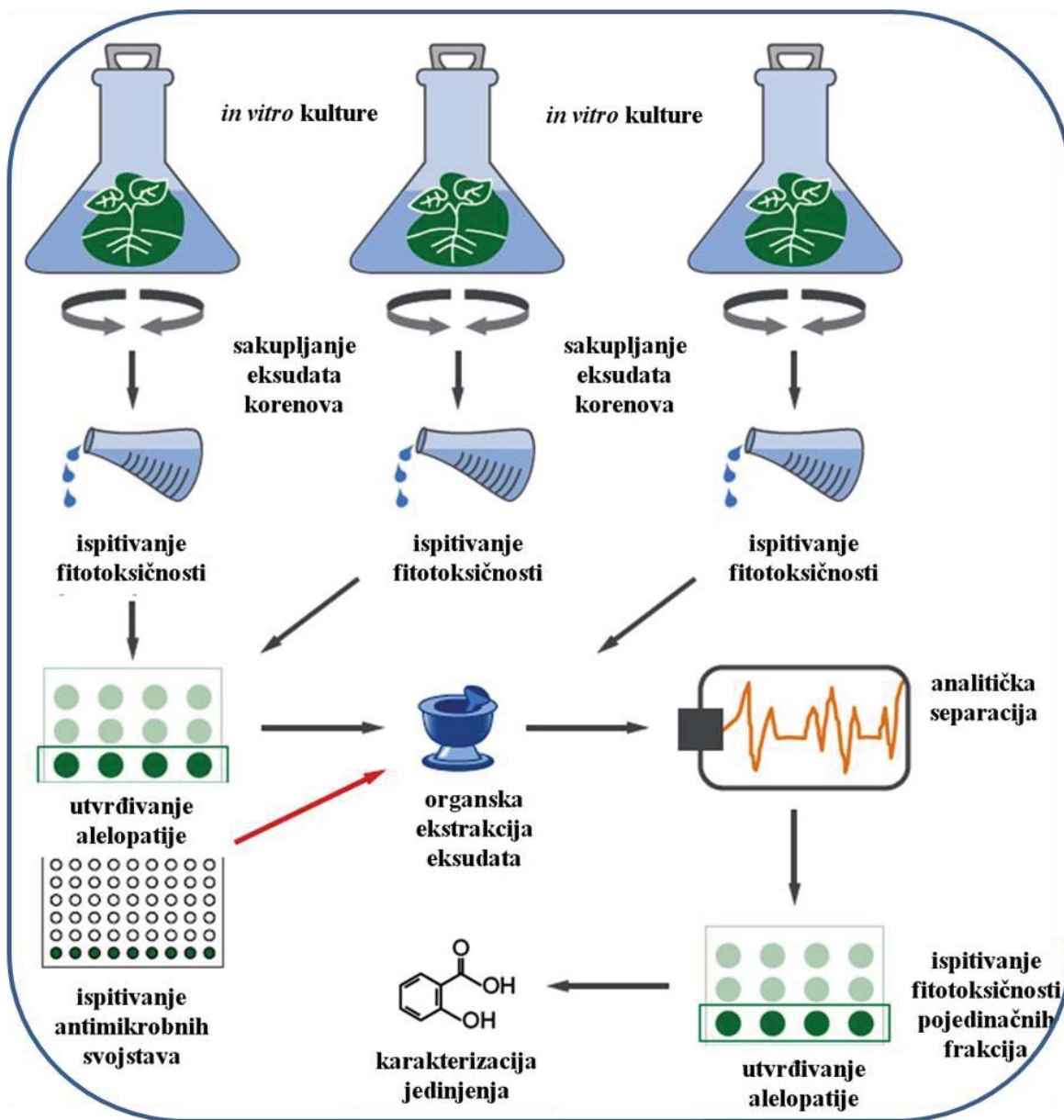
1.2.5. Metode za proučavanje interakcija koje su posredovane eksudatima korenova

Biljke opstaju zahvaljujući produkciji i oslobađanju potencijalnih fitotoksina u spoljašnju sredinu, pri čemu redukuju rast i preživljavanje drugih osetljivih biljaka (Bais i sar., 2006). Mnoge alelopatske biljke su rezistentne na fitotoksine koje same proizvode. “Ne-alelopatske biljke” mogu postati rezistentne na fitotoksine drugih biljaka zahvaljujući odlaganju fitotoksina u vakuolama ili specijalizovanim tkivima ili njihovim izlučivanjem u spoljnu sredinu nakon što su ih apsorbivale (Williamson, 1990). Druge biljke postaju otporne na fitotoksine, menjajući im strukturu, tako da oni postaju manje toksični ili čak neaktivni. Na primer: *Zea mays* se brani od fitotoksina pšenice 2,4-dihidroksi-7-metoksi-

1,4-benzoksazin-3-on (DIMBOA), 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on (DIBOA) i 2-*tert*-butil-4-hidroksianizol (BOA) njihovom glukozilacijom, pri čemu nastaje manje toksično jedinjenje (Sicker i sar., 2001).

Veliku poteškoću za proučavanje interakcija između biljaka posredstvom alelohemikalija koje se oslobađaju iz korena čini to što se procesi odvijaju u rizosferi. Pošto je izolacija i karakterizacija metabolita koji se iz korena izlučuju u zemljište složen i komplikovan proces, neophodno je razviti nove metode za proučavanje ekologije u rizosferi koje će imitirati prirodne uslove, što zahteva angažovanje biljnih fiziologa i ekologa, pri čemu bi se osmislio "rizotron" u kome bi se biohemijska i molekularno-biološka istraživanja vršila *in situ*.

Da bi se dobro proučile alelopatske interakcije neophodno je poznavanje strukture i funkcije korenovog sistema, kao i procesa koji se odvijaju u rizosferi – zajednici korenova, mikroorganizama, nematoda itd. Bais i sar. (2003a) su proučavali eksudaciju, praćenjem fluorescentnih jedinjenja kao markera. Tehnike kulture *in vitro* se, takođe, mogu primeniti u proučavanjima alelopatskih interakcija (Bais i sar., 2003a; 2004). Ukratko, biljke se gaje *in vitro* u aerisanom tečnom medijumu, sakupljaju se eksudati korenova, koncentruju i testira se njihova fitotoksičnost na druge organizme (Slika 3).



Slika 3. Metode koje se koriste za sakupljanje, separaciju i karakterizaciju jedinjenja iz eksudata korenova. Da bi se proučavale interakcije između dve biljke ili biljke i mikroorganizama, koje su posredovane eksudatima korenova jedne biljke, biljke se gaje u aerisanom tečnom medijumu, sakupljaju se eksudati korenova i ispituje se fitotoksičnost eksudata, nakon njihovog koncentrovanja, na test organizme (drugu biljku ili mikroorganizme). Takođe se vrši i organska ekstrakcija eksudata i karakterizacija jedinjenja. Modifikovano prema Bais i sar. (2006).

Uspostavljanje kulture transformisanih korenova moglo bi da predstavlja pogodan model sistem za proučavanje alelopatije *in vitro*. Brzi rast izolovanih korenova, velika produkcija sveže mase, kao i izlučivanje alelohemikalija u sterilne tečne podloge predstavljaju pogodnosti koje pruža kultura transformisanih korenova.

1.3. Genetička transformacija biljaka

Tokom nekoliko prethodnih decenija razvijena je nova oblast biotehnologije koja je nazvana genetičko inženjerstvo, molekularna biotehnologija ili tehnologija rekombinovane DNK. Genetičko inženjerstvo obuhvata niz tehnika pomoću kojih se može manipulirati malim fragmentima genoma, pojedinačnim genima i kraćim prirodnim i sintetičkim sekvencama, u cilju ispitivanja njihove strukture, proučavanja mehanizama putem kojih se reguliše njihova ekspresija, kao i upoznavanja strukture i uloge njihovih proteinskih produkata (Savić–Pavićević i Matić, 2011).

Osnovni koraci u genetičkom inženjerstvu su: identifikacija gena (tj. sekvence DNK) koji treba da se prenesu u ćelije recipijenta, njihovo izolovanje i kloniranje, prenos gena u ćelije recipijenta i njihova integracija u genom, dokazivanje inkorporacije i ekspresije prenetih gena.

Transformacija biljaka podrazumeva stabilnu ugradnju stranih gena u biljni genom (Slater i sar., 2004). Prenos gena se ostvaruje direktnim putem, bombardovanjem mikroprojektilima ili indirektno, prenosom pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium*. Metod genetičke transformacije posredstvom agrobakterija se najčešće koristi za dikotile jer je efikasan i ekonomičan.

1.3.1. Genetička transformacija biljaka posredstvom agrobakterija

Otkriće mehanizma delovanja bakterija *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* (Binns i Campbell, 2001), pokretnih štapićastih gram–negativnih zemljišnih bakterija, bio je ključni događaj koji je doneo revoluciju u genetičkom inženjeringu biljaka.

A. rhizogenes sadrži Ri (*root inducing*) plazmid. U biljnu ćeliju se prenosi deo DNK Ri plazmida koja se označava kao T–DNK (*transferred DNK*). Na mestu infekcije biljke sa *A. rhizogenes* pojavljuju se adventivni korenovi, nazvani *hairy roots*, koji vrlo brzo rastu, obično su jako razgranati i prekrivaju biljku ili izolovani eksplantat (Venna i Taylor, 2007). Kada se izoluju sa biljnog eksplantata i prenesu u sterilnu kulturu na podlogu bez ikakvih stimulatora rastenja, ovi korenovi nastavljaju da se samostalno razvijaju i rastu.

Sojevi *A. rhizogenes* prema opinima koje proizvode svrstani su u četiri grupe: agropinski, manopinski, mikimopinski i kukumopinski (Venna i Taylor, 2007). Opini nastaju kondenzacijom amino kiselina i α –keto kiselina ili ugljenih hidrata. Reakciju katalizuje specifična opin–sintetaza koju kodira gen lociran na T–DNK. Opine proizvode transformisane ćelije, a koriste ih agrobakterije kao izvor ugljenika i azota (Bomhoff i sar., 1976) jer su u stanju da ih katabolišu, za razliku od drugih organizama. Ri–plazmidi agropinskih sojeva bakterija (*pRiA4*, *pRi1855*, *pRi15834*, *pRiHR1* i *pRiLBA9402*) imaju 2 segmenta T–DNK: desni T_R i levi T_L . T_R obuhvata *aux* gene, a T_L *rol* gene (*root locus* gene): *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*. Ostali tipovi Ri–plazmida, manopinski (*pRi8196*), mikimopinski (*pRi1724*) i kukumopinski (*pRi2659*), imaju samo segment koji odgovara T_L DNK. Sva četiri tipa *A. rhizogenes*, bez obzira na prisustvo *aux* gena samo u agropinskom tipu, indukuju korenove, što znači da auksinski geni nisu neophodni za njihovu indukciju.

T–DNK čini oko 10% Ri plazmidne DNK, čiji transport u biljnu ćeliju omogućava bakteriji da eksprimira svoje gene u biljnom organizmu (Baron i Zambryski, 1995). Region Ri plazmida koji učestvuje u procesu infekcije je *vir* region (*virulence region*) veličine 35 kbp, koji se sastoji iz više velikih lokusa ili operona (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virH* i *vir J*). *Vir* geni kodiraju sintezu *vir* proteina neophodnih za bakterijski hemotaksis, vezivanje bakterije za povređenu biljnu ćeliju i transfer T–DNK (Watson i sar., 1975).

Slightom i sar. (1986) su na T_L-DNK regionu identifikovali 18 otvorenih okvira čitanja (ORF). ORF 10, 11, 12 i 15 su White i sar. (1985) označili kao *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*. Među *rol* genima, *rol B* je jedini čija mutacija u potpunosti suprimira indukciju korenova (White i sar., 1985). Zbog toga mu je pripisano centralno mesto u indukciji transformacije. Tri gena (*rolA*, *rolB* i *rolC*) sa pRiA4 T_L-DNK su dovoljna za ekspresiju svih karakteristika *hairy roots* sindroma (Cardareli i sar. 1987; Jouanin i sar., 1987). Pojedinačno *rolA* i *rolB* mogu da indukuju formiranje transformisanih korenova (Cardareli i sar., 1987; Spena i sar., 1987). Gen *rolC* može da indukuje korenove, ali samo ako je indukovano jakim promotorom, kao što je 35S promotor mozaičnog virusa karfiola (CaMV). White i sar. (1985) smatraju da je gen *rolD* važan za transformaciju.

Novija istraživanja su upotpunila prethodna znanja o uticajima *rol* gena na različite aspekte rasta, razvića i metabolizma kod transformanata (Meyer i sar., 2000), kao i na produkciju sekundarnih metabolita (Bulgakov, 2008).

***RolA* geni**

Gen *rolA* kodira polipeptid *rolA*, koji pripada grupi DNK vezujućih proteina (Rigden i Carneiro, 1999). Biohemijska funkcija *rolA* proteina je do danas u velikoj meri nepoznata. Palazon i sar. (1997) su pokazali da *rolA* geni stimulišu produkciju nikotina. Transformisani kalusi *Rubia cordifolia* proizvode 2,8 puta veću količinu antrahinona (poznate alelohemikalije) u poređenju sa kontrolnim kalusima, takođe *rolA* ekspresija omogućuje intenzivan kontinualan rast kalusa već više od 7 godina (Shkryl i sar., 2008).

***RolB* geni**

U odnosu na sve ostale *rol* gene, *rolB* je najjači aktivator sekundarnog metabolizma, ali i najjači supresor ćelijskog rasta. Povećana ekspresija *rolB* gena u kalusima *Rubia cordifolia* uslovljavala je povećanje ekspresije ključnih gena za biosintezu antrahinona (produkcija antrahinona je bila povećana 15 puta), ali i redukciju rasta kalusa (Shkryl i sar., 2008). Interesantno je da geni *rolA* i *rolC*, kada se unesu u recipijentne ćelije zajedno sa *rolB* genima, smanjuju inhibicioni efekat *rolB* gena na rast ćelija kalusa *R. cordifolia*

(Shkryl i sar., 2008). Još ekstremniji primer povećanja produkcije (više od 100 puta) sekundarnog metabolita resveratrola, poznate alelohemikaljske i antikancerogene supstance, zabeležen je kod *rolB* transformisanih ćelija grožđa *Vitis amurensis* (Kiselev i sar., 2007).

Pošto je pokazano da protein rolB ima tirozin fosfataznu aktivnost (Filippini i sar., 1996), istraživači su u dve nezavisne studije inhibirali efekte *rolB* gena primenom tirozin fosfataznih inhibitora, pri čemu je rast ćelija tada bio manje inhibiran, ali je smanjena i produkcija sekundarnih metabolita (Kiselev i sar. 2007; Shkryl i sar., 2008).

***RolC* geni**

Pokazano je da *rolC* u zavisnosti od biljne vrste dovodi do povećanja produkcije alkaloida (Bonhomme i sar., 2000), antrahinona (Bulgakov i sar., 2002; 2003; Shkryl i sar., 2008) i ginsenozida (Bulgakov, 1998) u transformisanim kulturama ćelija i transformisanim biljkama. Takođe, u transformisanim korenovima *Atropa belladonna*, *rolC* prouzrokuje povećanje (12 puta) produkcije hiosciamina i skopolamina, u poređenju sa kontrolnim netransformisanim ćelijama (Bonhomme i sar., 2000). Ekspresija *rolC* gena u ćelijama *Panax ginseng* aktivira transkripciju gena koji kodira biljni odbrambeni protein β -1,3-glukanazu (Kiselev i sar., 2006).

***RolD* geni**

RolD kodira ornitinciklodeaminazu, enzim koji konvertuje ornitin u prolin, što dovodi do kontinualnog rasta transformisanih korenova i bujnog cvetanja regeneranata (Trovato i sar., 2001).

Rol geni učestvuju kao medijatori u neuobičajenim putevima transdukcije signala u biljkama. Pretpostavljalo se da su produkti *rolB* i *rolC* gena proteini glukozidaze koje oslobađaju auksine i citokinine iz njihovih vezanih oblika, tj. glukozida (Estruch i sar., 1991a, b). Nilsson i sar. (1996a, b) iznose suprotno mišljenje, da promene u nivou slobodnih auksina i citokinina nisu u korelaciji sa ekspresijom *rolB* i *rolC* gena. Faiss i sar.

(1996) su pretpostavili da protein rolC deluje kao nespecifična glukozidaza koja hidrolizuje ćelijski zid, utičući tako na rastenje oslobađanjem oligosaharida. Do danas nije otkriveno ništa novo što bi išlo u prilog ovoj pretpostavci.

1.3.2. Kultura transformisanih korenova (*hairy roots*)

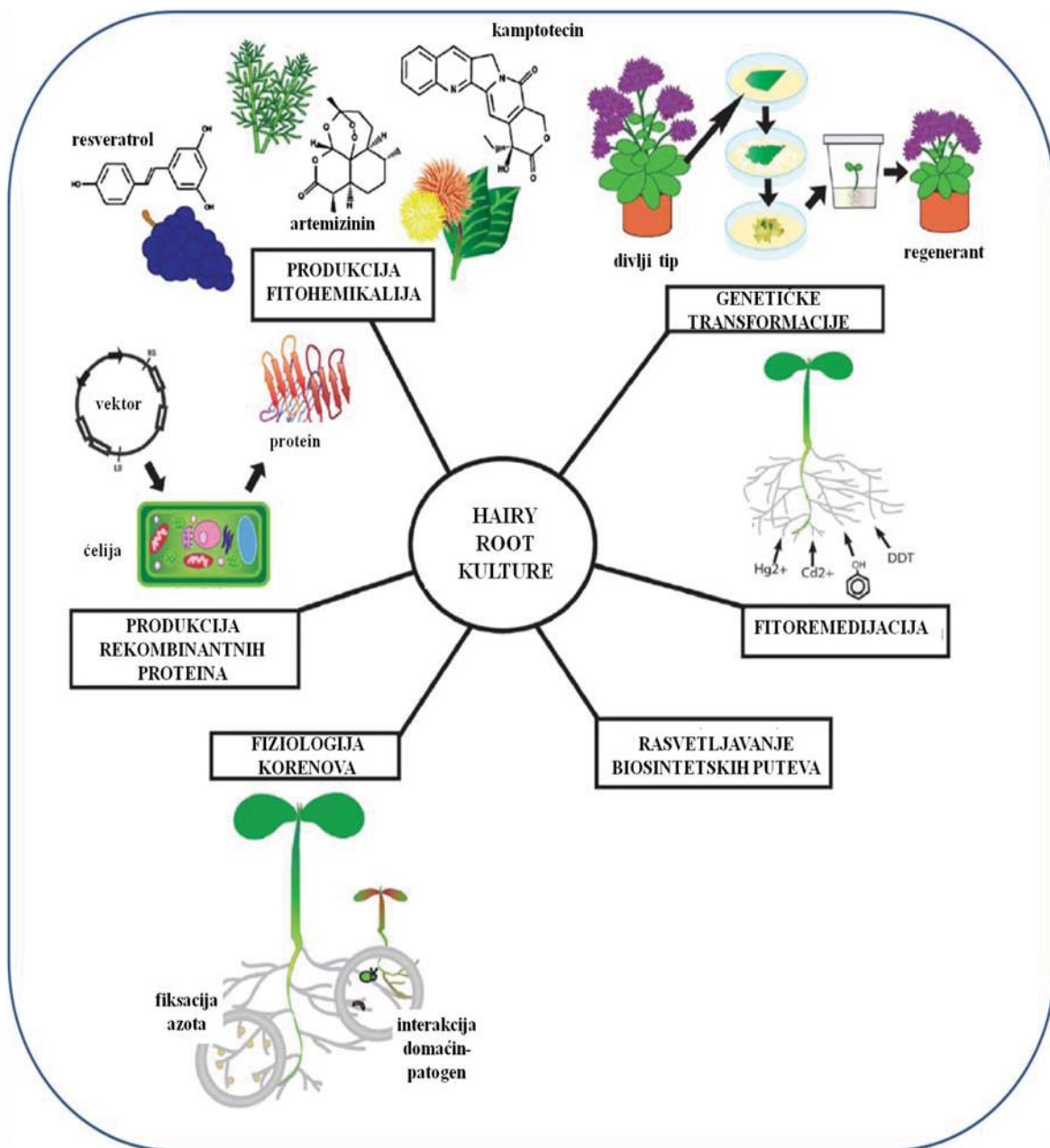
Transformisani korenovi, za razliku od netransformisanih, intenzivno rastu i granaju se u *in vitro* uslovima, na jednostavnom medijumu bez regulatora rasteња pri čemu gube gravitropsku reakciju (Tepfer, 1983; Tepfer i Casse–Delbart, 1987). Klonovi se često morfološki razlikuju po debljini, stepenu grananja, prisustvu ili odsustvu kalusa (Amselem i Tepfer, 1992; Guivarch i sar., 1999). Linije *hairy roots* u prvih nekoliko subkultura mogu pokazati nestabilnost u rastu i razvoju (Guivarch i sar., 1999), ali ako opstanu u narednom periodu se propagiraju vrlo dugo, kao na primer transformisani korenovi *Ajuga reptans* – više od 8 godina (Tanaka i sar., 1998) i *Lotus corniculatus* – više od 5 godina (Cooke i Webb, 1997). Uočeno je višestruko povećanje biomase transformisanih korenova, na primer: 10 puta kod *Lotus corniculatus* (Nikolić i sar., 2003/2004) i 7–19 puta kod *Gentiana sp.* (Momčilović i sar., 2001) tokom 4 nedelje gajenja u tečnoj kulturi *in vitro*.

1.3.3. Primene kultura transformisanih korenova

Hairy roots kulture su uspostavljene kod velikog broja biljnih vrsta. Njihova primena (Slika 5) se sastoji u:

- akumuliranju fitohemikalija (fenolnih jedinjenja, alkaloida i terpenoida) u znatnoj meri; kada se njihov rast optimizuje u tečnim kulturama, mogu se gajiti u industrijskim bioreaktorima za proizvodnju fitohemikalija
- dobijanju regeneranata hortikulturnih biljaka sa određenim karakteristikama (različit fenotip, uniformna veličina, otpornost na patogene, sušu itd.)

- proučavanju procesa fitoremedijacije kada se prati usvajanje toksičnih jedinjenja i reaktivnih boja
- rasvetljavanju biosintetskih puteva određenih poželjnih jedinjenja pomoću molekularnih, biohemijskih i genetičkih proučavanja
- proučavanju uloge korena u procesima fiksacije azota, u interakcijama između domaćina i patogena, u alelopatskim interakcijama, kao i u proučavanju procesa koji se dešavaju u korenovima usled nedostatka gvožđa ili prekomernog prisustva aluminijuma u podlozi
- produkciji rekombinantnih proteina (humana antitela, citokini i drugi terapijski proteini).



Slika 5. Kulture transformisanih korenova se koriste za produkciju fitohemikalija, dobijanje regeneranata hortikulturnih biljaka, fitoremedijaciju, rasvetljavanje biosintetskih puteva, proučavanje fizioloških procesa u korenovima i produkciji rekombinantnih proteina. Modifikovano prema Ono i Tian (2011).

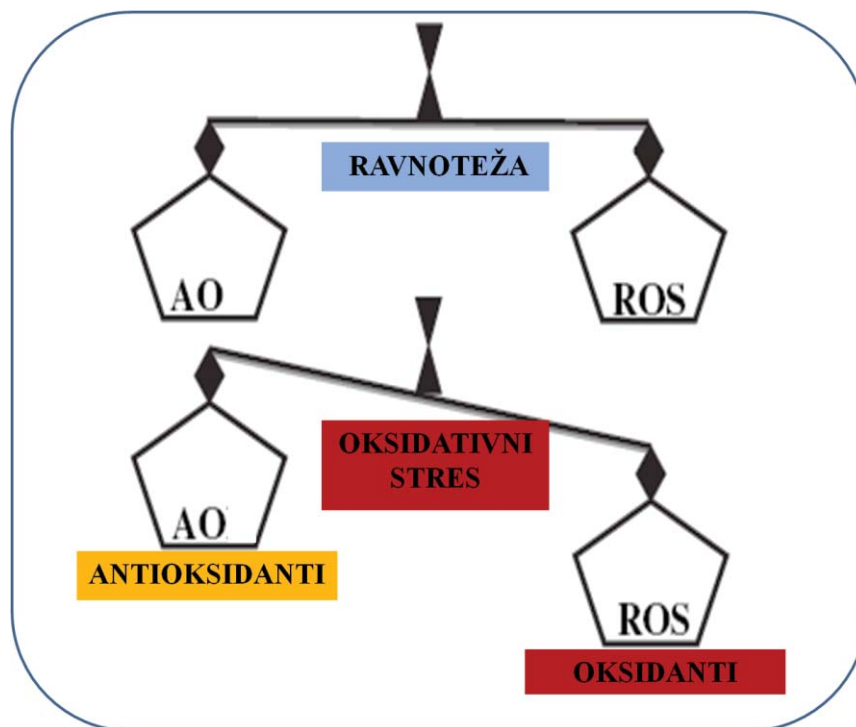
1.3.4. Transformacija biljaka roda *Chenopodium*

Većina dikotiledonih biljaka je osjetljiva na infekciju sa *A. rhizogenes* (Christey, 2001). Kod biljnih vrsta iz familije *Chenopodiaceae* uspešna transformacija bakterijama *A. rhizogenes* je dobijena kod *Beta vulgaris* (Kifle i sar., 1999; Thimmaraju i sar., 2008) i *Spinacia oleraceae* (Ishizaki i sar., 2002). Vrste roda *Chenopodium* su se do sada pokazale kao nepogodni objekti za transformaciju. Podaci o uspešnoj transformaciji postoje jedino za *C. quinoa* gde je ona dobijena u kulturi ćelija (Komari, 1990). Takođe, nedavno je uspostavljena kultura transformisanih korenova kod *C. rubrum* (Dmitrović i sar., 2010). Što se tiče genetičke transformacije *C. murale*, na osnovu našeg saznanja, do danas ne postoje saopštenja o uspešnoj transformaciji ove biljne vrste pomoću *Agrobacterium* vektora.

1.4. Oksidativni stres i antioksidativni sistem biljaka

Ekstremne promene faktora sredine indukuju stres i mogu da dovedu do značajnog oštećenja biljaka. Njihov opstanak zavisi od unutrašnjih mehanizama koji omogućavaju da se te promene podnesu. Uslovi sredine koji izazivaju stres kod jedne biljne vrste mogu da predstavljaju optimalne uslove za rastenje i razviće drugih biljnih vrsta (Slater i sar., 2008). Abiotički stres predstavlja višak ili manjak nekog činioca u fizičkom ili hemijskom okruženju biljke, što mogu biti temperaturni šokovi, suša, soli, osmotski stres, jonizujuće zračenje, mehanički stres, deficit hranljivih materija, herbicidi i zagađivači (teški metali, SO₂ i ozon). Biotički stres izazivaju živa bića: korovi, štetočine (insekti, ptice i glodari) i patogeni (bakterije, virusi, gljive i nematode). U fiziološkom smislu stres predstavlja specifičan odgovor biljaka na negativne faktore koji teže da poremete postojeću ravnotežu (homeostazu) u organizmu (Nilsen i Orcutt, 1996). Suština stresa se ogleda u promenama fiziološkog stanja organizma, koje dovode do ugrožavanja normalnog odvijanja životnih procesa u biljkama (Gaspar i sar., 2002).

Skoro svi tipovi stresa dovode do oslobađanja ROS, pri čemu može nastati oksidativni stres (Asada, 1994; Fridovich, 1998). ROS se proizvode u svim biljkama u različitim stepenima prilikom normalnog aerobnog metabolizma (Asada i Takahashi, 1987; Papadakis i Roubelakis–Angelakis, 2002; Vranova i sar., 2002; Tian i sar., 2003). U normalnim uslovima postoji balans između produkcije i uklanjanja ROS, ali kada su biljke pod stresom produkcija ROS nadmašuje odbrambene antioksidativne kapacitete (Slika 6). U ROS se ubrajaju slobodni radikali kao što su superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal (OH^{\cdot}), perhidroksil radikal (HO_2^{\cdot}), alkoksil radikal (RO^{\cdot}) i molekuli kao što su vodonik peroksid (H_2O_2), singlet kiseonik (1O_2) i ozon (O_3). ROS dovodi do oštećenja membrana, peroksidacije lipida, oštećenja nukleinskih kiselina, agregacije i fragmentacije proteina, kao i do oksidacije pojedinih aminokiselina što oštećene proteine čini podložnim proteolitičkom napadu (Devies, 1987; Bindoli, 1988; Simonović, 2011). Elektron–transportni sistemi hloroplasta i mitohondrija su jedan od glavnih mesta nastanka ROS.



Slika 6. Odnos između oksidativnih i antioksidativnih procesa u uslovima odsustva i prisustva stresa. Modifikovano prema Gill i Tuteja (2010).

Hloroplasti, mitohondrije i peroksizomi su glavne organele u kojima se nalaze antioksidativni sistemi biljne ćelije (Rio i sar., 1998). U uslovima svetla hloroplasti i peroksizomi (Foyer i sar., 2003), a u uslovima mraka mitohondrije (Moller, 2001) su i mesta najveće sinteze *ROS*. U tilakoidima hloroplasta superoksidni anjon radikali ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksid (H_2O_2) se uklanjaju u ciklusu voda–voda (Asada, 1999). Alternativne oksidaze (AOX) takođe redukuju produkciju $O_2^{\cdot-}$ u tilakoidima. *ROS* koji napuštaju tilakoide i/ili se produkuje u stromi hloroplasta, uklanja se pomoću SOD i u askorbat–glutationskom ciklusu. Peroksiredoksin (PrxR) i glutation peroksidaze (GIPOX) su takođe uključene u uklanjanje H_2O_2 u stromi hloroplasta. *ROS* nastali u peroksizomima tokom fotorespiracije, oksidacije masnih kiselina i u drugim reakcijama se uklanjaju pomoću SOD, CAT i askorbat peroksidaza (APX). SOD i komponente askorbat–glutationskog ciklusa su takođe prisutne u mitohondrijama, u kojima se nalaze i AOX koje štite ćeliju od oksidativnih oštećenja. U apoplastu i ćelijskom zidu su prisutne uglavnom gvajakol peroksidaze (GvPOX) i NADPH oksidaze, kao enzimske komponente odgovorne za uklanjanje *ROS*. Antioksidanti kao što su glutation i askorbinska kiselina takođe se mogu transportovati između različitih odeljaka (Mittler i sar., 2004).

Antioksidativni sistem biljaka čine dve komponente. Prva komponenta antioksidativnog sistema je enzimska i čine je enzimi: SOD, POX i CAT (Donahue i Cramer, 1997; Noctor i Foyer, 1998). Ovoj grupi pripadaju i enzimi čija je osnovna uloga sinteza i regeneracija nenzimskih komponenti, tj. niskomolekulskih antioksidanata: APX, glutation reduktaze, monodehidroaskorbat reduktaze i dehidroaskorbat reduktaze (Jimenez i sar., 2002) (Tabela 3). Druga komponenta antioksidativnog sistema je neenzimska i čine je antioksidativni metaboliti kao što su vitamini: β –karoten (provitamin A), askorbinska kiselina (vitamin C), α –tokoferol (vitamin E). Važni antioksidanti koji pripadaju ovoj grupi su i glutation i zeaksantin, kao i polifenolna jedinjenja.

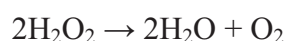
Da bi se uklonili molekuli vodonik peroksida i superoksidni anjon radikali koriste se i enzimska i neenzimska komponenta. Za uklanjanje hidroksilnog radikala i singlet kiseonika koriste se samo niskomolekulski antioksidansi, jer ne postoje enzimi za njihovo uklanjanje (Papadakis i Roubelakis–Angelakis, 2002).

Tabela 3. Glavni antioksidativni enzimi koji uklanjaju ROS u biljnim ćelijama. AA – askorbinska kiselina, DHA – dehidroaskorbat, GSH – redukovani glutation, GSSG – oksidovani glutation, MDHA – monodehidro askorbat, NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat.

Enzimski antioksidanti	Kod enzima	Reakcija koju katalizuje
Superoksid dismutaze (SOD)	EC 1.15.1.1	$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Katalaze (CAT)	EC 1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Askorbat peroksidaze (AsPOX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Gvajakol peroksidaze (GvPOX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
Monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$2MDHA + H^+ + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehidroaskorbat reduktaze (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2 GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutation reduktaze (GR)	EC 1.8.1.7	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

1.4.1. Katalaze (CAT)

Katalaze (CAT, EC 1.11.1.6) čine grupu široko rasprostranjenih metalo–enzima koji katalizuju razgradnju vodonik peroksida do vode i kiseonika:



Katalaze su tetramerni enzimi sa hemom kao prostetičnom grupom. U biljnim ćelijama se najčešće sreću na mestima povećane produkcije vodonik peroksida: u peroksisomima, glioksisomima i citosolu (Tolbert, 1980; Dat i sar., 2000). Postoje tri klase katalaza, koje kodiraju različiti geni i koje se razlikuju po profilima ekspresije: CAT1, CAT2 i CAT3 (Willekens i sar., 1995). Izolovani su geni za *CAT1* (Frugoli i sar., 1996), *CAT2* (Chevalier i sar., 1992) i *CAT3* (Newman i sar., 1994). Različite biljke imaju od dve do 12 izoformi katalaza koje pripadaju pomenutim klasama; tako su kod *Ricinus communis*

nađene dve izoforme (Ota i sar., 1992), tri kod duvana (Havir i McHale, 1987), pet kod spanaća (Galston i sar., 1951), pet kod kukuruza (Williamson i Scandalios, 1993) pet kod pamuka (Ni i sar., 1990), šest kod arabidopsisa (Frugoli i sar., 1996) i čak 12 kod slačice (Drumm i Schopfer, 1974).

1.4.2. Peroksidaze (POX)

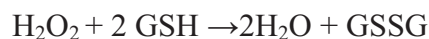
Peroksidaze se dele u tri grupe na osnovu razlika u primarnoj strukturi proteina (Akiyoshi i sar., 2003):

1. grupa obuhvata unutarćelijske enzime kod biljaka, bakterija i kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), kao što su bakterijske citohrom-c peroksidaze (EC 1.11.1.5) i katalaza-peroksidaze (EC 1.11.1.6), kao i askorbat peroksidaze (EC 1.11.1.11).

2. grupa obuhvata ekstracelularne peroksidaze gljiva, kao što su lignin peroksidaze (EC 1.11.1.14) i Mn²⁺ nezavisne peroksidaze (EC 1.11.1.13).

3. grupu čine enzimi (EC 1.11.1.7) koji su prvobitno opisani kao peroksidaze: oni se izlučuju iz ćelije ili se transportuju u vakuolu (Rahnama i Ebrahimzadeh, 2006). Ova grupa enzima kao elektron donore najčešće koristi fenole (Welinder i Gajhede, 1993). U reakciji oksidacije fenolnih jedinjenja važnu ulogu ima askorbat kao sekundarni elektron donor (Otter i Polle, 1994; Takahama i sar., 1999) koji redukuje novonastali fenoksil radikal.

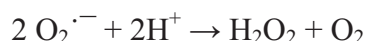
Peroksidaze (POX, EC 1.11.1.7) su monomerni glikoproteini koji su široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Da bi se peroksidi uklonili iz sistema, peroksidaze katalizuju oksidaciju supstrata, pri čemu se on prevodi u oksidovani oblik uz oslobađanje vode:



Peroksidaze imaju širok spektar supstratne specifičnosti (Huystee i Cairns, 1982). Nalaze se u citoplazmi, vakuolama, peroksizomima i ćelijskom zidu (Schlos i sar., 1987). Peroksidaze imaju veoma važnu ulogu u rasteњу i razviću biljaka (Huystee, 1987), u odbrani od patogeni i u odgovoru na različite stresove kao što je oksidativni stres (Sgherri i sar., 2004; Veljović–Jovanović, 2006). Njihove fiziološke uloge su oksidacija toksičnih reduktanata, katabolizam auksina, respiratorni procesi, kao i biosinteza i razgradnja lignina u ćelijskim zidovima (Gaspar i sar., 1982).

1.4.3. Superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaze (SOD, EC 1.12.1.1) su metaloproteini koji katalizuju disproporcionisanje superoksidnog anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do molekularnog kiseonika i vodonik peroksida.



Proces dismutacije se zasniva na istovremenoj oksidaciji jednog radikala i redukciji drugog (Michalski, 1996).

Klasifikacija SOD je izvršena na osnovu metalnog kofaktora koji enzim koristi. Postoje Fe–SOD, Mn–SOD, Cu–ZnSOD i Ni–SOD.

Cu–ZnSOD se javlja u citosolu eukariota, hloroplastima, peroksizomima i apoplastu. Ima strukturu homodimera molekulske mase 32,5 kDa (Giannopolitis i Reis, 1977). Svaka subjedinica sadrži jedan Cu^{2+} i jedan Zn^{2+} u aktivnom centru (Michalski, 1996). Cu–ZnSOD su izolovane i iz nekoliko bakterijskih vrsta uključujući i *E. coli* (Michalski, 1996).

Fe–SOD se nalazi kod prokariota i u plastidima nekih evoluciono starih biljaka: *Ginkgo biloba*, *Nymphaea odorata* i *Brassica campestris* (Salin i Bridges, 1981). Milošević i sar. (2012) su pokazali da Fe–SOD postoji i kod *Balsaminaceae*. Takođe su Fe–SOD nađene i kod arabidopsisa (Kliebenstein i sar., 1998), soje (Pawlak i sar., 2009) i drugih biljaka. Fe–SOD se sreće i u peroksizomima. Aktivno mesto Mn–SOD i Fe–SOD sadrži

istu sekvencu aminokiselinskih ostataka, te su ove dve izoforme veoma slične. Enzim je u obliku dimera, subjedinice su molekulske mase od po 23 kDa, sa po jednim atomom metala po subjedinici (Asada i sar., 1980; Michalski, 1996).

Mn-SOD je prvo izolovana iz bakterija *E. coli*, a kasnije i iz velikog broja drugih bakterija. Kod prokariota enzim je u obliku homodimera mase 40–46 kDa, dok je kod eukariota u obliku tetramera i ima masu 110–140 kDa (Michalski, 1996). Kod eukariota se javlja u mitohondrijama i peroksizomima.

Ni-SOD je homotetramer nađen kod nekih prokariota. Masa subjedinice iznosi 13 kDa (Barondeau i sar., 2004).

Različite izoforme SOD imaju različitu osetljivost na inhibitore. Mn-SOD je neosetljiva na inhibiciju cijanidima (CN^-) i vodonik peroksidom, a osetljiva je na mešavinu hloroforma i etanola. Fe-SOD je inhibirana vodonik peroksidom dok je neosetljiva na cijanide (Bridges i Salin, 1981; Michalski, 1996). CuZn-SOD je osetljiva na cijanide i vodonik peroksid, a neosetljiva je na mešavinu hloroforma i etanola. Razlika u osetljivosti na inhibitore se često koristi za identifikaciju SOD izoformi.

1.5. Geni ćelijskog ciklusa

Period u životu ćelije, od mitoze u kojoj ona postaje do kraja sledeće mitoze u kojoj se ona deli na dve ćelije, zove se ćelijski ciklus. Deoba ćelije obezbeđuje da novonastale ćerke ćelije dobiju podjednaku količinu DNK (odnosno hromozoma), a u većini slučajeva i približno podjednaku količinu citoplazme sa organelama. Ćelijski ciklus se sastoji od dve faze: mitoze (M) i interfaze (I). Mitozu čine profaza, metafaza, anafaza i telofaza, a interfazu čine G1 (od *gap* – razmak; od *growth* – rast), S (sinteza DNK) i G2 faza (Dewitte i Murray 2003; Barroco i sar., 2005).

Ćelijski ciklus traje različito vreme kod različitih ćelija, mada je relativna dužina pojedinih faza stalna. U meristemu korena ciklusi obično traju oko 20 časova, a u meristemu stabla 2–3 dana.

Interfaza je najduža faza u kojoj se obavljaju obimne pripreme za deobu: transkripcija gena i sinteza proteina neophodnih za uvećanje ćelijske mase, kao i za kontrolu i odvijanje ćelijskog ciklusa. Sinteza DNK se obavlja u S fazi interfaze.

Faza deobe, tj. mitoze, je centralni događaj u ćelijskom ciklusu. U toku mitoze odigravaju se pod mikroskopom najuočljiviji događaji, kada se vrši podela jedrovog materijala – kariokineza, i podela ćelije – citokineza. Mitoza je ujedno i najkraća faza ciklusa.

Višećelijskim organizmima je važno da se ćelije dele u tačno određenom periodu i onim tempom kojim je potrebno. Nedovoljno ili prekomerno deljenje ćelija može da dovede do ozbiljnih poremećaja u funkcionisanju organizma.

Početna istraživanja molekula bitnih za odvijanje ćelijskog ciklusa potiču iz sedamdesetih godina prošlog veka, kada su Masui i Markert proučavajući sazrevanje oocita žabe *Xenopus laevis* otkrili da u toku mejoze oocite proizvode supstance koje indukuju deobe u nezrelim, mirujućim oocitama. Za kasnije otkriće ključnih molekula za odvijanje i kontrolu ćelijskog ciklusa, naučnici Hartwell, Timothy i Nurse su dobili Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju 2001. godine.

Prvi identifikovani geni uljučeni u ćelijske deobe nazvani su *CDC* (*Cell Division Cycle*) geni – geni ćelijske deobe. Oni su otkriveni prilikom proučavanja ćelijskih deoba kvasaca. Kod *Saccharomyces pombe* postoji jedan *CDC* gen, koji je nazvan *CDC2*. Proteini, produkti ovih gena su dobili ime p34, na osnovu mase od 34 kD. Mnogi njihovi homolog, kod drugih organizama, uključujući i biljke, nazvani su *CDC2* proteini. Do danas je izolovano oko 50 *CDC* gena, a naziv *CDC* je proširen na sve gene bez čijih se produkata deoba zaustavlja na različitim mestima od G1 do M faze.

Posle otkrića *CDC* gena, otkriven je i drugi važan činilac koji je neophodan za ćelijsku deobu – protein ciklin, prilikom istraživanja deoba morskog ježa, kada je ustanovljeno da prisustvo ovog proteina oscilira sinhrono sa mitozom (u interfazi sadržaj raste, maksimum dostiže na prelazu G2→M, a u anafazi se razgrađuje). Kompleks ciklina i homologa p34 (*CDC2*) funkcioniše kao proteinska kinaza. Ciklin određuje supstratnu specifičnost, vreme delovanja i subcelularnu lokalizaciju aktivnosti, a kinaznu aktivnost obavlja homolog p34 (*CDC2*), koji je nazvan kinaza zavisna od ciklina – *CDK* (*Cyclin*

Dependent Kinase). Osim kinaza, određeni *CDC* geni kodiraju proteine koji deluju kao fosfataze.

Prvobitna skica reakcija koje se dešavaju tokom ćelijskog ciklusa je određena kod animalnih ćelija. Postavilo se pitanje da li se ona može primeniti i na biljne ćelije, koje se od animalnih razlikuju po tome što ne migriraju, što su meristemi aktivni tokom celog života biljke i što se diferencirane ćelije mogu ponovo deliti. Sa citološkog aspekta mitozu biljnih ćelija se razlikuje od animalnih, po tome što biljne ćelije nemaju centriole, obrazuju preprofaznu traku i fragmoplast. Iako te razlike postoje, metodama za izolovanje i identifikaciju proteinskih frakcija, kao i pomoću genskih i imunoloških proba utvrđeno je da glavni elementi ćelijskog ciklusa postoje kod svih organizama, uključujući i biljke (John, 1996).

Mnogobrojni istraživači su se bavili problematikom regulacije ćelijskih deoba. Hirt i sar. (1992) i Ferreira i sar. (1994) su pokazali da količina ciklina u biljkama oscilira tokom ćelijskog ciklusa. Kod biljaka postoje ciklini A, B i D (CYCA, CYCB i CYCD) koji su homologni animalnim (Renaudin i sar., 1996). Biljne CDK su svrstane u grupe i obeležene su latiničnim slovima A, B, C itd. Kod lucerke se sreće 6 grupa *CDK* gena (*CDKA* do *CDKF*). Grupu A čine CDK koje se sastoje od 294 amino kiseline i imaju masu od 33 do 35 kD (Jacobs, 1995). *CDKA* su najbolje okarakterisane. One su aktivne tokom S, G2 i M faze. Colasanti i sar. (1993) su pokazali da je *CDC2* protein kod kukuruza koncentrisan u meristemskim ćelijama korena i u epidermalnim ćelijama lista koje se dele i obrazuju stomin aparat. U klijancima arabidopsisa do ekspresije *CDKA;1* gena (koji je homolog *CDC2*) prvo dolazi u meristemu korena, zatim u meristemu stabla, pa u kotiledonima (Hemerly i sar., 1993). U diferenciranim ćelijama lista i stabla arabidopsisa relativna količina *CDKA;1* proteina je manja u odnosu na druge proteine. Prisustvo *CDKA;1* gena u diferenciranim ćelijama verovatno ukazuje na njihovu kompetenciju da ponovo uđu u deobu. Faktori spoljašnje sredine koji stimulišu ćelijske deobe dovode do povećanja ekspresije *CDKA;1* gena.

Tokom poslednje četiri decenije došlo je do veoma značajnih otkrića o regulaciji ćelijskog ciklusa (Pines, 1995; Mironov i sar., 1999; Inze i De Veylder, 2006; Van Leene i sar., 2010). Nezavisna istraživanja različitih naučnih timova doprinela su formiranju

jedinstvene slike o tim procesima. Danas znamo da su za odvijanje ćelijskog ciklusa najvažnije tri grupe proteina i to: kinaze zavisne od ciklina (CDK), aktivne samo u kompleksu sa ciklinom; ciklini i inhibitori kinaza zavisnih od ciklina (proteini koji deluju kao fosfataze) (Beemster i sar., 2003; Menges i sar., 2006; Andersen i sar., 2008).

1.5.1. Aktivacija kompleksa CYC/CDK

Kompleks dva proteina – CYC/CDK reguliše sve ključne korake u ćelijskom ciklusu, tj. predstavlja glavni element transdukcije signala koji kontrolišu ciklus, pri čemu CDK imaju katalitičku funkciju, a ciklini regulatornu funkciju. Aktivnost kompleksa je regulisana mnogim činiocima koji su zavisni od razvojnog programa ćelije i tkiva ili su pod uticajem spoljašnjih faktora. Svi ti činioci zajedno čine kompleksnu i integrisanu regulatornu mrežu. Aktivnost CDK proteina u toku ćelijskog ciklusa po Stalsu i sar. (2000) je regulisana:

1. Prisustvom određenog ciklina za koji se CDK vezuje. Njihovo prisustvo je regulisano na nivou transkripcije i posle translacije, a za pravilan tok ciklusa važna je i razgradnja ciklina.
2. Putem fosforilacije i defosforilacije. Kompleksi ciklin/CDK spadaju u grupu serin/treonin kinaza (Hardie, 1999). Kad kompleks nastane, on nema odmah kinaznu aktivnost nego mora da se fosforiluje ili defosforiluje na određenim mestima. Kada se aminokiselina treonin na mestu 160 (Thr 160) fosforiliše dolazi do aktivacije kompleksa, a kada se aminokiselina tirozin na mestu 15 (Tir 15) fosforiliše dolazi do inaktivacije kompleksa. Aktivnost kompleksa ciklin/CDK se sastoji u tome da on uz učešće ATP fosforiliše neki drugi protein, koji postaje aktivan u obavljanju specifičnih procesa u ćelijskom ciklusu (npr. esencijalne komponente ciklusa neophodne za replikaciju DNK, za transkripciju, za mnoge strukturne promene u jedru i citoplazmi).

3. Prisustvom inhibitornih proteina koji inhibiraju CDK ili neke druge važne komponente. Wang i sar. (1997) su otkrili proteine koji se vezuju za CDK komplekse i inhibiraju njihovo dejstvo. Dva takva inhibitora iz *Arabidopsis thaliana* su nazvani ICK: ICK1 i ICK2. ICK1 se vezuje i za ciklin i za CDK i sprečava njihovu kinaznu aktivnost. Pojačana aktivnost ICK1 dovodi do redukcije ćelijskih deoba i inhibicije rastenja (Wang i sar., 2000).

1.5.2. Mogući model ćelijskog ciklusa kod biljaka

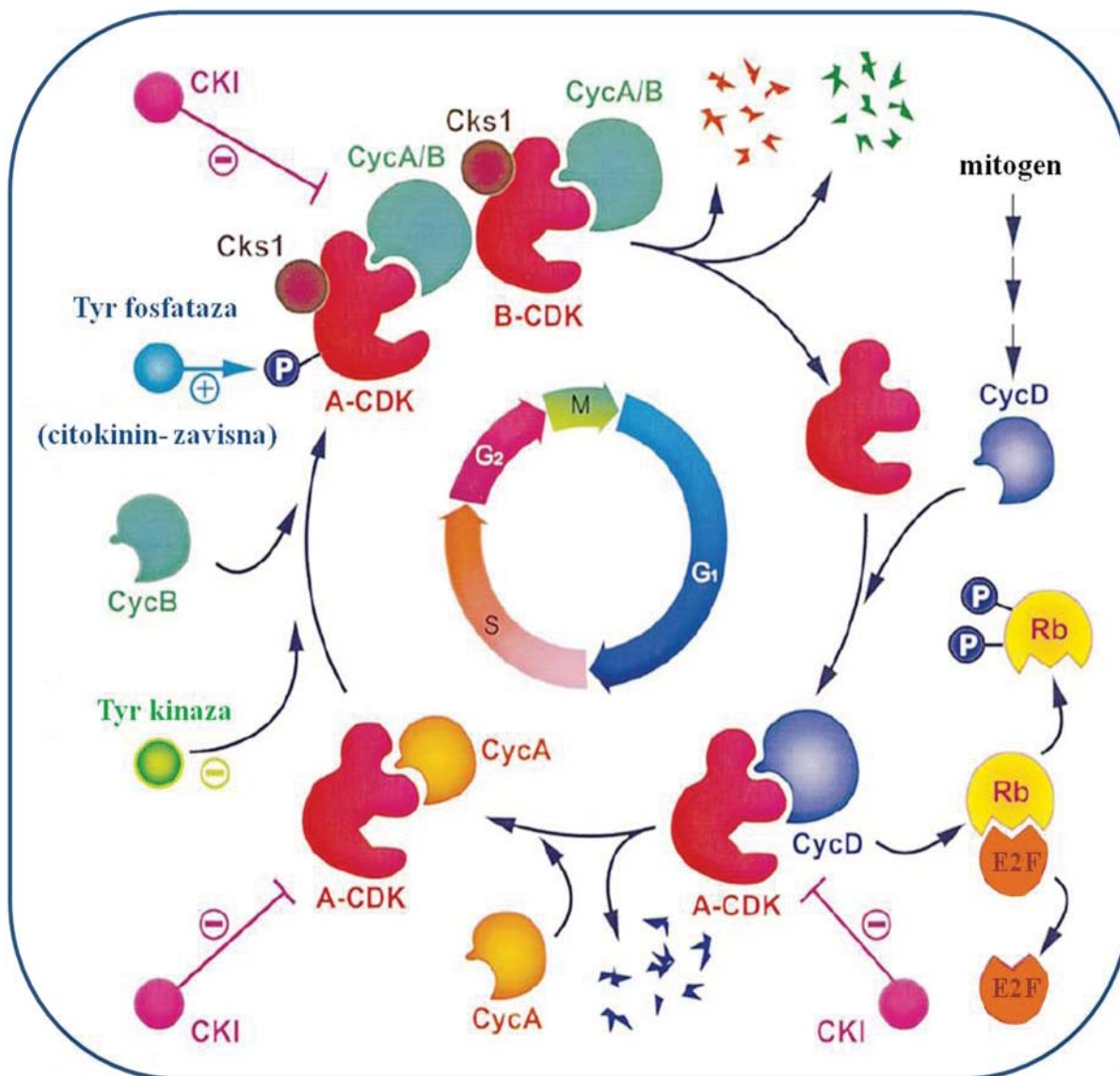
Sa biohemijskog aspekta ćelijski ciklus se sastoji od niza fosforilacija i defosforilacija koje su precizno regulisane u vremenu (Mironov, 1999). Kritična kontrolna mesta u ciklusu su prelazi $G1 \rightarrow S$ i $G2 \rightarrow M$ (Slika 7).

Pod dejstvom mitogena (ekstracelularni faktor koji indukuje mitozu) u G1 fazi sintetiše se ciklin D i vezuje sa CDKA. Inhibitor CKI kontroliše aktivnost CDKA/CYCD kompleksa i ako je on vezan za CDK, ćelije ulaze u G0 fazu u kojoj se deobe ne dešavaju. Pre početka deobe inhibitorni protein CKI se razgrađuje. U biljnim ćelijama, tj. kod *Arabidopsis thaliana* *CYCD3* je indukovano citokininima, a *CYCD2* saharozom. CDK/CYCD kompleks vrši fosforilaciju retinoblastoma (Rb) proteina, koji se zatim odvaja od transkripcionog faktora E2F, koji zatim aktivira niz gena čiji su produkti neophodni za replikaciju DNK. Na taj način se prolazi kroz prvo kontrolno mesto ciklusa. CYCD se na kraju G1 faze degradiraju ili ako je izloženost mitogenu stalna zadržavaju se dok traje proliferacija.

Na početku S faze pojavljuju se hipofosforilisani Rb proteini. Tokom S faze novonastali CYCA i CYCB proteini se vezuju sa CDKA i CDKB kinazama. Na kraju S faze fosforilišu se CDK proteini (na mestu tirozin 15) i zaustavlja se dalji tok ciklusa.

Prolaz kroz drugo kontrolno mesto ($G2 \rightarrow M$) kontrolisan je kompleksom CYCB/CDK, za čiju aktivaciju je neophodno prisustvo citokinina. Kinaze održavaju tirozin 15 u fosforilovanom obliku, sve dok se ne pojave signali da je replikacija DNK kompletirana i da su sve biosintetičke reakcije G2 faze obavljene. Defosforilaciju CDK

proteina, tj. tirozina 15 vrši Tyr fosfataza i tada kompleks CYCB/CDK postaje aktivan i otpočinje nova deoba. Inhibitori CKI mogu blokirati ciklus na različitim mestima (Slika 7).



Slika 7. Model ćelijskog ciklusa kod biljaka. Rb – retinoblastoma protein, E2F – faktor transkripcije, CKI – inhibitori, CKS1 – pomoćni faktori. Modifikovano prema Mironovu (1999).

Istraživanja ekspresije gena regulatora ćelijskog ciklusa rađena su kod biljaka izloženih stresu. Utvrđeno je da je ekspresija ovih gena bila smanjena tokom izlaganja, kao i posle izlaganja slanom stresu (West i sar., 2004), a takođe, i hladnom tretmanu (Rymen i sar., 2007). Alelopatski uticaji, takođe, mogu izazvati promene u ekspresiji gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa. Nishida i sar. (2005) proučavajući alelopatski efekat monoterpenoida *Salvia leucophylla* na biljke *Brassica campestris* ustanovili su inhibiciju ćelijske proliferacije i sinteze DNK. Zhang i sar. (2010) su potvrdili da fitotoksini dovode do smanjenja broja ćelijskih deoba i rasta meristemskih tkiva, a samim tim i celih biljnih organa ili čak dovode do izumiranja ćelija, tj. ćelijske smrti.

2. CILJEVI RADA

Osnovni ciljevi istraživanja izvedenih u okviru ovog rada bili su:

- ❖ Uspostavljanje optimalnih uslova za genetičku transformaciju biljaka *Chenopodium murale* L. pomoću bakterija *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS radi dobijanja kulture transformisanih korenova kao pogodnog model sistema za proučavanje alelopatskih efekata u kulturi *in vitro*.
- ❖ Optimizacija i karakterizacija rasta različitih klonova transformisanih korenova i određivanje njihovih histocitoloških karakteristika pomoću svetlosne mikroskopije (*semifine* metodom).
- ❖ Ispitivanje alelopatskog efekta medijuma u kome su rasli netransformisani i različiti klonovi transformisanih korenova na klijanje i rast klijanaca test biljaka: arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh), pšenice (*Triticum aestivum* L.) i salate (*Lactuca sativa* L.).
- ❖ Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima (katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza) kod test biljaka tretiranih fitotoksičnim medijumima.
- ❖ Određivanje nivoa ekspresije gena regulatora ćelijskog ciklusa, gena za ciklin zavisne kinaze (*CDK*) i gena za cikline (*CYC*), kod klijanaca arabidopsisa i pšenice nakon tretiranja fitotoksičnim medijumom.
- ❖ Identifikacija i kvantifikacija pojedinih potencijalnih alelohemikalija, tj. metabolita (fenolnih jedinjenja i šećera) u fitotoksičnim medijumima pomoću HPLC analize.
- ❖ Poređenje efekta fenolnih kiselina (kafeinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline) sa efektima fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Semena *Chenopodium murale* L. (ekotip 197, Cumming 1967) su prvobitno dobijena iz Instituta za eksperimentalnu botaniku u Pragu. Nova semena su prikupljena sa biljaka gajenih u staklari Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. U našim eksperimentima su korišćena semena dobijena tokom 2008. godine. Semena su površinski sterilisana tako što su prvo potopljena u nerazblaženu varikinu (4% aktivni hlor) 2 minuta, a zatim su ispirana sterilnom destilovanom vodom nekoliko puta. Uniformno klijanje je dobijeno u Petri kutijama na vlažnom filter papiru pod specifičnim temperaturnim i svetlosnim režimom: 30°C 48 h (svetlo), 5°C 24 h (mrak), 30°C 24 h (svetlo), 5°C 24 h (mrak). Posle isključavanja, klijanci su rasli na vlažnom filter papiru na temperaturi od 25°C i svetlosnom režimu od 16 sati svetlosti i 8 sati mraka (intenzitet osvetljenja od 70 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) tokom dve nedelje (Slika 8). Jedna polovina klijanaca služila je kao izvor eksplantata za prvi eksperiment transformacije, dok je ostatak klijanaca prenet u Erlenmajere na bazalni medijum (BM) i gajen narednih 30 dana. Eksplantati sa ovih biljaka (listovi, petiole i internodije) su korišćeni za drugi eksperiment transformacije.



Slika 8. Klijanci *Chenopodium murale* L.

3.2. Kultura *in vitro*

3.2.1. Hranljive podloge

Sve hranljive podloge korišćene u eksperimentima transformacije, kao i za gajenje transformisanih korenova, u tekstu označene kao BM (bazalni medijum), sadržale su MS (Murashige i Skoog, 1962) mineralne soli, kompleks gvožđa i vitamine (Tabela 4), 30 g/l saharoze i 100 mg/l myo–inozitola (Sigma). Čvrsti BM sadržao je i 7 g/l agara (Torlak, Beograd). pH podloge je bio podešen na 5,8. Sterilizacija hranljivih podloga vršena je u autoklavu 25 min, pod pritiskom od 90 kPa i na temperaturi od 115°C.

3.2.2. Uslovi gajenja kultura

In vitro kulture su gajene na temperaturi od $25 \pm 2^\circ\text{C}$, pri fotoperiodu od 16 h svetla i 8 h mraka i intenzitetu osvetljenja od $70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Kao izvor svetla su korišćene bele fluorescentne sijalice (*Tesla* Pančevo). Konstantna temperatura je održavana uz pomoć klima uređaja (Galanz).

3.2.3. Sterilizacija pribora i medijuma

Instrumenti su iskuvavani 25 min, a zatim su do upotrebe držani u 96% etanolu. Pre upotrebe instrumenti su opaljivani na plamenu špiritusa lampe. Korišćeni su potpuno ohlađeni. Sterilne manipulacije vršene su u laminarnoj komori.

Tabela 4. Sastav osnovne hranljive podloge po Murashige i Skoog-u, 1962.

makroelementi	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
mikroelementi	mg/l
KJ	0,830
H ₃ BO ₃	6,200
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
kompleks gvožđa	mg/l
Na ₂ EDTA	27,8
FeSO ₄ x 7H ₂ O	37,2
vitamini	mg/l
vitamin B ₁	0,1
vitamin B ₆	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	2,0

3.3. Tretman citokinima radi regeneracije pupoljaka na transformisanim korenovima *C. murale*

Tečni BM koji je sadržao jedan od sledećih citokinina: meta-topolin (mT), N-(2-hloro-4-piridil)-N-fenilurea (CPPU) ili thidiazuron (TDZ), u koncentraciji od 0,5; 1,0 ili 2,0 mg/l, koji je korišćen u cilju regeneracije izdanaka na transformisanim korenovima.

3.4. *Agrobacterium* vektor

Za transformaciju je korišćen bakterijski soj *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS koji pripada bakterijama agropinskog tipa. On sadrži plazmid pRiA4 sa GUS konstruktom integrisanim u T_L regionu između *rolC* i *rolD* gena (Tepfer i Casse-Delbart, 1987). GUS konstrukt sadrži *uidA* sekvencu pod kontrolom 70S promotora – pojačani-dvostruki 35S CaMV (*cauliflower mosaic virus*) promotor, praćenu terminatorom nopalina sintetaze NOS.

A. rhizogenes A4M70GUS je gajen na čvrstoj YEB podlozi (Vervliet i sar., 1975) u koju je dodat antibiotik neomicin u koncentraciji od 100 µg/ml, na temperaturi od 28°C. Bakterijska kolonija (prečnika 3 mm) uzeta je sa 3 dana stare bakterijske kulture, resuspendovana u 5 ml tečnog YEB medijuma u flakon tubi (50 ml) i inkubirana na šejkeru 3 h na sobnoj temperaturi. Ovako pripremljena bakterijska suspenzija korišćena je za transformaciju.

3.5. Transformacija i uspostavljanje kultura transformisanih korenova *C. murale*

Kotiledoni, hipokotili i korenovi izolovani sa dve nedelje starih klijanaca, kao i petiole, listovi i internodije izolovani sa šest nedelja starih *in vitro* biljaka, prekulivisani su na čvrstom BM jedan dan. Eksplantati su potom potapani u bakterijsku suspenziju nekoliko minuta, očeđeni na filter papiru i preneti na čvrst BM radi kokultivacije. Primenjena su dva

transformaciona tretmana: sa i bez acetosiringona. Acetosiringon (Fluka Co.) je rastvaran u dimetil sulfoksidu (DMSO, Duchefa Biochemie Co.) i dodavan je nakon sterilizacije u finalnoj koncentraciji od 50 μ M u medijum za inokulaciju i kokultivaciju. Od 1636 eksplantata koji su inokulisani, 854 je inkubirano na medijumu sa acetosiringonom, a 782 na medijumu bez acetosiringona. Za svaki tip eksplantata urađena su tri ponavljanja sa ukupno 70 – 252 eksplantata u zavisnosti od tipa. Kontrolni eksplantati nisu bili inficirani *Agrobacterium*-om.

Posle 3 dana kokultivacije na 20°C u mraku, eksplantati su preneti na BM sa 300 mg/l cefotaksima (Tolycar®, cefotaksim–Na, Jugoremedija, Zrenjanin, Srbija) radi eliminacije bakterija i pasažirani su na istu podlogu posle dve nedelje. Četiri nedelje nakon inokulacije potencijalno transformisani korenovi su odsečeni sa eksplantata i dalje gajeni kao individualni klonovi na čvrstom BM. Korenovi dobijeni na netransformisanim eksplantatima su korišćeni kao negativna kontrola. Tokom daljeg pasažiranja korenova, koncentracija cefotaksima u BM je postepeno smanjivana i nakon 3 meseca antibiotik je potpuno izostavljen iz podloge.

3.6. Histohepijska analiza potencijalno transformisanih korenova korenovima

C. murale

GUS ekspresija u transformisanim i netransformisanim korenovima je određena prema metodi Jeffersona i sar. (1987). Tri do pet vrhova korenova (5–10 mm dužine) svakog klona je inkubirano u 100 μ l 2 mM X–Gluc (cikloheksilamonijumska so 5–bromo–4–hloro–3–indolil– β –D–glukuronske kiseline; SIGMA, USA) rastvora, pH 7 na 37°C preko noći. Pojava plave boje, koja ukazuje na GUS ekspresiju, je praćena pod svetlosnim mikroskopom.

3.7. Molekularna karakterizacija transformisanih korenova *C. murale*

3.7.1. PCR analiza

Izolacija DNK

Ukupna genomska DNK izolovana je iz 13 potencijalno transformisanih klonova koji su pokazali pozitivnu GUS reakciju i iz jednog netransformisanog korena pomoću CTAB metode (Murray i Thompson, 1980).

Protokol za ekstrakciju DNK

- DNK je izolovana iz 250 mg ocedenih korenova.
- Uzorci su homogenizovani u tečnom azotu do finog praha i prebacivani u ependorfice od 2 ml.
- U svaki homogenat je dodato po 600 μ l ekstrakcionog pufera (2,0% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1,4 M NaCl) sa 0,5% β -merkaptoetanolom. Ependorfice sa uzorcima su lagano prevrtane u stalku 30 puta gore-dole i zatim su inkubirane u vodenom kupatilu na 56°C 30 min.
- Nakon 10 min hlađenja na sobnoj temperaturi, u svaki uzorak je dodato po 600 μ l smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1). Uzorci su okretani nekoliko puta i centrifugirani na 13400 rpm na sobnoj temperaturi 10 min.
- Izdvojen je supernatant koji sadrži DNK. Postupak ekstrakcije rastvorom hloroform:izoamil alkohol (24:1) je ponovljen još jednom. Radi precipitacije DNK, u izdvojeni supernatant svakog uzorka dodato je 1/2 zapremine (oko 250 μ l) 4M NaCl, uzorci su rotirani 30 puta, posle čega je u smešu dodat 1 zapremina (oko 750 μ l) hladnog izopropanola.
- Uzorci su inkubirani u frižideru (4°C) 1 h i nakon toga centrifugirani na 10900 rpm na sobnoj temperaturi 5 min. Supernatant je odstranjivan, a talog je ispiran sa 0,5 ml hladnog 70% etanola uz blago mešanje.

- Posle centrifugiranja na 8000 rpm na sobnoj temperaturi 5 min supernatant je odliven, a talog (DNK) je sušen u laminaru dok nije postao sasvim proziran.
- DNK je resuspendovana u 200 μ l TE pufera (za 10 ml TE pufera: 20 μ l 0,5 M EDTA pH 8, 100 μ l 1 M Tris-HCl, pH 8 i 9,88 ml H₂O).
- Uzorci su inkubirani u frižideru (4°C) preko noći radi rastvaranja DNK. U svaki uzorak (200 μ l) je dodato 0,5 μ l (10 mg/ml) RNK-aze radi eliminacije RNK. Uzorci su rotirani nekoliko puta i potom inkubirani u vodenom kupatilu na 37°C 1 h, a zatim podvrgnuti postupku ekstrakcije sa 200 μ l hloroform:izoamil alkohola (24:1) i centrifugirani na 12000 rpm na 4°C 10 min. Vodena faza (150–180 μ l) je uzeta kao uzorak DNK. Od svakog uzorka 10 μ l je korišćeno za razdvajanje genomske, visokomolekularne DNK na 1% agaroznom gelu, a 10 μ l je iskorišćeno za određivanje koncentracije DNK na spektrofotometru.

Kvantifikovanje DNK

Kvantifikovanje DNK vršeno je na spektrofotometru (HP Agilent 8453 Spektrofotometar, Agilent Technologies, Palo Alto, CA), na talasnim dužinama 260 i 280 nm, a koncentracija je izračunavana prema formuli:

$$C_{\text{DNK}}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times A_{260} \times \text{razblaženje})/1000 = 5 \times A_{260}$$

$$\text{Razblaženje} = 100 (10 \mu\text{l uzorka DNK} + 990 \mu\text{l vode})$$

PCR analiza

Integracija T_L i T_R DNK iz Ri plazmida u transformisane korenove *C. murale* praćena je PCR amplifikacijom *rolA*, *rolB*, *rolC*, *uidA*, kao i *aux1* gena. Odsustvo bakterija *A. rhizogenes* u kulturama transformisanih korenova praćeno je PCR analizom *virD1* gena (gen prisutan u Ri plazmidu, ali izvan T-DNK koja se prenosi). Oligonukleotidni prajmeri korišćeni u svim PCR reakcijama su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Sekvence prajmera gena koji su ispitivani u transformisanim korenovima

Ime gena	F/R	Sekvanca prajmera (5'→3')	Dužina prajmera (b)	Dužina amplikona (bp)
<i>rolA</i>	<i>rolA</i> -F	GTTAGGCGTGCAAAGGCCAAG	21	203
	<i>rolA</i> -R	TGCGTATTAATCCCGTAGGTC	21	
<i>rolB</i>	<i>rolB</i> -F	AAAGTCTGCTATCATCCTCCTATG	24	348
	<i>rolB</i> -R	AAAGAAGGTGCAAGCTACCTCTCT	24	
<i>rolC</i>	<i>rolC</i> -F	TACGTCGACTGCCCGACGATGATG	24	342
	<i>rolC</i> -R	AAACTTGCACTCGCCATGCCTCAC	24	
<i>aux1</i>	<i>aux1</i> -F	ATCGTGCATACTCACCACCG	20	516
	<i>aux1</i> -R	ACCTTCTTTGAGGTGTGCGCC	20	
<i>uidA</i>	<i>uidA</i> -F	CCTGTAGAAACCCCAACCCGTG	22	366
	<i>uidA</i> -R	CCCGGCAATAACATACGGCGTG	22	
<i>virD1</i>	<i>virD1</i> -F	ATGTGCAAGGCAGTAAG	18	441
	<i>virD1</i> -R	CAAGGAGTCTTTCAGCATG	19	

Zapremina amplifikacione smeše je iznosila 30 µl (Tabela 6). Uslovi amplifikacije su bili sledeći:

- 5 min 95°C,
- 36 ciklusa: 1 min 94°C, 1 min 61°C, 1 min 72°C
- 5 min 72°C

Amplifikacija se odvijala u aparatu Genius Thermocycler (Techne). Amplifikovani fragmenti su razdvojeni elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu (Sigma, St. Louis, Missouri), u 1xTBE puferu (0,04 M Tris-borat i 0,001 M EDTA) sa 0,5 µg/ml etidijum-bromida, pri konstantnoj voltaži od 100V. Fotografisanje gela je vršeno na transluminatoru uz pomoć fotoaparata Nikon 12MP (gel-DocTM EQ System- Life Science Research, Bio-Rad Co.).

Tabela 6. Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije.

Komponente reakcione smeše za PCR reakciju	μl
10 x reakcioni pufer	3,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,8
dNTP (10 mM)	0,6
P1 (2 μM)	3,0
P2 (2 μM)	3,0
Taq polimeraza (5 U / μl)	0,5
DNK uzorka (100 ng / μl)	2,5
voda	15,6
	30,0

3.7.2. RT-PCR analiza

Izolacija RNK

Izolacija RNK iz transformisanih, kao i kontrolnih netransformisanih korenova *C. murale* starih 4 nedelje vršena je po metodi Gašić i sar. (2004):

- Po 200 mg sveže mase očeđenih korenova je samleveno u tečnom azotu i zatim prebačeno u *RNase-free* sterilne ependorfice zapremine 2 ml koje su prethodno ohlađene na ledu.
- U svaki uzorak je dodato po 1,3 ml ekstrakcionog pufera (2% CTAB, 2% PVP, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8, 2 M NaCl, 0,5 g/l spermidina i 2% β -merkaptoetanolu dodatog neposredno pre upotrebe).
- Ependorf tube su vorteksovane 20 sekundi. Potom su inkubirane u vodenom kupatilu na 60°C 15 min.
- U svaki uzorak dodato je po 650 μl smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1), vorteksovano 20 sekundi i centrifugirano na 10000 x g 10 min na 4°C.

- Izdvojeni supernatant podvrgnut je još jednom postupku ekstrakcije sa hloroformom i izoamilalkoholom (ponovljen je prethodni korak). U izdvojeni supernatant (500 µl) dodato je po 1/3 zapremine hladnog 7,5 M LiCl, uzorci su promućkani nekoliko puta i ostavljeni u frižideru (na 4°C) preko noći.
- Nakon toga uzorci su centrifugirani na 12000 x g na 4°C, 45 min. Supernatant je odstranjen, a talog je ispiran sa 1 ml hladnog 70% etanola i potom sušen na vazduhu u laminaru 5 min.
- Talog RNK rastvaran je dodavanjem 100 µl DEPC vode, potom je dodavano 10 µl 3M Na-acetata (pH 5,5) i 275 µl 70% etanola i ostavljano je 90 min na -80°C.
- Nakon toga sadržaj je odleđen i centrifugiran na 12000 x g, na 4°C 45 min. Supernatant je odlivan, a talog RNK ponovo je ispiran sa 1 ml hladnog 70% etanola i sušen je u laminaru 10 min. Resuspendovan je dodavanjem 50 µl DEPC vode i rastvorena RNK je skladištena u zamrzivaču (-80°C).

Kvantifikovanje RNK

Kvantifikovanje RNK vršeno je na spektrofotometru (Agilent 8453), na talasnim dužinama 260 i 280 nm, i izračunavano prema formuli:

$$C_{\text{RNK}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (40 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times A_{260} \times \text{razblaženje})/1000 = 4 \times A_{260}$$

Razblaženje = 100 (10 µl uzorka RNA + 990 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5).

Uslovi za elektroforezu i vizuelizaciju RNK su bili identični kao i za DNK elektroforezu (videti poglavlje 3.7.1.)

Tretman DNKzom

Uklanjanje genomske DNK iz uzoraka RNK, vršeno je pomoću enzima DNKze (Fermentas). Komponente reakcione smeše su prikazane u Tabeli 7. Uslovi reakcije: 30 min na 37°C. Enzim je inhibiran dodavanjem 1 µl 25mM EDTA (Fermentas) i inkubiranjem na 65°C 10 min.

Tabela 7. Sastav reakcione smeše pojedinačne reakcije za tretman DNKzom.

Komponente reakcione smeše za tretman DNKzom	μl
uzorak RNK (2 μg)	7,75
10 x reakcioni pufer sa MgCl_2	1,00
DNKza I (1 U / μl)	1,00
inhibitor RNKze <i>RiboLock RI</i> (40 U / μl)	0,25
	10,00

Reverzna transkripcija (RT)

Reverzna transkripcija (RT) je rađena pomoću GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit-a (Applied Biosystems). Reakciona smeša za reverznu transkripciju je sadržala komponente koje su prikazane u Tabeli 8. Uslovi RT reakcije su bili: 25°C 10min; 42°C 12min.

Tabela 8. Sastav reakcione smeše pojedinačne RT reakcije.

Komponente reakcione smeše za RT reakciju	μl
RNK iz prethodnog koraka	4,0
oligo-dT prajmeri	0,5
5 x reakcioni pufer	4,0
inhibitor RNKze (20 U / μl)	0,5
dNTP miks (10 mM)	2,0
MgCl_2 (25 mM)	2,0
DTT (100 mM)	2,0
reverzna transkriptaza (50 U / μl)	0,3
DEPC voda	4,7
	20,0

PCR amplifikacija

Dobijena cDNK (2 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l} = 100 \text{ ng}/1 \mu\text{l}$) je podvrgnuta PCR amplifikaciji. Reakciona smeša je sadržala komponente prikazane u Tabeli 9. Za PCR reakcije korišćen je aparat Genius Thermocycler (Techne).

Uslovi PCR reakcije:

- 5 min 95°C,
- 40 ciklusa: 15 s 95°C, 30 s 53°C, 30 s 72°C
- 10 min 72°C

Tabela 9. Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije.

Komponente reakcione smeše za PCR reakciju	μl
voda	7,50
5 x reakcioni pufer	3,00
dNTP (10 mM)	1,00
MgCl ₂ (25 mM)	0,75
P1 (5 μM)	1,25
P2 (5 μM)	1,25
Taq DNK polimeraza (5 U / μl)	0,25
cDNK iz prethodne reakcije	10,00
	25,00

3.8. Karakterizacija rasta transformisanih korenova *C. murale*

Radi praćenja rasta i morfologije transformisanih korenova, vrhovi korena u dužini od 1 cm su odsecani sa 4 nedelje starih kultura svakog pojedinačnog klona i postavljeni u Petri kutije (prečnika 9 cm) na čvrsti BM u tri ponavljanja. Prečnik korena i gustina korena

(broj bočnih korenova po centimetru primarnog korena) su određivani posle 4 nedelje gajenja.

Radi određivanja stope prirasta korenova uspostavljene su tečne kulture za svaki pojedinačni klon. U tu svrhu 25 mg sveže mase korena uzete iz četiri nedelje stare kulture je postavljeno u 50 ml tečnog BM (po tri Erlenmajera za svaki klon) i gajeno na šejkeru (70 rpm) na temperaturi od 25°C. Nakon 4 nedelje korenovi su očeđeni na filter papiru i izmerena je njihova sveža masa. Kultura korenova uzetih sa netransformisanih eksplantata je korišćena kao kontrola.

3.9. Histocitološka karakterizacija transformisanih korenova *C. murale*

Vrhovi kontrolnih netransformisanih (K) i transformisanih korenova (klonovi R1, R3, R5, C9 i C10), koji su gajeni u tečnom BM 4 nedelje, korišćeni su za histološku analizu. Materijal je fiksiran pomoću 3% glutaraldehida rastvorenog u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7,2), na temperaturi od 4°C u trajanju od 24 h. Postfiksacija uzoraka je vršena 1% rastvorom osmijum-tetroksida u fosfatnom puferu tokom 24 h na temperaturi od 4°C. Uzorci su zatim dehidratirani serijom etil-alkohola rastuće koncentracije. Kalupljenje je izvršeno u Aralditu CY 212 (Agar Scientific Ltd.). Poludebeli preseći, debljine 1,5 µm, su sećeni ultramikrotomom LKB III. Preseći su montirani na predmetna stakla i bojeni su metilen-plavim. Preparati su posmatrani i snimani pod mikroskopom Zeiss Axiovert.

3.10. Efekti fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka: arabidopsisa pšenice i salate

Transformisani korenovi *C. murale*, početne mase od 25 mg su gajeni na šejkeru u 50 ml tečnog BM u Erlenmajerima zapremine 100 ml, pri temperaturi od 25 ± 2°C i svetlosnom režimu od 16 sati svetlosti i 8 sati mraka, u periodu od 4 nedelje. Nakon tog perioda, korenovi su izvađeni iz medijuma (u daljem tekstu označen kao fitotoksični

medijum – FM) koji je sadržao produkte njihovog metabolizma i koji je korišćen za dalje eksperimente. FM netransformisanih kontrolnih korenova je dobijen tako što su klijanci *C. murale* stari 10 dana postavljeni na metalne držače u epruvetama od 20 ml, sa korenovima potopljenim u 10 ml tečnog BM. Nakon 30 dana gajenja u tečnom medijumu sa klijanaca su odsecani korenovi i masa od 500 mg, gajena je u 50 ml tečnog BM na šejkeru u periodu od 4 nedelje. Ovaj medijum je, nakon vađenja korenova, služio kao pozitivna kontrola. Kao negativna kontrola korišćen je čist BM.

FM su korišćeni u eksperimentima za ispitivanje njihovih efekata na klijanje i rast test biljaka: arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotip Columbia), pšenice (*Triticum aestivum* L. sorta Nataša) i salate (*Lactuca sativa* L. sorta Majska Kraljica).

Semena arabidopsisa su površinski sterilisana 30 sekundi u rastvoru varikine i etanola (odnos 1:4) uz blago mućkanje, ispirana su 5 puta sterilnom destilovanom vodom i zatim su očeđena na filter papiru. Po 50 semena je postavljano na dvoslojni filter papir u Petri kutije (prečnika 9 cm) u koje je prethodno sipano po 4 ml FM ili kontrolnog BM. Eksperiment je ponavljan 3 puta, sa po 3 Petri kutije po tretmanu. Semena su držana tri dana u frižideru na 4°C, a zatim u sobi za gajenje kultura, 3 nedelje. Mereni su sledeći parametri: dužina najdužeg korena, dužina najdužeg lista, broj listova u rozeti, sveža masa klijanaca i krajnja klijavost semena.

Semena pšenice su prvo ispirana energičnim mućkanjem u vodi i deterdžentu, zatim su površinski sterilisana potapanjem u 70% etanol 1 min i u 80% rastvor varikine kome je dodat antimikotik Merptan (na vrh nožića) 15 min. Nakon toga semena pšenice su prebačena u 0,1% HgCl₂ (w/v) 20 min, posle čega su ispirana 5 puta sterilnom destilovanom vodom, očeđena na filter papiru i 7 dana iskljavana u Petri kutijama (prečnika 9 cm) na dvoslojnom filter papiru sa po 10 ml FM ili BM. Po 20 semena je postavljeno po jednoj Petri kutiji, a eksperiment je ponavljan 3 puta sa po 3 Petri kutije po tretmanu. Mereni su sledeći parametri: krajnja klijavost semena, dužina najdužeg korena, dužina izdanka i sveža masa klijanaca.

Semena salate su sterilisana u 50% varikini 5 minuta, ispirana su 5 puta sterilnom vodom, postavljena su u Petri kutije (prečnika 6 cm) na dvoslojan filter papir sa po 2 ml FM ili BM i inkubirana su 1 nedelju. Po 30 semena je postavljeno po Petri kutiji, a

eksperiment je ponovljen 3 puta sa po 3 Petri kutije po tretmanu. Mereni parametri su bili: krajnja klijavost semena, dužina korena, dužina kotiledona i sveža masa klijanaca.

Sve Petri kutije su obavijane parafilmom (Pechiney Plastic packaging, Chicago, IL) i držane su u sobi za gajenje kultura na temperaturi od $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i osvetljenju od 16 h.

Dužina trajanja eksperimenta za svaku test biljku je određena tako da se efekat FM jasno vidi i da se dobije dovoljna količina biljnog materijala za dalje analize. Za arabidopsis je određena dužina tretmana 3 nedelje, jer su klijanci bili sitni, sa malom biomasom, dok je za pšenicu i salatu određena dužina tretmana 1 nedelja, jer su klijanci bili krupniji.

3.11. Analiza antioksidativnih enzima kod tretiranih test biljaka

Oksidativni stres praćen je kod klijanaca arabidopsisa i pšenice koji su 21, odnosno 7 dana isključivani na FM. Rađeno je razdvajanje izoenzima katalaza, superoksid dismutaza i peroksidaza u poliakrilamidnom gelu nedenaturišućom elektroforezom (*Native PAGE*). Gelovi su slikani uz pomoć Gel-DocTM EQ System- a (Life Science Research, Bio-Rad Co.). Analiza gelova je rađena primenom grafičkog paketa Image Quant 5.2. Uzorci su analizirani u 3 ponavljanja.

Osim navedenog, rađena je i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza.

3.11.1. Izolacija ukupnih proteina

Uzorci test biljaka (arabidopsis – celi klijanci i pšenica – odvojeno korenovi i izdanci, po 750 mg) su mehanički usitnjeni do sitnog praha u tečnom azotu, a zatim homogenizovani u puferu za ekstrakciju proteina (1:4, w/v). Pufer za ekstrakciju proteina (PEB) je sadržao: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 30% glicerol, 1,5% PVPP, 10 mM DTT i 1 mM PMSF). Uzorci su prenošeni u ependorf tubice koje su stajale na ledu i centrifugirani su na $12000 \times g$ 10 min na 4°C . Gornja faza koja je sadržala rastvorljive ćelijske proteine je potom profiltrirana kroz gazu i zatim prebačena u nove ependorf tube na

ledu. Uzorci su čuvani na -80°C do upotrebe. Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu određena je spektrofotometrijski (Bradford, 1976) uz korišćenje BSA (*Bovine Serum Albumin*) kao proteinskog standarda.

3.11.2. Nativna elektroforeza (*Native PAGE*)

Razdvajanje izoformi enzima je vršeno nativnom elektroforezom (*Native PAGE*) na poliakrilamidnom gelu. On se sastojao iz 2 gela: 5% gela za koncentrovanje uzoraka (za 4,500 ml gela: 2,830 ml vode; 0,875 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0); 0,750 ml mešavine 30% akrilamida i 0,8% bisakrilamida; 7,5 μl TEMED-a i 15,0 μl APS-a) i 7% gela za razdvajanje (za 10,00 ml gela: 4,80 ml vode; 2,80 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 2,35 ml mešavine 30% akrilamida i 0,8% bisakrilamida; 15 μl TEMED-a i 30 μl APS-a). Debljina gelova je bila 1,5 mm.

Na gelove su nanošeni uzorci proteina (μg / uzorku) u sledećim koncentracijama: za analizu CAT (30 μg za arabidopsis, 15 μg za pšenicu), POX (50 μg za arabidopsis, 20 μg za pšenicu) i SOD (15 μg za arabidopsis, 20 μg za pšenicu), jer su se tada najbolje izdvajale izoforme. Elektroforeza je vršena u aparaturi za vertikalnu elektroforezu SE 600 Rubi, Amersham Biosciences, USA, osim za detekciju SOD kod arabidopsisa, kada je korišćena SERVA Blue Blot Wet 100, GimbH. Prilikom elektroforeze korišćen je pufer koji je sadržao 25 mM Tris-HCl i 192 mM glicin, pH 8,3. Detekcija aktivnosti svakog enzima rađena je 3 puta.

3.11.2.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza

Razdvajanje izoenzima katalaza vršeno je prema metodi Woodbury i sar. (1971), elektroforezom na 150 V 1 h, zatim na 200 V 3 h. Nakon elektroforeze gelovi su isprani dejonizovanom vodom, zatim su držani u 0,01% H_2O_2 25 minuta na klackalici. Posle toga isprani su dejonizovanom vodom i držani su u 2% rastvoru $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 30 s, zatim je u taj rastvor dodata ista zapremina 2% rastvora FeCl_3 pri čemu se formiralo plavo-zeleno jedinjenja $\text{KFe}^{\text{III}}(\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6)$, tako da je gel postajao plavo-zelen. Na mestima na kojima je

bila prisutna katalaza, koja je vršila degradaciju H_2O_2 , pojavljivale su se bezbojne trake nakon nekoliko minuta. Kada su se trake najbolje uočavale reakcija je zaustavljena ispiranjem gela u vodi.

3.11.2.1.1. Inhibicija različitih izoformi katalaza kod arabidopsisa

Ispitivanje osetljivosti različitih izoformi CAT klijanaca arabidopsisa, isključivanih na FM i BM, vršena je sa inhibitorima β -merkaptoetanolom (β -ME) i aminotriazolom (AT) po metodi Prasad-a (1997). β -ME (40mM) je dodavan direktno u uzorak, a AT (5mM) u rastvor za bojenje.

3.11.2.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza

Razdvajanje izoenzima peroksidaza je vršeno prema metodi Roth-a (2002), elektroforezom na 150 V 1 h, zatim na 200 V 3 h. Ispiranje gelova je vršeno u 100 mM citratnom puferu pH 4, zatim su gelovi inkubirani 30 min u reakcionom puferu (100 mM citratni pufer pH 4, 10 mM H_2O_2 i 10 mM supstrat: gvajakol za pšenicu ili pirogalol za arabidopsis) sve do pojave crveno-braon traka. Reakcija se odvijala između H_2O_2 i odgovarajućeg supstrata, pri čemu je nastajao tetrahydrogvajakol ili purpurogalin. Nakon ove reakcije gelovi su ispirani vodom i slikani.

3.11.2.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza

Razdvajanje izoenzima superoksid dismutaza rađeno je po metodi Beauchamp-a i Fridovich-a (1971), elektroforezom u aparaturi za vertikalnu elektroforezu (SE 600 Rubi) 1 h na 150 V i 3 h na 200V kod pšenice i elektroforezom u aparaturi za vertikalnu elektroforezu (SERVA Blue Blot Wet 100, GimbH) 1 h na 120 V i 1 h na 150 V kod arabidopsisa. Gelovi su zatim ispirani vodom. Posle toga gelovi su inkubirani u esej reagensu u mraku 30 min na klackalici (za 20 ml reagensa korišćeno je 4,4 mg NBT;

0,6 mg riboflavina; 80 μ l 250 mM EDTA; 4 μ l TEMED-a i do 20 ml 100 mM K-P pufera pH 7,8). Nakon inkubacije, gelovi su ispirani vodom i osvetljavani su svetlošću neonske lampe do purpurno-ljubičaste boje, koja je poticala od formiranog formazana. Na mestima aktivnosti SOD uočavale su se bezbojne trake.

3.11.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti antioksidativnih enzima

3.11.3.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza

Aktivnost katalaza određivana je spektrofotometrijski praćenjem kinetike nestajanja vodonik peroksida (A_{240} $\epsilon=0.0436$ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), prema metodi Aebi (1984). Korišćeni su 50 mM K-Na-fosfatni pufer (pH 7) i 0,2% H_2O_2 . Apsorbanca je bila $0,85 \pm 0,02$. Jedinica (U) se definiše kao količina enzima koja razgradi 1 μM H_2O_2 za 1 min. Aktivnost CAT se izražavala u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina. Aktivnost CAT je merena 3 min, na temperaturi od 20°C , na svakih 20 s:

$$A_{\text{CAT}} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) \times V_k \times 1000}{0,0436 \times V_e \times W_{\text{up}}}$$

ΔA – promena apsorbance ($\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

ΔA_0 – promena apsorbance blank rastvora ($\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V_k – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml),

V_e – zapremina uzorka u kivetu (ml),

W_{up} – količina ukupnih proteina dobijena na osnovu Bradfordove krive (mg)

0,0436 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent H_2O_2 na 240 nm ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.11.3.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza je praćena spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance na 430 nm (A_{430} $\epsilon=2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Korišćeno je 1,4 ml 0,05 M K–P pufera (pH 6,5); 30 μl 1 M pirogalola (Sigma) kao supstrata za enzim i 10 μl uzorka, uz dodatak 30 μl 1 M H_2O_2 . Aktivnost je merena 3 min na svakih 20 s, a izražavana je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U/mg). Reakcija se odvijala između supstrata pirogalola i H_2O_2 . Oksidacijom pirogalola nastajao je žučkasto–smeđe obojen purpurogalin, koji je imao maksimum apsorpcije na 430 nm. Aktivnost je određivana u toku linearnog dela krive.

$$A_{\text{POX}} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) \times V_k \times 1000}{2,47 \times V_e \times W_{\text{up}}}$$

ΔA – promena apsorbance ($\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

ΔA_0 – promena apsorbance blank rastvora ($\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V_k – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml)

V_e – zapremina uzorka u kivetu (ml)

W_{up} – količina ukupnih proteina dobijena na osnovu Bradfordove krive (mg)

2,47 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola na 430 nm ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.11.3.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza

Aktivnost ukupnih superoksid dismutaza je merena po metodi Beyer–a i Fridovich–a (1987). Reakciona smeša (1 ml) se sastojala od: 775 – 800 μl 100 mM K–P pufera (pH 7,8); 50 μl 0,1 mM EDTA; 50 μl 3,0 mM L–metionina; 50 μl 5,0 mM NBT; 50 μl 2,0 mM riboflavina i 5 – 25 μl uzorka. Reakcija je otpočinjala izlaganjem reakcione smeše osvetljenju od 30 W pod fluorescentnom lampom, 15 min na temperaturi od 20°C. SOD aktivnost je određivana na osnovu kapaciteta ekstrakta da inhibira fotohemijisku redukciju

NBT-a do formazana. Plava boja se pojavljivala tokom reakcije. Apsorbanca na 540 nm je izmerena pomoću aparata *ELISA Micro Plate Reader* (LKB 5060–006). Kontrolna reakciona smeša je bila bez uzorka proteina. Jedna SOD jedinica (U) je definisana kao količina enzima neophodna da inhibira 50% NBT fotoredukcije u poređenju sa smešom bez uzorka proteina. Izražava se u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U/mg).

Sva merenja za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza su rađena u 3 ponavljanja.

3.12. RT-PCR i qPCR analiza ekspresije gena ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa i pšenice

Semena arabidopsisa su sterilisana na prethodno opisani način (videti poglavlje 3.10.) i isključavana 10 dana u tečnom BM u Erlenmajerima od 100 ml. Prva tri dana semena su držana u frižideru na temperaturi od 4°C, a narednih 7 dana na šejkeru u sobi za gajenje kultura na temperaturi od 25 ± 2°C. Celi klijanci su zatim preneti u Erlenmajere sa po 25 ml FM transformisanog korena R8 (25 klijanaca po Erlenmajeru) i inkubirani su u njemu 15 h uz šejkiranje. Posle toga vrhovi korenova (oko 7 mm) i izdanci (hipoktil, kotiledoni i 1 do 2 para mladih listova) su odsecani, stavljeni u ependorfice, zaleđeni u tečnom azotu i do dalje upotrebe držani u zamrzivaču na –80°C. U svakoj ependorfici je bilo oko 100 mg biljnog materijala.

Semena pšenice su takođe sterilisana na prethodno opisani način (videti poglavlje 3.10.) i zatim su isključavana 7 dana u Petri kutijama (prečnika 9cm) na dvoslojnom filter papiru sa po 10 ml BM na temperaturi 25 ± 2°C. Nakon toga celi klijanci (15 klijanaca po Erlenmajeru) su potapani u 25 ml FM transformisanog korena R8 u Erlenmajeru od 100 ml i inkubirani su 15 h na šejkeru. Vrhovi korenova (oko 5 mm) i apeksi izdanaka (oko 5 mm) sa kojih je prethodno odstranjen koleoptil su odsecani, stavljeni su u ependorfice i zaleđeni su u tečnom azotu. U svakoj ependorfici je bilo oko 100 mg biljnog materijala. Uzorci su do upotrebe čuvani u zamrzivaču na –80°C.

Izolacija RNK

Izolacija ukupne količine RNK iz kontrolnih i tretiranih uzoraka arabidopsisa i pšenice vršena je koristeći Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma–Aldrich®) po uputstvu proizvođača.

- RNK je izolovana iz 100 mg biljnog tkiva. Uzorci su homogenizovani plastičnim štapićima u ependorf tubama (2 ml), sve vreme držanim u tečnom azotu. U homogenate je dodato po 500 µl rastvora za liziranje (*Lysis solution/2* + β merkaptotanol). Ependorf tube su vorteksovane 30 s, a zatim su inkubirane na 56°C 5 min.
- Uzorci su centrifugirani na maksimalnom broju obrtaja (14500 rpm), da bi se oborio talog. Supernatanti (lizati) su profiltrirani kroz kolonice centrifugiranjem 1 min na maksimalnom broju obrtaja. U lizate je dodato 500 µl vezujućeg rastvora (*Binding Solution*) i sve je promešano pipetiranjem.
- Polovina ukupnog sadržaja (700 µl) je sipana u vezujuće kolone i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja. Filtrati su prosuti, a ostatak tečnosti je sipan u kolonice i centrifugiran 1 min na maksimalnom broju obrtaja. Filtrati su prosuti a RNK je zadržana na membrani.
- U kolonice je dodato 500 µl rastvora za ispiranje 1 (*Wash Solution 1*), izvršeno je centrifugiranje 1 min na maksimalnom broju obrtaja. Filtrati su prosuti, a talog RNK je ispiran rastvorom 2 (*Wash Solution 2*) 2 puta i centrifugiran je na maksimalnom broju obrtaja 30 sekundi. Sušenje uzoraka je vršeno centrifugiranjem na 14500 rpm 1 min. Filtrati su prosuti, a kolonice su prebačene u čistu ependorf tubu (2 ml).
- U kolonice je dodato 50 µl rastvora za eluciju (*Elution Solution*) i 1 min je ostavljeno da odstoje. Ependorf tube su centrifugirane na 14500 rpm 1 minut.
- Na kraju je dobijeno 50 µl rastvora za eluciju sa izolovanom ukupnom RNK.

Kvantifikovanje RNK, kao i tretman DNK–azom je vršeno na način kako je opisano u poglavlju 3.7.2.

Reverzna transkripcija (RT)

Reverzna transkripcija je urađena pomoću Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit-a (Fermentas, Wiaame i sar., 2000). Jedna reakcija za 2 µg RNA je sadržala komponente prikazane u Tabeli 10. Uslovi reakcije su bili 42°C 60 min, pa zatim 70°C 5 min.

Tabela 10. Sastav reakcione smeše pojedinačne RT reakcije.

Komponente reakcione smeše za RT reakciju	µl
RNK iz prethodnog koraka	11
oligo-dT prajmeri	1
5 x reakcioni pufer	4
inhibitor RNKze <i>RiboLock RI</i> (20 U/ µl)	1
dNTP miks (10 mM)	1
reverzna transkriptaza (200 U/ µl)	2
	20

Uslovi RT reakcije: 42°C 60 min, 70°C 5 min.

PCR amplifikacija

Dobijena cDNK (2 µg/20 µl = 100 ng/1 µl) je korišćena u PCR reakciji prema protokolu za Taq DNA Polimerazu (Fermentas recombinant, EP0401). Uslovi amplifikacije su bili sledeći:

- 5 min 95°C,
- 40 ciklusa: 15 s 95°C, 30 s 53°C, 30 s 72°C
- 10 min 72°C

Za PCR reakcije korišćen je aparat Genius Thermocycler (Techne). Uslovi za elektroforezu i vizuelizaciju PCR produkata su bili identični kao što je opisano u poglavlju 3.7.1. Analiza dobijenih PCR produkata je rađena u programu Total Lab (TotalLab TL 120 v2009, Nonlinear Dinamics Ltd.).

3.12.1. Priprema standarda za qPCR

Standardi za apsolutnu kvantifikaciju *CDK* i *CYC* transkripata su bili pripremljeni od totalne mRNA arabidopsisa odnosno pšenice, koja je bila reverzno transkribovana i potom amplifikovana specifičnim prajmerima. Dobijeni amplikoni su bili prečišćeni agaroznom elektroforezom, ekstrahovani iz gela i spektrofotometrijski kvantifikovani. Za svaki gen je bila napravljena serija razblaženja od 10^9 do 10^2 kopija/ μ l, koji su potom korišćeni kao standardi.

Ekstrakcija produkata RT-PCR amplifikacije analiziranih gena iz agaroznog gela

Ekstrakcija je rađena je sa Gene JETTM Gel Extraction Kit-om (Fermentas) prema metodi Boom-a i sar. (1990).

- Trake na gelu, koje su bile uočljive pri UV osvetljenju, su odsecane skalpelom i ubacivane u ependorf tube kojima je prethodno izmerena masa. Uzorci su držani u frižideru na 4°C do daljeg rada. U ependorf tube je sipan vezujući pufer (*Binding Buffer*) u odnosu 1:1 (100 μ l vezujućeg pufera : 100 mg agaroznog gela).
- Sadržaj u ependorf tubama je inkubiran u vodenom kupatilu na 56°C 10 min da bi se gel u potpunosti rastvorio do pojave žute boje. Ependorf tube su povremeno okretane da bi se ubrzalo rastvaranje gela.
- 100 μ l 100% izopropanola je dodato u ependorf tube i sadržaj je snažno promućkan. Sadržaj iz ependorf tuba je zatim sipan u kolone, centrifugiran je 1 min na 13000 rpm, filtrat je bačen a kolone su vraćene u iste ependorf tube. Dodato je 700 μ l pufera za ispiranje (*Wash Buffer*).
- Ependorf tube su centrifugirane 1 min na 13000 rpm. Filtrati su bačeni, a kolone su vraćene u iste ependorf tube. Prazne kolone su centrifugirane 1 min na 13000 rpm da bi se kompletno odstranili ostaci pufera za ispiranje.

- Kolone su prebačene u čiste ependorf tube od 2 ml u koje je dodato 50 µl elucionog pufera (*Elution Buffer*) i centrifugirane 1 min na 13000 rpm. Kolone su odstranjene a filtrati, koji su sadržali produkte RT-PCR amplifikacije iz agaroznog gela, su čuvani na -20°C.

Kvantifikovanje ekstrahovanih produkata RT-PCR amplifikacije

Kvantifikacija je vršena spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm (10 µl uzorka DNK + 990 µl Tris-HCl 10 mM pH 7,5) i izračunavana prema formuli:

$$C_{\text{DNK}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times A_{260} \times \text{razblaženje})/1000 = 5 \times A_{260}$$

Manja razblaženja ekstrahovanih produkata RT-PCR amplifikacije analiziranih gena su pravljena iz većih uzimajući 10 µl većeg standarda i 90 µl vode iz ampula. Standardi su pravljeni u tri ponavljanja u ependorficama od 0,2 ml. Za qPCR je uzimano po 1 µl standarda.

qPCR analiza

qPCR analiza je rađena pomoću Maxima SYBR Green Kit-a (Fermentas) po uputstvima proizvođača. Jedna reakcija je sadržala komponente prikazane u Tabeli 11.

Tabela 11. Sastav reakcione smeše pojedinačne qPCR reakcije.

Komponente reakcione smeše za qPCR reakciju	µl
Syber Green Mix	12,5
R+F prajmeri (oba po 0,3 µM)	1,0
voda	10,5
DNK matrica (100 ng / µl)	1,0
	25,0

Za DNK matricu je uzeto je po 1 µl iz RT reakcije (što odgovara 100 ng / µl RNK) ili po 1 µl standarda cDNK.

Uslovi amplifikacije su bili sledeći:

- 10 min 95°C,
- 40 ciklusa: 15 s 95°C, 30 s 54°C, 30 s 72°C
- 10 min 72°C

Prajmeri korišćeni za qPCR analizu kod arabidosisa i pšenice prikazani su u Tabelama 12 i 13. Očekivana dužina fragmenata tj. amplikona je dobijena pomoću programa Primer Blast, koji je korišćen i za dizajniranje prajmera.

SYBR Green boja, koja je bila dodata u uzorke, nakon vezivanja za dvolančanu DNK, emitovala je karakterističan fluorescentni signal koji se detektovao pomoću qPCR aparata.

Ct (*threshold cycle*) vrednost, tj. broj ciklusa u kome je fluorescencija uzoraka dostizala prag (threshold) iznad “fluorescentnog šuma” koji je poticao od nespecifične fluorescencije, određivana je automatski, programom 7000 System SDS Software i po potrebi doterivana manuelno. Standardne krive, koje pokazuju zavisnost Ct vrednosti od logaritamskog broja kopija matrice u standardnim razblaženjima, na početku qPCR reakcije, korišćene su za izračunavanje broja kopija transkripta, odnosno cDNK, u nepoznatim uzorcima. Analizirane su i krive topljenja amplikona. Tačke topljenja amplikona (T_m) se definišu kao temperature na kojima je prelaz iz dvolančane u jednolančanu formu najbrži.

Za qPCR reakcije korišćen je aparat ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Tabela 12. Sekvence prajmera gena koji su ispitivani kod arabidopsisa.

Ime gena	F/R	Sekvanca prajmera (5'→3')	Dužina amplikona (bp)	Dužina prajmera (b)	T _m (°C)	GC%
<i>ACTIN7</i>	ACT-F	ACAGGAAATGCTTCTAAGTGTGTCT	171	25	54,44	40,00
	ACT-R	ACACAAGACTTCTTGACACAACCA		24	54,84	41,67
<i>APCI</i>	APCI-F	CATTCTGCCAGAGCGTGCTA	211	20	54,71	55,00
	APCI-R	GCACAACGTGCAAAACGCTA		20	54,32	50,00
<i>CDKA;1</i>	CDKA1-F	CCGTACGAGGATACATGGCG	124	20	54,74	60,00
	CDKA1-R	GGAGATCGACTCCATCGGGA		20	54,68	60,00
<i>CDKB1;1</i>	CDKB11-F	CTAAGTGGGAGCCGCAAGAC	177	20	55,00	60,00
	CDKB11-R	ACAGCAATGAACTTCAGAACTGAGA		25	54,70	40,00
<i>CDKB1;2</i>	CDKB12-F	TCTCAGTTCTGACCTCTGCCAA	163	22	55,03	50,00
	CDKB12-R	CTCTCACTCTCGCTGAACAAACA		23	54,98	47,83
<i>CDKB2;1</i>	CDKB21-F	GTACGAGCCAGCGAAAACGAA	170	20	55,37	55,00
	CDKB21-R	GCAGCACACTAGAGATATGCTTGA		24	54,84	45,83
<i>CDKB2;2</i>	CDKB22-F	ACTGGCATGAATACCCGCAA	193	20	54,15	50,00
	CDKB22-R	TAAAGAGAGCCTCAGAGAGAGGAC		24	54,63	50,00
<i>CYCA3;1</i>	CYCA31-F	GCGGGTGATTTGAAAGAATGTGTG	134	24	55,57	45,83
	CYCA31-R	GGTGATACAGGCAATTGTCGCT		21	54,93	52,38
<i>CYCB2;4</i>	CYCB24-F	GCATCGGGGATCTACACTGC	141	20	55,93	60,00
	CYCB24-R	CCCTGCCCTTGTGATGCAAAC		20	54,29	55,00
<i>CYCD2;1</i>	CYCD21-F	AGGCCTTCTGAGATAGCTGCA	194	21	54,98	52,38
	CYCD21-R	GCCTGCTCCTGCCGATAAACT		20	54,67	55,00
<i>CYCD4;2</i>	CYCD42-F	TCTGTTTCTGGAGAACACTTTGACA	122	25	54,57	40,00
	CYCD42-R	TGTGAACTTGAACCTTGATCCGCTCT		24	54,5	41,67
<i>CYCH;1</i>	CYCH1-F	CTCCTCTTTCCTCCTGGCCA	125	20	54,93	60,00
	CYCH1-R	GTCGTGTGCTCAGAGTTCCG		20	55,38	60,00

Tabela 13. Sekvence prajmera gena koji su ispitivani kod pšenice.

Ime gena	F/R	Sekvanca prajmera (5'→3')	Dužina amplikona (bp)	Dužina prajmera (b)	T _m (°C)	GC (%)
ACT	ACT-F	ATGAGCAAAGAGATCACGGCC	132	21	54,91	52,38
	ACT-R	CCACATCTGCTGGAAAGTGCT				
CYCD2	CYCD2-F	CAGGAGGGACGCCATAGATTG	149	21	54,44	57,14
	CYCD2-R	CCAAGAGCTGTGTCAACCCAAG				
CDC2	CDC2-F	ATCCTTCTTGGAGCAAGGCAG	196	21	54,42	52,38
	CDC2-R	ACTTGTAGTCAGGCAAGGAACTC				
CDK4;3	CDK4;3-F	CGTACATGATCCCGTTGCAGT	207	21	54,97	52,38
	CDK4;3-R	AGGAGGAGGTCGATGGAAGAAG				
CDKB2	CDKB2-F	ACGCCGTAGTCGATGCTTTAG	207	21	54,84	52,38
	CDKB2-R	CCGACCCGTAAGGCTCTCAATG				
CDKD;2	CDKD;2-F	AACGCCGTCGATGCTTCAG	197	19	55,49	57,89
	CDKD;2-R	GCAGATGTGTCGGTTTTTCAGC				

3.13. Analiza fenolnih jedinjenja i šećera u fitotoksičnim medijumima

3.13.1. Određivanje količine ukupnih fenolnih jedinjenja

Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja u FM i korenovima je određivana spektrofotometrijski korišćenjem Folin–Ciocalteu metode (Feldman i Hanks, 1968). Po 50 μ l profiltriranog FM ili metanolskog ekstrakta korenova (1 g suvih korenova / 10 ml 80% metanola) je pomešano sa 475 μ l 5% rastvora natrijum karbonata (Na_2CO_3) i 475 μ l Folin–Ciocalteu reagensa i inkubirano 1 h u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbanca uzoraka je očitavana na 724 nm (HP Agilent 8453 Spektrofotometar, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) i izražena u mikrogram–ekvivalentima galne kiseline (μg EGA) po 1 ml FM i miligram–ekvivalentima galne kiseline (mg EGA) po 1 g suve mase korenova. Za konstrukciju standardne krive korišćena je galna kiselina.

3.13.2. HPLC analiza fenolnih jedinjenja

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja je urađena reverzno–faznom HPLC metodom. FM u kojima su rasli različiti klonovi transformisanih, kao i netransformisani korenovi *C. murale*, su najpre profiltrirani kroz Econofilter, veličina pora 0,45 μm , (Agilent Technologies, Germany). Uzorci su injektirani u HPLC sistem koji se sastoji od 1525 binarnih pumpi, termostata i 717+ autosemplera koji je povezan sa 2996 *Diode Array* detektorom (Waters, Milford, MA, USA). Hromatogrami su dobijeni u 3D modu sa izvedenim zapisima na specifičnim talasnim dužinama za različita jedinjenja (370, 326 i 254 nm). Razdvajanje fenolnih jedinjenja je izvršeno pomoću Symmetry C–18 RP kolone, 125 x 4 mm veličine i dijametra čestice od 5 μm (Waters, Milford, MA, USA) koja je povezana sa odgovarajućom pretkolonom. Dve mobilne faze, A (0,1% fosforna kiselina, H_3PO_4) i B (acetonitril, CH_3CN) su korišćene sa protokom od 1 ml/min uz sledeći gradijentni profil: u prvih 20 min od 10 do 22% B, zatim 20 min linearnog povećanja do 40% B, zatim 5 min vraćanja na 10% B uz konačnih 5 min za ekvilibraciju. Pikovi detektovanih jedinjenja su lokalizovani i identifikovani u HPLC–UV hromatogramima

upoređujući analize standarda sa dobijenim zapisima upoređujući kako njihovo retenciono vreme, tako i UV spektar dobijen pomoću DAD. Kalibraciona kriva je dobijena ubrizgavanjem različitih zapremina smeše standarda uz korišćenje relacije linearne regresije za prikazivanje odnosa dobijene površine pika i poznate koncentracije standarda. Svaka komponenta je analizirana kvantitativno pomoću metode spoljašnjeg standarda koristeći čiste supstance kao referentne za koncentraciju, retenciono vreme i karakteristike UV spektra. Za analizu hromatograma je korišćen Empower 2 programski paket (Waters, Milford, MA, USA). Sve analize su urađene u 3 ponavljanja. Rezultati su predstavljeni kao μmol fenolnih kiselina / l FM.

3.13.3. HPLC analiza šećera

Rastvorljivi šećeri su identifikovani i kvantifikovani metodom tečne hromatografije pod velikim pritiskom (HPLC–PAD). Koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze u uzorcima FM su preračunate na osnovu veličine njihovih pikova, pri čemu su kao standardi korišćene čiste supstance (Sigma Co. St. Louis, MO).

Analize su urađene na Waters Breeze hromatografskom sistemu (Waters, Milford, MA), koji je snabdeven elektrohemijским detektorom (Waters 2465) sa zlatnom radnom elektrodom dijametra 3 mm i vodoničnom referentnom elektrodom. Razdvajanje šećera je izvršeno korišćenjem CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA) kolone (250 x 4 mm) koja je povezana sa odgovarajućom CarboPac PA1 pretkolonom. Kao mobilna faza korišćen je 0,2 M rastvor NaOH. Šećeri su izokratski eluirani tokom 20 min, pri protoku od 1 ml/min, na konstantnoj temperaturi od 30°C. Signali su detektovani u pulsnom modu sa sledećim oblikom signala: $E_1 = +0,05\text{V}$ tokom 400 ms; $E_2 = +0,75\text{ V}$ tokom 200 ms; $E_3 = -0,15\text{ V}$ tokom 300 ms i u okviru 180 ms integrativnog vremena. Vremenska skala filtera je 0,2 s i opseg 200 do 500 nA za celu mV skalu.

Za pripremanje rastvora 0,2 M NaOH korišćen je rastvor NaOH (50% w/w, sa niskim sadržajem karbonata, Baker J.T., Deventer, Holandija) i dejonizovana voda, koja je prethodno vakuum–degasirana.

Sve analize su urađene u 3 ponavljanja. Rezultati su predstavljeni kao mg šećera /ml FM.

3.14. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje i rast test biljaka

Čiste supstance fenolnih kiselina – kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) (Sigma – Aldrich St. Louis, MO, USA), korišćene su u eksperimentima u kojima je ispitivan njihov uticaj na klijanje i rast klijanaca test biljaka. Korišćene su pojedinačne kiseline u koncentracijama od 5,0 mmol/l za tretman pšenice i salate i od 0,5 mmol/l za tretman arabidopsisa ili njihove binarne (2x2,5 mmol/l) i tercijarne (3x1,7 mmol/l) smeše za tretman pšenice i salate. Svaka kiselina je najpre rastvorena u odgovarajućoj zapremini dimetil sulfoksida (DMSO) a zatim je do finalne zapremine dodata topla dejonizovana voda (za tretmane kod pšenice i salate) ili topli BM (za tretmane kod arabidopsisa). Koncentracija DMSO u svim test rastvorima za arabidopsis nije prelazila vrednost od 0,04%, odnosno 0,30% kod pšenice i salate. DMSO u koncentraciji 0,04% ili 0,30% je korišćen kao odgovarajuća kontrola pošto nije uticao na klijavost semena i rast klijanaca test biljaka. Sterilizacija semena, isključavanje, uslovi gajenja, merenje parametara, kao i eksperimentalni dizajn (3 Petri kutije za tretman, 3 ponavljanja eksperimenta) je bio isti kao i u eksperimentima u kojima smo ispitivali inhibitorno dejstvo FM (videti poglavlje 3.10).

3.15. Statistička analiza

Numerički rezultati su obrađivani *One-Way* analizom varijanse (ANOVA test) primenom računarskog programa Statgraphics Centurion XVI. Procentualni rezultati su pre statističke obrade prevedeni u numeričke pomoću funkcije arcsin. Određivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti vršeno je: *Fisher's LSD (least significant difference)* testom za genetičku transformaciju, biotestove sa FM i fenolnim kiselinama, kao i analizu aktivnosti antioksidativnih enzima, na nivou značajnosti od $p \leq 0,05$ i *Tukey's HSD* testom za ekspresiju gena ćelijskog ciklusa. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ili * ukazuju na statistički značajne razlike. Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel.

4. REZULTATI

4.1. Transformacija *C. murale*

4.1.1. Transformacija *C. murale* pomoću *A. rhizogenes* A4M70GUS i histohemijska (GUS) analiza potencijalnih transformanata

Kotiledoni, hipokotili i korenovi, izolovani sa klijanaca *C. murale* starih dve nedelje, kao i listovi, petiole i internodije, izolovani sa biljaka starih mesec i po dana, transformisani su pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. Praćena je pojava transformisanih korenova, kao i uticaj acetosiringona na uspešnost transformacije.

Na skoro svim eksplantatima hipokotila, inokulisanim i neinokulisanim, dve nedelje nakon izolacije, došlo je do formiranja kalusa, dok su se kalusi na eksplantatima kotiledona i korenova javljali u manjem procentu. Korenovi koji su po morfologiji odgovarali *hairy root* fenotipu, pojavljivali su se na inokulisanim eksplantatima dve do tri nedelje posle transformacije sa *A. rhizogenes* (Slika 9). Tanki i slabogranajući korenovi koji su se formirali na neinokulisanim eksplantatima, odlikovali su se slabim rastom i služili su kao kontrola.

Transformisani korenovi su se pojavljivali uglavnom na mestima preseka eksplantata, odnosno na mestima aktivne proliferacije ćelija koja je vodila i formiranju kalusa (Slika 9 a–e). U proseku se formiralo 2 – 5 korenova po eksplantatu. Tri nedelje nakon infekcije dužina indukovanih korenova je varirala od 0,5 do 3,0 cm. Transformisani korenovi su bili beličasti, sa mnogobrojnim korenskim dlakama i odlikovali su se brzim plagiotrofnim rastom (Slika 9 b).

Klonovi potencijalno transformisanih korenova su dobijeni iz pojedinačnih korenova koji su odsecani sa različitih eksplantata. Ukupno 86 klonova je dobijeno mesec dana nakon kokultivacije sa *A. rhizogenes*. Od toga 26% je dobijeno na eksplantatima korenova, 21% na eksplantatima kotiledona i 21% na eksplantatima listova. Najmanje klonova je dobijeno na eksplantatima hipokotila (17%) i internodija (15%).

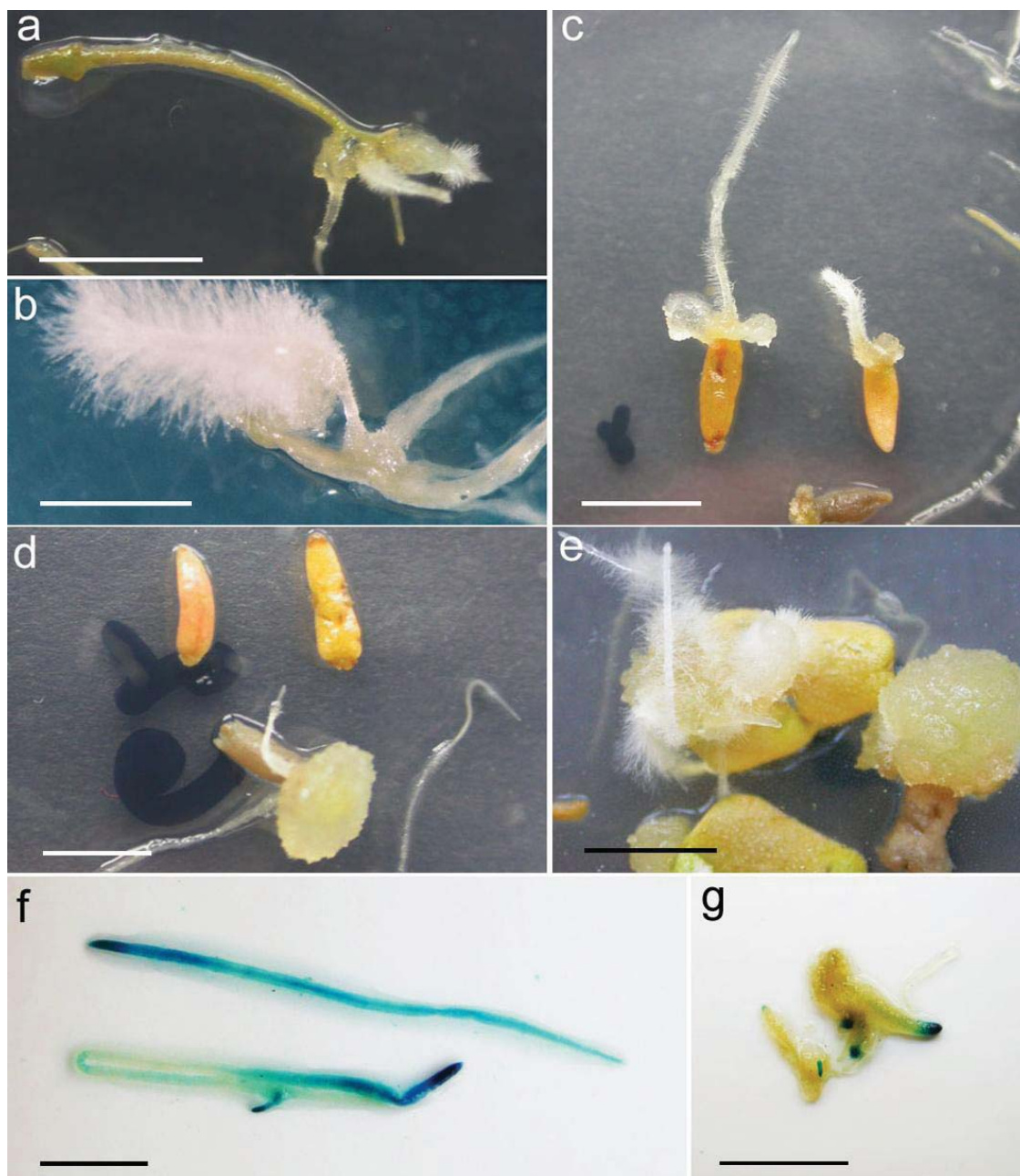
Potencijalno transformisani korenovi su podvrgnuti histochemijskoj GUS analizi i efikasnost transformacije je određivana na osnovu rezultata tog testa (Tabela 14). Od 86 klonova koji su bili testirani, 57 (66,3%) je pokazalo GUS ekspresiju. Primećena je razlika u intenzitetu i distribuciji GUS boje među ispitivanim klonovima. Plava boja je varirala od veoma slabe do intenzivne, a javljala se u vaskularnom cilindru (Slika 9f) ili samo u vršnim delovima korena (Slika 9g).

Najveća učestalost pojave transformisanih korenova postignuta je na eksplantatima korenova (6,5% na BM bez acetosiringona i 11,1% na BM sa acetosiringonom), što se vidi u Tabeli 14. Listovi su imali srednju efikasnost transformacije (5,0% na BM bez acetosiringona i 5,7% na BM sa acetosiringonom), dok je kod kotiledona i hipokotila bila zabeležena najniža efikasnost transformacije (Tabela 14). Internodije i petiole su se pokazale kao nepogodni eksplantati za transformaciju *C. murale*. Internodije su uglavnom kalusirale, a uspešnost transformacije je bila samo 2,8%, dok je najveći broj eksplantata petiola ostao potpuno nepromenjenog izgleda.

Dodavanje 50 μ mol acetosiringona u podlogu tokom kokultivacije dovelo je do povećanja efikasnosti transformacije kod eksplantata korenova sa 6,5% na 11,1%, što je činilo transformaciju približno duplo efikasnijom. Dodavanje acetosiringona u BM, takođe je povećavalo efikasnost transformacije kotiledona sa 2,8% na 3,8%, dok je kod hipokotila transformacija bila uspešna jedino u prisustvu acetosiringona u podlozi (3,2%).

Tabela 14. Pojava transformisanih korenova na različitim tipovima eksplantata *C. murale*, inokulisanih sa *A. rhizogenes* A4M70GUS i određivanje efikasnosti transformacije na osnovu GUS analize. Procenat pozitivnih klonova je dobijen kao srednja vrednost \pm SE od 3 ponavljanja. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) primenom *Fisher's LSD* testa.

Tip eksplantata	Acetosiringon	Ukupan broj eksplantata	Eksplantati sa korenovima		Efikasnost transformacije (GUS pozitivni eksplantati)	
			broj	% \pm SE	broj	% \pm SE
koren	+	126	14	11,1 \pm 2,0 d	14	11,1 \pm 2,0 d
	-	108	8	7,4 \pm 2,9 bcd	7	6,5 \pm 2,4 cd
kotiledon	+	252	10	4,0 \pm 2,2 bc	9	3,8 \pm 1,7 bc
	-	216	8	3,7 \pm 2,0 bc	6	2,8 \pm 1,4 bc
hipokotil	+	126	11	8,7 \pm 2,2 cd	4	3,2 \pm 1,3 bc
	-	108	4	3,7 \pm 4,5 b	0	0,0 \pm 0,0 a
list	+	140	10	7,1 \pm 3,2 bcd	7	5,0 \pm 5,3 bc
	-	140	8	5,7 \pm 0,9 bcd	8	5,7 \pm 0,9 cd
petiola	+	140	0	0,0 \pm 0,0 a	0	0,0 \pm 0,0 a
	-	140	0	0,0 \pm 0,0 a	0	0,0 \pm 0,0 a
internodija	+	70	7	10,0 \pm 3,0 cd	0	0,0 \pm 0,0 a
	-	70	6	8,5 \pm 4,1 bcd	2	2,8 \pm 5,6 ab

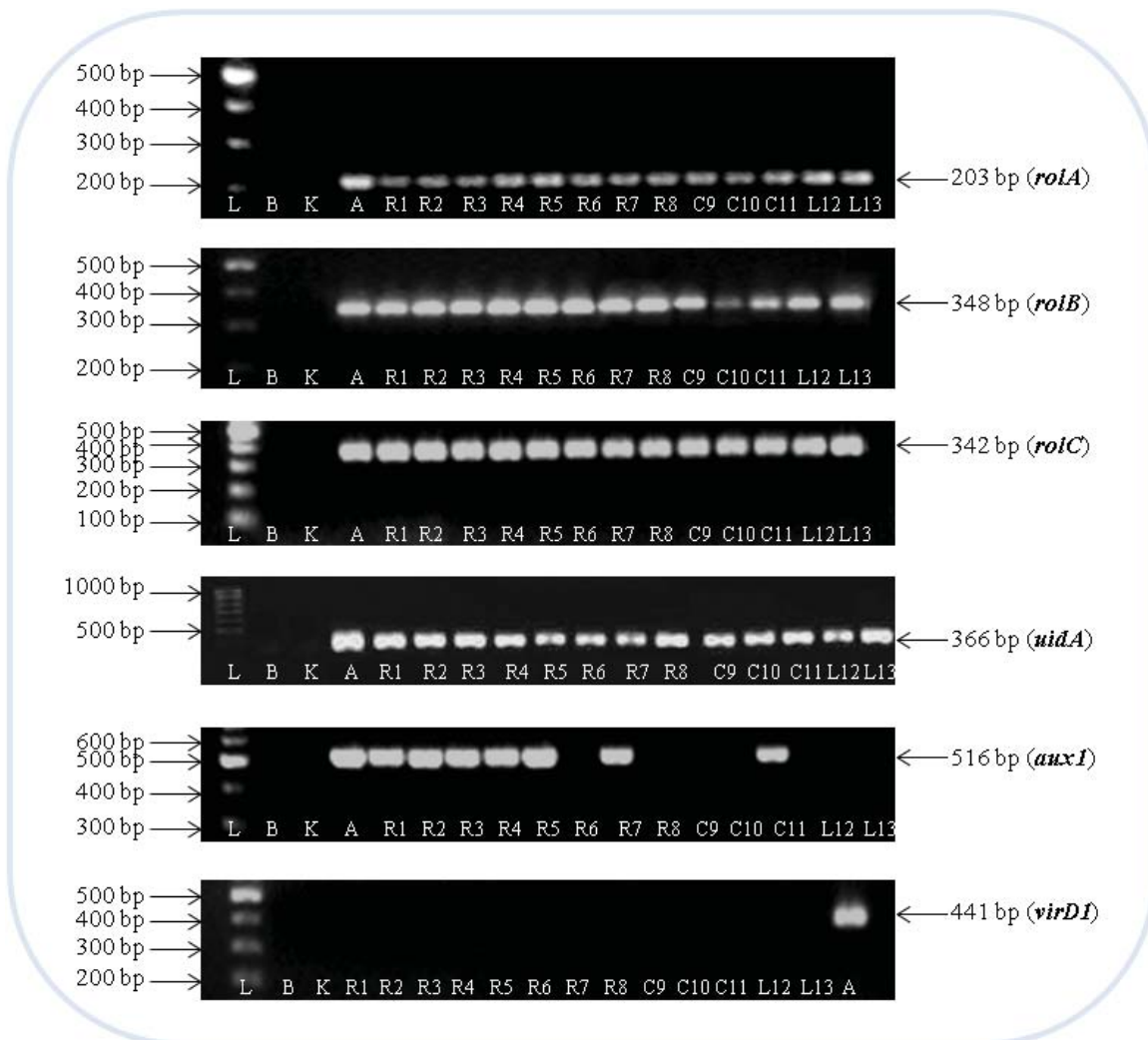


Slika 9. Indukcija transformisanih korenova na eksplantatima korenova (a, b), kotiledona (c), internodija (d) i listova (e) klijanaca *C. murale* tri nedelje posle kokultivacije sa *A. rhizogenes* A4M70GUS. Pozitivna GUS reakcija transformisanih korenova (f, g). Vaskularni cilindar (f) i apikalni region korena (g) su se intenzivno bojili u plavo. Bar za a, b, c, d, e i g = 5 mm, za b i f = 2 mm.

4.1.2. Dokazivanje prisustva transgena pomoću PCR i RT-PCR analize

Trinaest klonova transformisanih korenova, koji su pokazali intenzivnu GUS ekspresiju i koji su rasli na čvrstom i tečnom BM bez hormona, izdvojeno je za dalja istraživanja. Među njima, 8 klonova je dobijeno na eksplantatima korenova (R1–R8), 3 na eksplantatima kotiledona (C9–C11) i 2 na eksplantatima listova (L12 i L13). Integracija T–DNK u ćelije potencijalno transformisanih korenova *C. murale* potvrđena je PCR analizom genomske DNK. Korišćeni su PCR prajmeri koji su specifični za sekvence *rolA*, *rolB* i *rolC* gena u T_L regionu Ri plazmida, *uidA* gena koji se nalazi između *rolC* i *rolD* gena, takođe u T_L regionu i *aux1* gena koji se nalazi u T_R regionu. Prisustvo *uidA*, *rolA*, *rolB* i *rolC* gena je potvrđeno u svim transformisanim klonovima. Gen *aux1* je detektovan kod 7 klonova (R1–R5, R7 i C11). U negativnoj kontroli, odnosno u DNK izolovanoj iz netransformisanih korenova, nije potvrđeno prisustvo nijednog gore navedenog gena. Odsustvo bakterijske kontaminacije je potvrđeno kod svih analiziranih klonova, jer *virD1*–specifičan signal nije bio detektovan kod transformisanih korenova (Slika 10).

RT–PCR analizom potvrđeno je prisustvo *rolA*, *rolB* i *rolC* gena u svim testiranim transformisanim klonovima, dok je prisustvo *aux1* gena detektovana samo kod tri klona – R2, R3 i C11 (Tabela 15). Nijedan od pomenutih gena nije bio prisutan kod netransformisanih korenova (Tabela 15).



Slika 10. PCR analiza genomske DNK izolovane iz netransformisanih kontrolnih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1–R5, C9–C11 i L12–L13) *C. murale*. Korišćeni su prajmeri koji su specifični za sekvence *rolA*, *rolB*, *rolC*, *uidA*, *auxI* i *virD1*, pomoću kojih su se umnožili odgovarajući fragmenti veličine 203 bp, 348 bp, 342 bp, 366 bp, 516 bp i 441 bp, respektivno. L – DNK marker, B – blank, A – *A. rhizogenes* A4M70GUS (pozitivna kontrola).

Tabela 15. RT–PCR analiza *rol* i *aux1* gena u klonovima transformisanih korenova *C. murale*.

klonovi transformisanih korenova	T _L geni			T _R geni	fenotipski izgled korenova	boja medijuma
	<i>rolA</i>	<i>rolB</i>	<i>rolC</i>	<i>aux1</i>		
A4M70GUS	+	+	+	+	/	/
K	–	–	–	–	tanak*	bezbojna
R1	+	+	+	+	debeo	žuta
R2	+	+	+	+	debeo	žuta
R3	+	+	+	+	debeo	žuta
R4	+	+	+	+	debeo	žuta
R5	+	+	+	+	kalusirajući	žuta
R6	+	+	+	–	tanak	svetlo žuta
R7	+	+	+	+	kalusirajući	bezbojna
R8	+	+	+	–	debeo	žuta
C9	+	+	+	–	tanak	bezbojna
C10	+	+	+	–	tanak	bezbojna
C11	+	+	+	+	tanak	svetlo žuta
L12	+	+	+	–	tanak	bezbojna
L13	+	+	+	–	tanak	bezbojna

*tanki korenovi, debljine 0–1 mm

4.1.3. Optimizacija i karakterizacija rasta različitih klonova transformisanih korenova *C. murale*

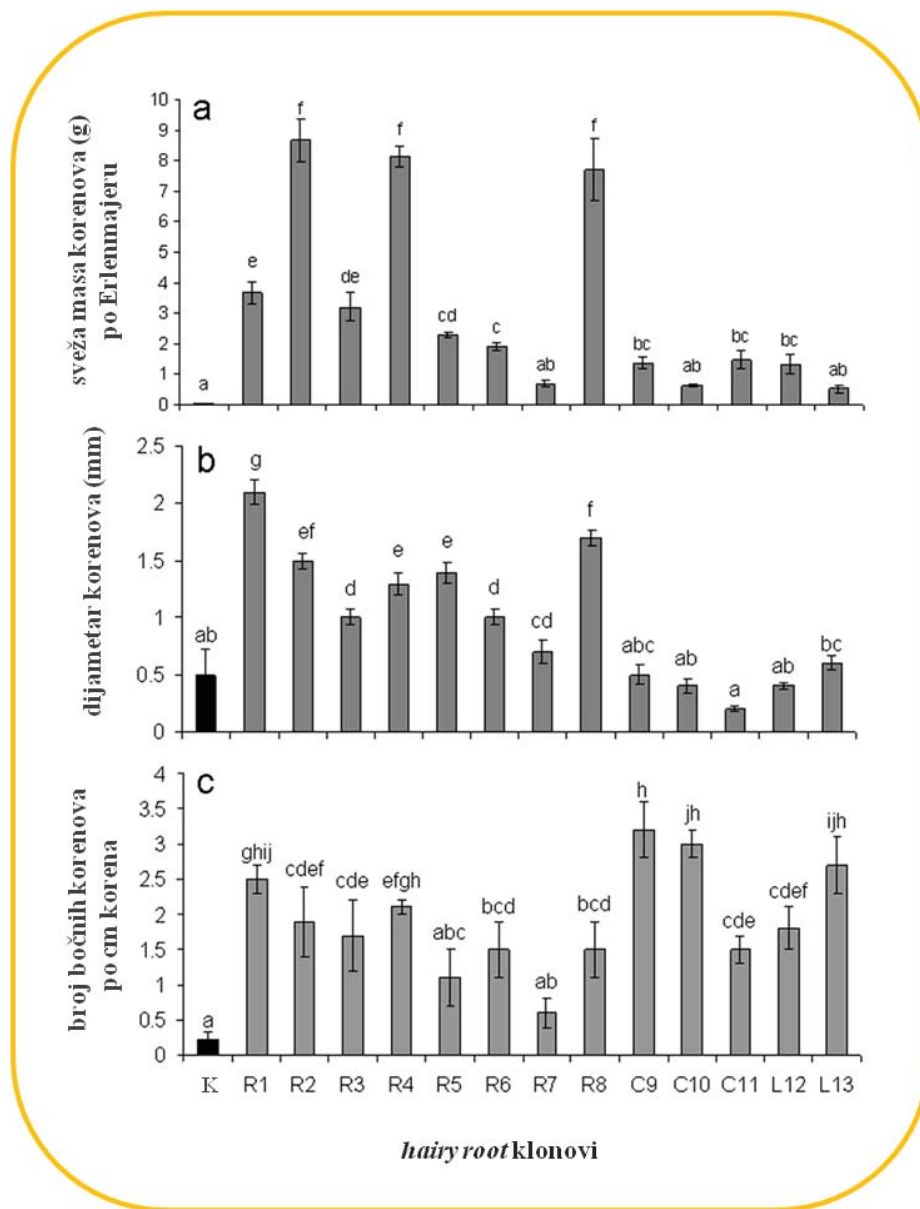
Povećanje biomase kontrolnih netransformisanih korenova gajenih na tečnom i čvrstom BM je bilo veoma malo u poređenju sa transformisanim korenovima za vreme istog perioda gajenja u kulturi (Slika 11a i Slika 12). Transformisani korenovi u tečnom BM su se umnožavali znatno brže nego oni koji su gajeni na čvrstom BM.

Uspostavljene kulture transformisanih korenova su se razlikovale fenotipski i po intenzitetu rasta (Slika 11 a – c, Slika 12, Tabela 15). Na osnovu ovih karakteristika transformisani korenovi klasifikovani su u 4 grupe: grupa 1– brzorastući, debeli (više od 1

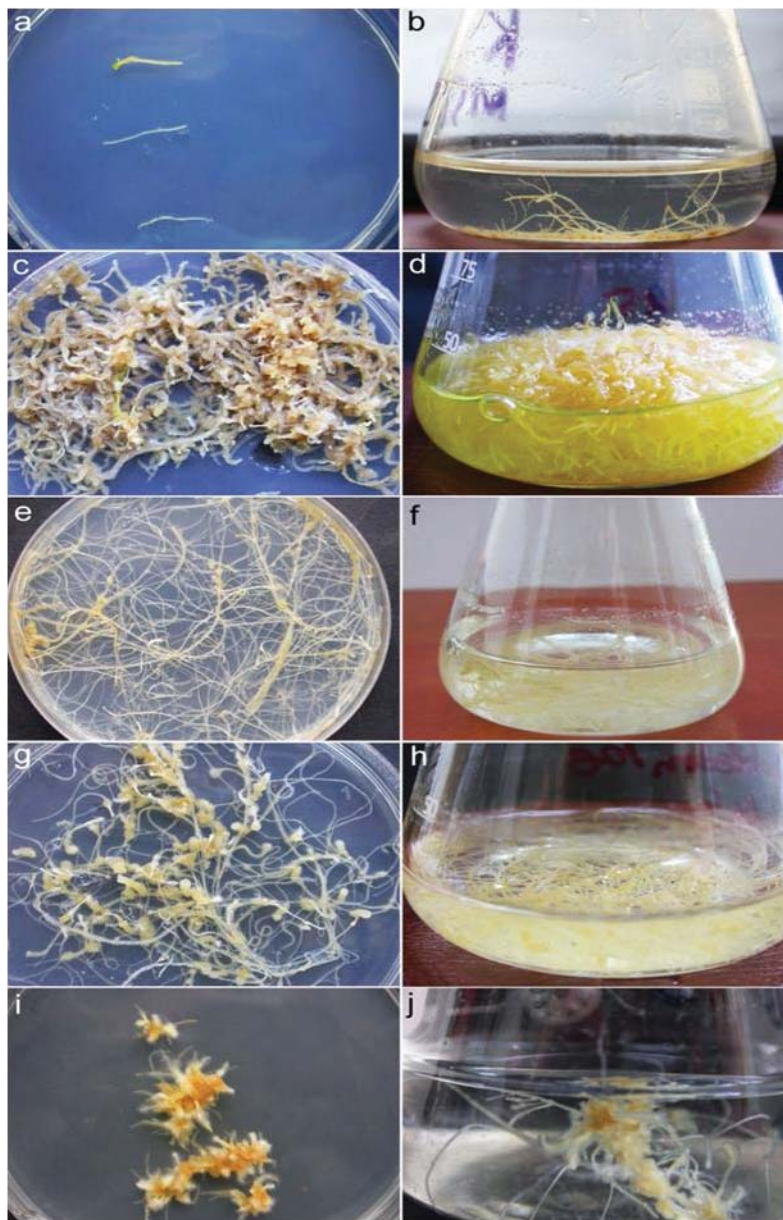
mm u prečniku) i čvrsti korenovi koji su lučili žute metabolite u tečni medijum (klonovi R1–R4 i R8; primer klon R2, Slika 12 c i d); grupa 2 – umerenorastući korenovi, tanki (1 mm i manje u prečniku) korenovi koji su bojili medijum u svetlo žutu boju (klonovi R6, C11 i L12; primer klon R6, Slika 12 e i f); grupa 3 – slaborastući, tanki (manje od 1 mm u prečniku) korenovi koji su malo kalusirali (C9, C10 i L13; primer klon C9, Slika 12 g i h) i grupa 4 – slaborastući, kalusirajući korenovi (R5 i R7; primer klon R7, Slika 12 i i j).

Na svim korenovima: kontrolnim netransformisanim (K) i različitim klonovima transformisanih (primer klonovi R1, R3, R5, C9 i C10), koji su bili gajeni u tečnim kulturama, uočavale su se korenske dlake (Slika 13). Na kontrolnim korenovima korenske dlake su bile veoma izdužene i krhke, dok su kod klona R3 one bile kratke (Slika 13). Dužina korenskih dlaka je obično bila veća na starijim delovima korenova.

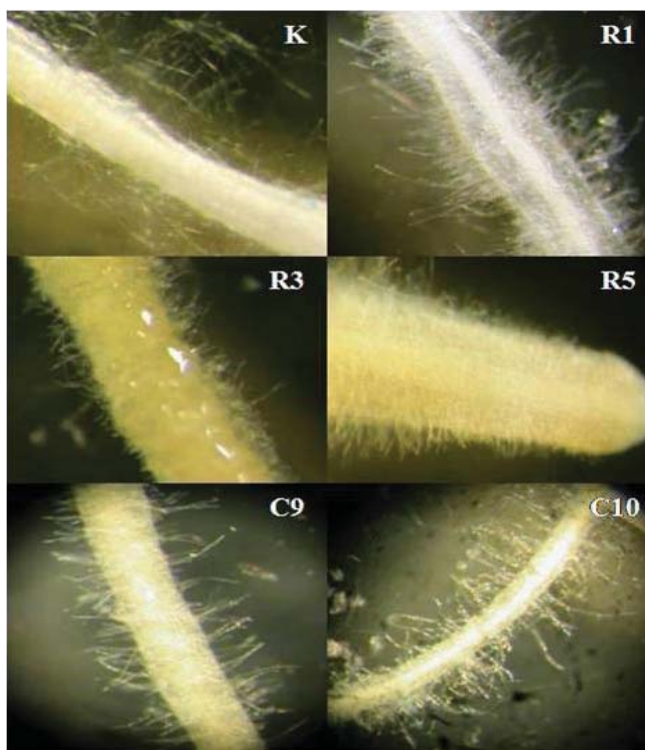
Prirast sveže mase transformisanih korenova je bio od 15,9 (klon L13) do 359,0 (klon R2) puta veći u poređenju sa netransformisanim kontrolnim korenovima (Slika 11 a). Klonovi poreklom od eksplantata korenova R2, R4 i R8 imali su veoma brz rast i održavaju visok kapacitet rasta u tečnoj kulturi već više od 2 godine. Klonovi dobijeni na eksplantatima kotiledona i listova sporije su rasli u odnosu na klonove poreklom sa eksplantata korenova (Slika 11 a). Dve grupe klonova su izdvojene na osnovu prečnika korenova (Slika 11 b). Svi klonovi koji su dobijeni na eksplantatima korenova, izuzev klona R7, su bili znatno deblji od onih dobijenih na eksplantatima kotiledona i listova, kod kojih je debljina bila slična debljini netransformisanih korenova. Skoro svi transformisani klonovi, za razliku od netransformisanih, formirali su bočne grane, i njihova gustina zavisila je od klona (Slika 11 c).



Slika 11. Karakterizacija rasta različitih klonova transformisanih korenova *C. murale* (R1–R8, C9–C11, L12–L13) u poređenju sa kontrolnim netransformisanim korenovima (K). Sveža masa (g) korenova po Erlenmajeru (a), dijametar korena (mm) (b), broj bočnih korenova (po cm korena) (c) posle 4 nedelje gajenja u tečnom BM na šejkeru. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SE iz tri ponavljanja. Vrednosti obeležene različitim slovima su statistički različite sa nivoom značajnosti $p \leq 0,05$ što je dobijeno primenom *Fisher's LSD* testa.



Slika 12. Morfologija i rast netransformisanih i odabranih klonova transformisanih korenova *C. murale* nakon 4 nedelje gajenja na čvrstom (a, c, e, g, i) i tečnom (b, d, f, h, j) BM. Kulture kontrolnih netransformisanih korenova (a, b). Brzorastući, masivni, debeli korenovi koji su ispuštali žute metabolite u tečni medijum (klon R2) (c, d). Umerenorastući, tanji korenovi koji su bojili medijum u svetložutu boju (klon R6) (e, f). Slaborastući, tanki korenovi koji su slabo kalusirali (klon C9) (g, h). Slaborastući korenovi koji su intenzivno kalusirali (klon R7) (i, j).



Slika 13. Korenske dlake na kontrolnom netransformisanom korenu (K) i različitim klonovima transformisanih korenova (R1, R3, R5, C9 i C10) gajenih 4 nedelje u tečnom BM.

4.1.4. Histocitološka karakterizacija transformisanih korenova *C. murale*

Netransformisani kontrolni korenovi *C. murale* i korenovi transformisani pomoću *A. rhizogenes* A4M70GUS (klonovi R1, R3, R5, C9 i C10), gajeni su u tečnom BM mesec dana nakon čega su histocitološki analizirani.

Netransformisani korenovi *C. murale* su imali tipičnu građu korenova viših biljaka. Jasno su se uočavala tri sloja: epidermis, kora i centralni cilindar (Slika 14). Na poprečnom preseku, u zoni deoba korena neposredno uz apikalni meristem, ćelije epidermisa (protoderma) su bile izdužene u radijalnom pravcu, gusto raspoređene, meristemske, sa gustom citoplazmom i krupnim jedrom. U citoplazmi ovih ćelija uočavale su se sitne

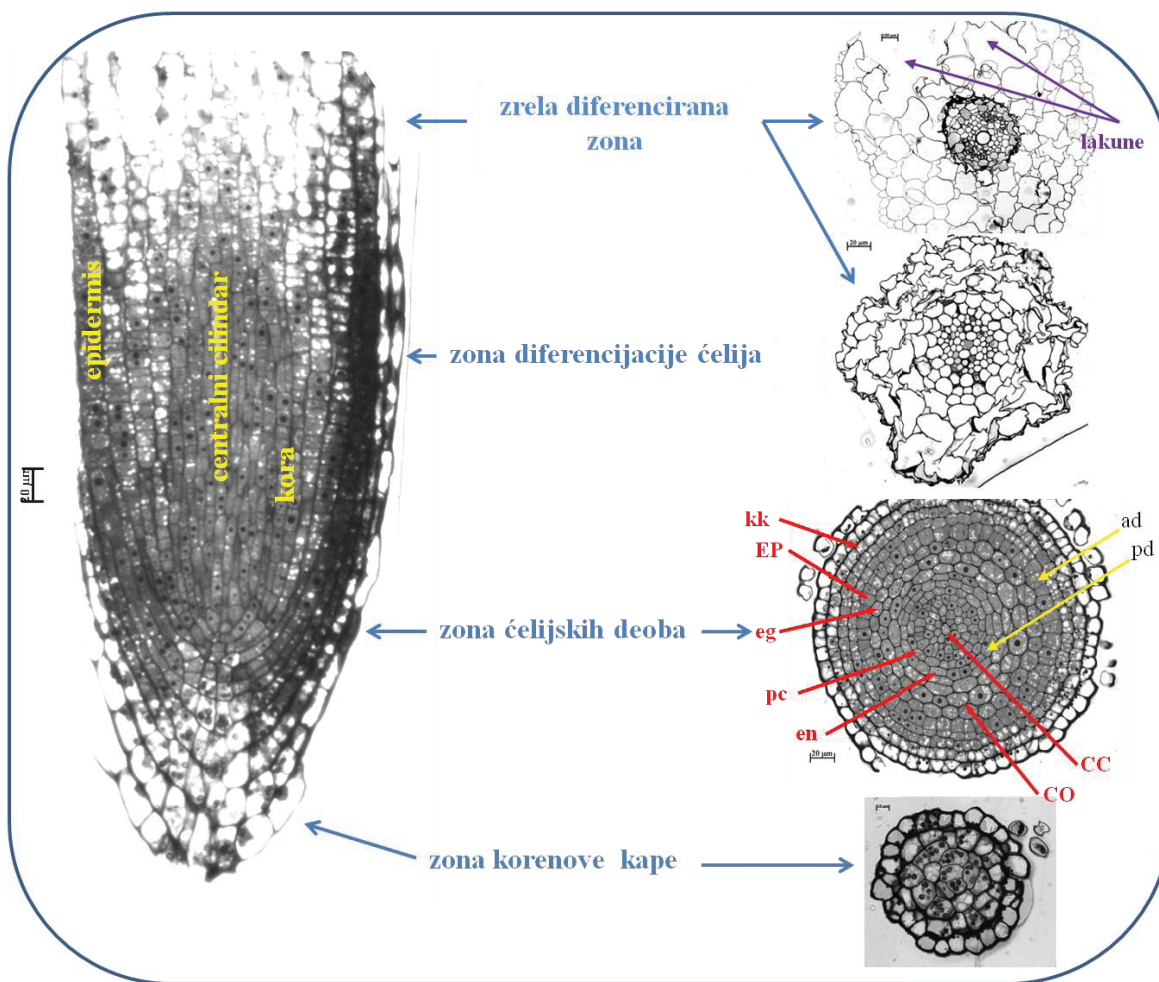
vakuole. Čelije kore (osnovnog meristema) su bile raspoređene u pravilnim koncentričnim krugovima, gusto zbijene, elipsoidnog oblika i izdužene u tangencijalnom pravcu. U zoni deoba korena neposredno uz apikalni meristem moguće je bilo razlikovati spoljašnu i unutrašnju koru. Čelije spoljašnje kore su bile krupnije, meristemske i u citoplazmi ovih ćelija zapažale su se sitne vakuole. Sazrevanje, odnosno vakuolizacija tkiva se odvijala od spoljašnjih ka unutrašnjim slojevima kore. Endodermis i pericikl su bili jasno diferencirani. Endodermis je bio građen od meristemskih ćelija izduženih u tangencijalnom pravcu. Periklinim deobama endodermisa formirali su se novi slojevi kore. Prvi sloj centralnog cilindra činio je pericikl koji je bio građen od sitnijih izodijametričnih ćelija. U okviru centralnog cilindra započinjala je diferencijacija ksilemskih i floemskih elementa (Slika 14).

U zreloj diferenciranoj zoni netransformisanih korenova *C. murale* ćelije epidermisa su uglavnom bile sitnije u odnosu na ćelije kore, okruglaste ili nepravilnog oblika. Koru su gradile parenhimske ćelije između kojih su bili intercelularni prostori nepravilnog oblika, različite veličine. Uočeni su i izrazito veliki intercelularni prostori – lakune (Slika 14).

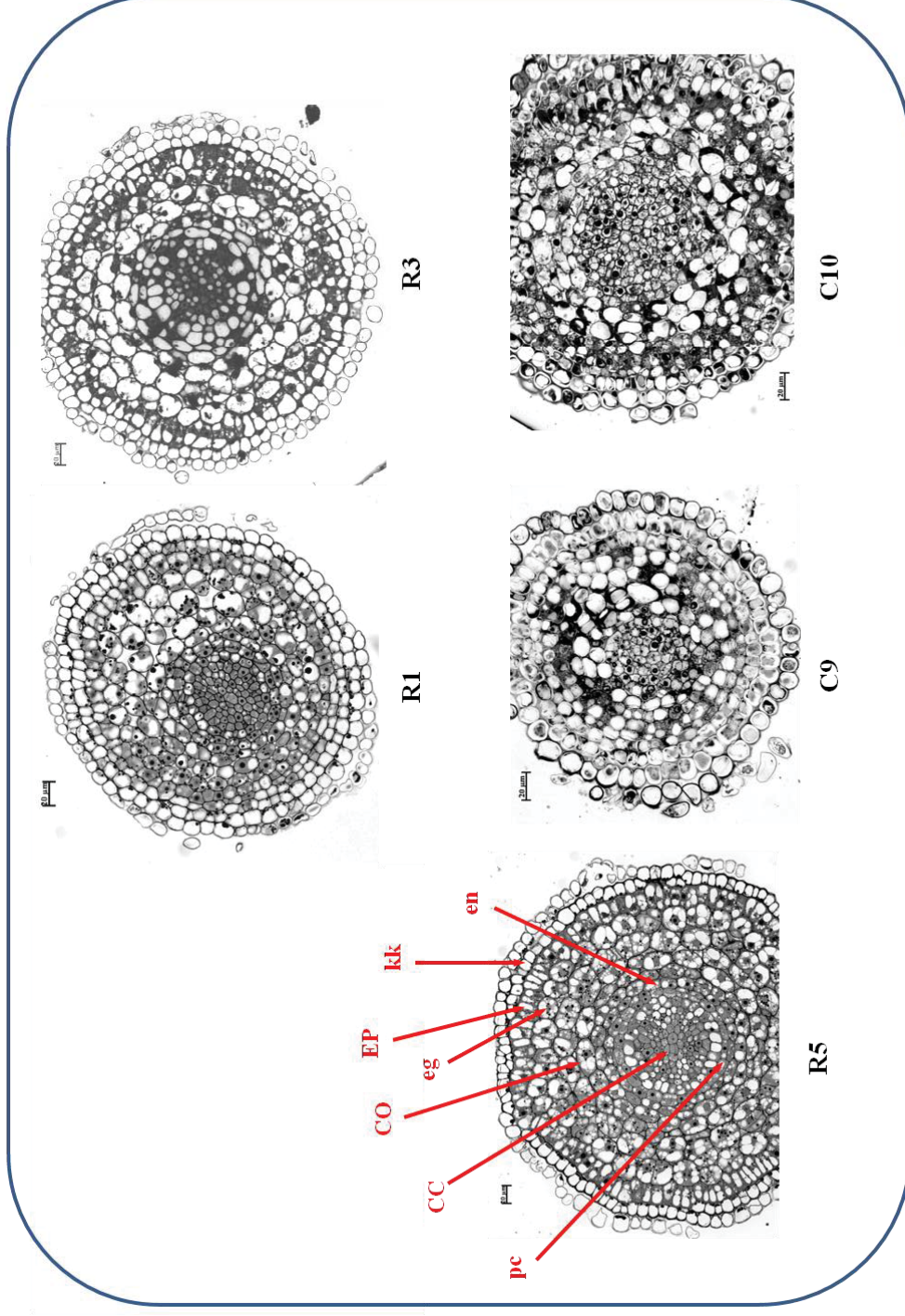
Histološka građa transformisanih korenova *C. murale* bila je slična građi netransformisanih korenova, tj. uočavala su se sva tri sloja: epidermis, kora i centralni cilindar, na poprečnim presecima u zoni deoba korena, neposredno uz apikalni meristem (Slika 15). Kod klonova R1, R3 i R5 i na citološkom nivou nisu bile uočene veće razlike u odnosu na kontrolni netransformisani koren, osim što su se u citoplazmi i vakuolama ovih ćelija zapažale brojne, tamne nakupine (Slika 17). Kod klonova C9 i C10, na citološkom nivou su bile uočene veće razlike u odnosu na kontrolni netransformisani koren: ćelije svih slojeva su bile plazmolizirane, sa izrazito tamnim sadržajem u vakuolama i citoplazmi (Slika 17).

U zreloj diferenciranoj zoni transformisanih korenova, kod svih ispitivanih klonova (R1, R3, R5, R9 i R10), epidermis je bio građen od sitnijih okruglastih ili četvorougao nih ćelija izduženih u radialnom ili tangencijalnom pravcu. Kora je bila građena od krupnih vakuoliziranih ćelija između kojih su se formirali intercelularni prostori nepravilnog oblika, različitih veličina i neravnomernog rasporeda (Slika 16). Kod klona R1 u citoplazmi i vakuolama ćelija kore uočene su sferične nakupine tamne boje (Slika 17). U regionima

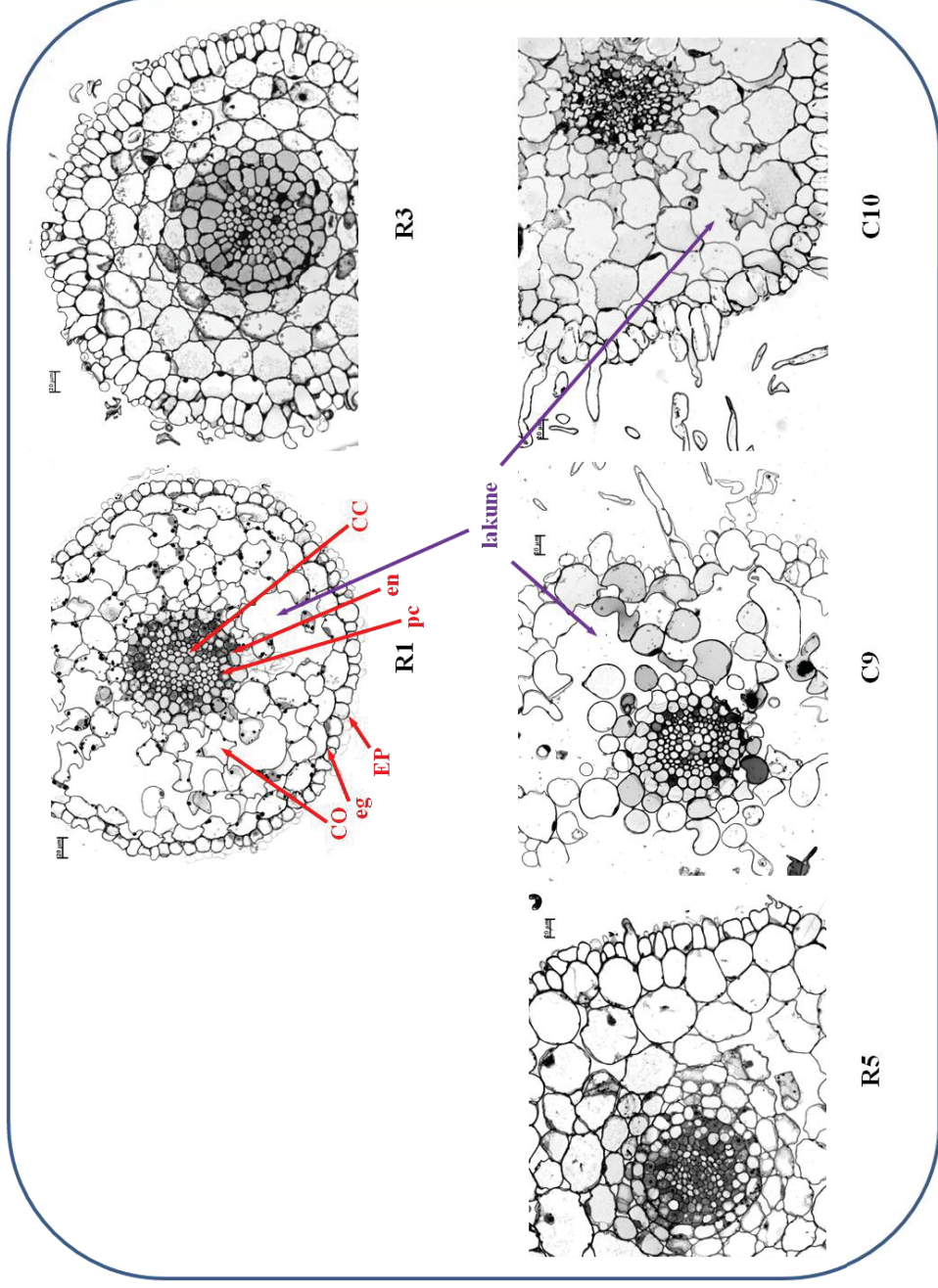
korena koji su bili dalje od apikalnog meristema intercelularni prostori su bili prošireni. Zbog uvećanja intercelularnih prostora dolazilo je do pucanja epidermisa.



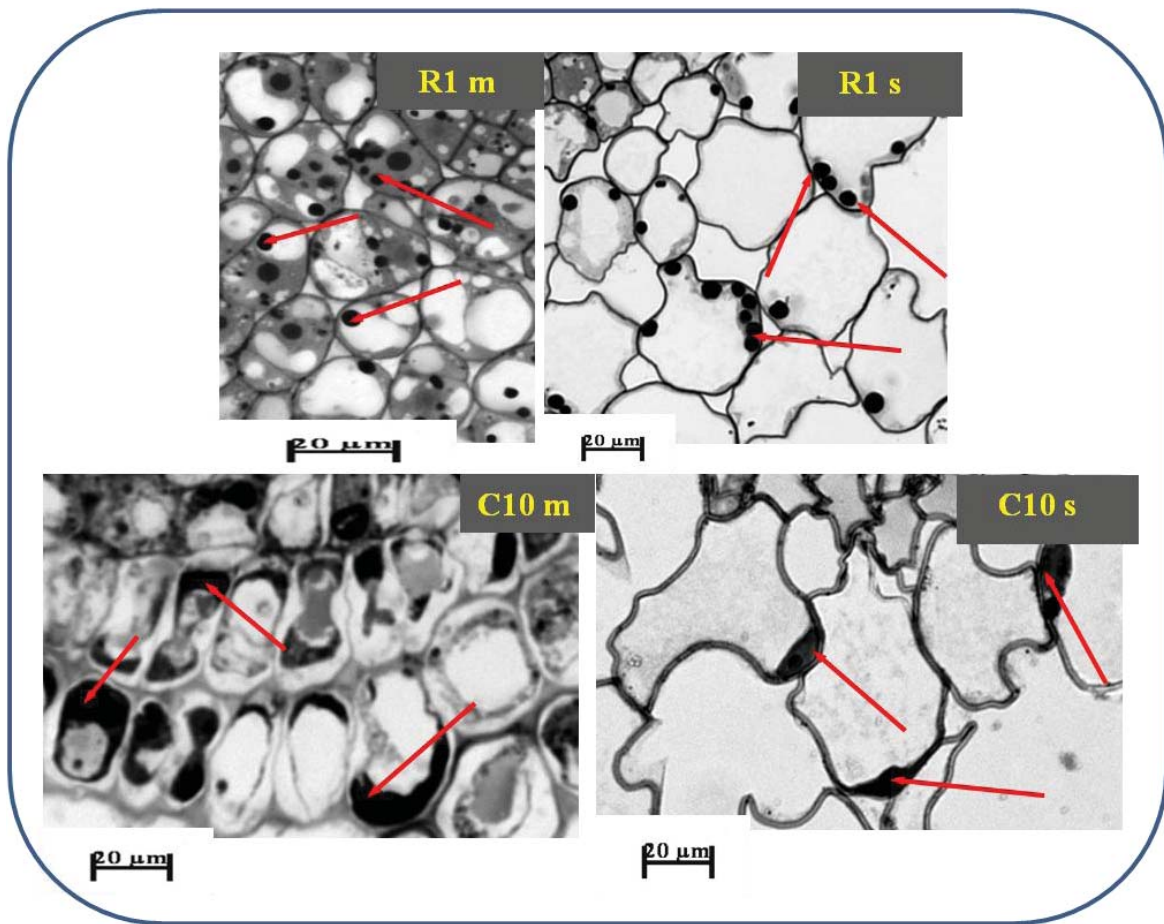
Slika 14. Histološka građa kontrolnih netransformisanih korenova *C. murale* uočena na uzdužnom i poprečnim presecima u nivou korenove kape, zone ćelijskih deoba, zone diferencijacije ćelija, kao i u zreloj diferenciranoj zoni korena; korenova kapa (kk), epidermis (EP), kora (CO) i centralni cilindar (CC), egzodermis (eg), endodermis (en) i perikl (pc). Uočavaju se perikline (pd) i antikline (ad) deobe u ćelijama epidermisa ili kore.



Slika 15. Poprečni presecci kroz transformisane korenove *C. murale* (različiti klonovi transformisanih korenova – R1, R3, R5, C9 i C10) u nivou zone ćelijskih deoba; korenova kapa (kk), epidermis (EP), kora (CO) i centralni cilindar (CC), egzodermis (eg), endodermis (en) i pericikl (pc).



Slika 16. Poprečni presecki kroz transformisane korenove *C. murale* (različiti klonovi transformisanih korenova – R1, R3, R5, C9 i C10) u nivou zone diferencijacije ćelija; korenova kapa (kk), epidermis (EP), kora (CO) i centralni cilindar (CC), egzodermis (eg), endodermis (en) i pericikl (pc).

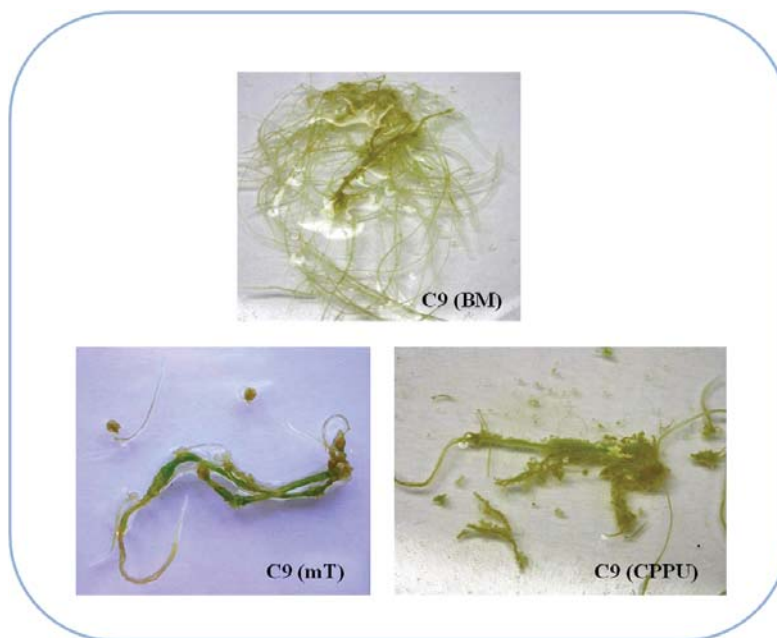


Slika 17. U mlađim delovima korenova, u ćelijama kore, uočavale su se crno obojene strukture (R1 m – u zoni apikalnog meristema) u većoj meri, u odnosu na starije delove korenova (R1 s – u zoni diferencijacije). U mlađim delovima korenova, u ćelijama kore, uočavao se tamni sadržaj u vakuolama i citoplazmi (C10 m – u zoni apikalnog meristema) i u manjoj meri u starijim delovima korenova (C10 s – u zoni diferencijacije).

4.1.5. Pokušaj regeneracije izdanaka na transformisanim korenovima

C. murale

U pokušaju dobijanja izdanaka transformisani korenovi su gajeni u tečnom BM koji je sadržao jedan od sledećih citokinina: meta-topolin (mT), N-(2-hloro-4-piridil)-N-fenilureu (4-CPPU) ili thidiazuron (TDZ), u koncentraciji 0,5; 1,0 ili 2,0 mg/l. Tretman citokinima dovodio je do sličnih promena kod transformisanih korenova, nezavisno od vrste citokinina koji je korišćen. U medijumu koji je sadržao citokinin, rast i bočno grananje transformisanih korenova su bili inhibirani (Slika 18). Korenovi su postajali deblji i zeleni. Male kalusne strukture su se uočavale na mestima gde bi trebalo da izbiju bočne grane. Do formiranja adventivnih izdanaka nije došlo ni posle 2 godine gajenja na BM sa ili bez citokinina.



Slika 18. Uticaj različitih citokinina na rast transformisanih korenova istog klona (C9). BM – bazalni medijum, mT – meta-topolin (2 mg/l), CPPU – N-(2-hloro-4-piridil)-N-fenilurea (2mg/l).

Prisustvo citokinina u medijumu dovodilo je do inhibicije daljeg rasta korenova i njihovog zadebljavanja, ali ne i do regeneracije.

4.2. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka

Fitotoksičnim medijumom (FM) je označen BM u kome su kontrolni netransformisani korenovi ili različiti klonovi transformisanih korenova *C. murale* gajeni 4 nedelje i koji sadrži produkte njihovog metabolizma. Efekti FM kontrolnih korenova (K) i transformisanih klonova R1, R2, R3, R5, R8, C9 i C10 na finalno klijanje i rast klijanaca ispitivani su kod 3 test biljke: arabidopsisa, pšenice i salate. BM je služio kao negativna kontrola.

4.2.1. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje semena i rast klijanaca arabidopsisa

Finalno klijanje semena arabidopsisa posle dvadeset jednog dana gajenja na BM iznosilo je 99% (Slika 19, Tabela 16). Gajenje semena na FM uslovalo je inhibiciju klijanja i razvoj klijanaca. Najveći inhibitorski efekat na finalno klijanje semena (100%) je pokazao FM u kome su rasli netransformisani korenovi (K), dok je primenom FM različitih klonova transformisanih korenova inhibicija varirala od 9% (R2) do 21% (R1).

Isključavanje semena arabidopsisa na FM uslovalo je i inhibiciju razvoja lista (Tabela 16). Dužina najdužeg lista kod klijanaca gajenih na kontrolnom BM je bila 10,2 mm. Maksimalna smanjenja dužine najdužeg lista su zabeležena na tretmanu sa FM klonova R1 i R8 (72%, odnosno 70%). Klonovi R5, R2 i R3 su pokazali srednje inhibitorski efekat: 49%, 50% i 65% redom, dok su najmanji inhibitorski efekat na razvoj listova imali FM u kojima su rasli transformisani korenovi klonova C10 i C9 (inhibicija 29%, odnosno 34%), što se vidi u Tabeli 16.

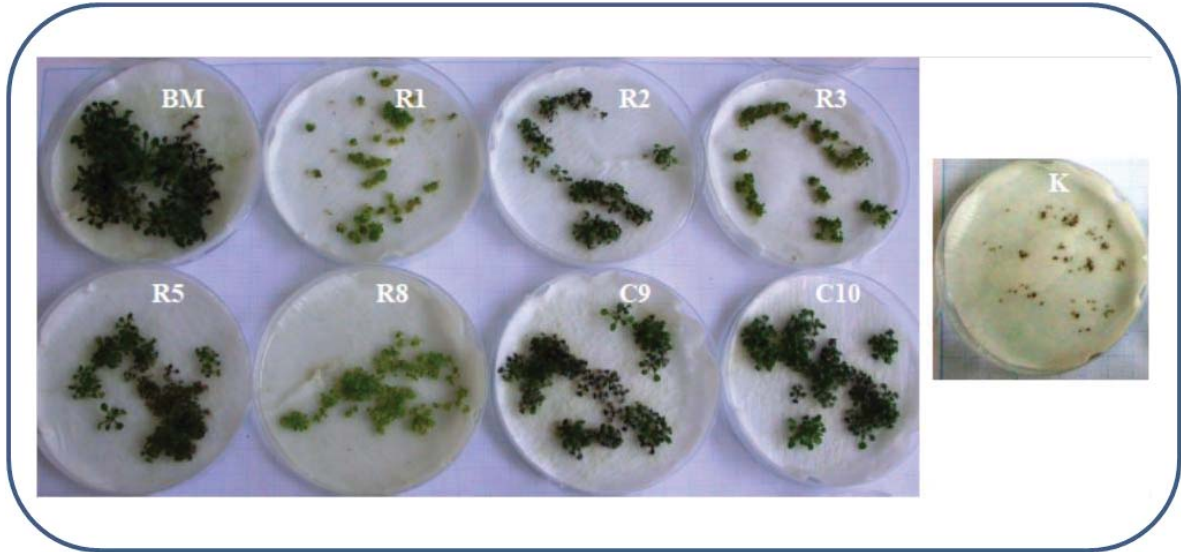
Broj listova u rozeti je takođe bio maksimalno smanjen tretmanom FM klonova R1 i R8 (Tabela 16). Od svih praćenih parametara razvoja klijanaca arabidopsisa može se zapaziti da je najveći inhibitorski efekat FM ispoljio na dužinu korenova. Maksimalno smanjenje dužine korenova (87%) prouzrokovao je FM klona R1, srednje inhibitorski

dejstvo su imali FM klonova R8 (73%), R5 (70%) i R2 i R3 (67% oba), dok su najmanje inhibitorne efekte imali FM poreklom od klonova C9 (59%) i C10 (47%).

U skladu sa negativnim efektima koje su FM imali na razvoj pojedinih organa, nakon gajenja klijanaca arabidopsisa na FM, došlo je do umanjenja i njihove sveže mase. Najmanju masu su imali klijaneci gajeni na FM R1 i R8 (77%, odnosno 70% manju u odnosu na masu kontrolnih klijanaca), dok je najmanji pad sveže mase zabeležen kod klijanaca gajenih na FM klona C10 (34% manje u odnosu na kontrolu), što je prikazano u Tabeli 16.

Na osnovu analize klijanja i parametara razvoja klijanaca arabidopsisa može se reći da su od svih ispitivanih FM najinhibitorniji bili oni poreklom od klonova R1 i R8, koji su osim znatne inhibicije rasta, uslovili i promenu boje klijanaca iz tamno zelene u svetlo zelenu (Slika 19).

Interesantno je da su FM u kojima su gajeni transformisani korenovi indukovani na kotiledonima (C9 i C10) imali znatno slabiji inhibitorni efekat za sve praćene parametre u odnosu na FM u kojima su gajeni transformisani korenovi indukovani na korenovima (Tabela 16). Šta više, inhibicija klijanja je u potpunosti izostala kod C9 i C10 klonova, slično kao kod kontrolnog BM medijuma. To ukazuje da i poreklo transformisanih korenova možda može uticati na njihovu metaboličku aktivnost, a samim tim i na produkciju alelopatskih supstanci.



Slika 19. Efekat FM u kome su netransformisani (K) ili različiti klonovi transformisanih korenova (R1, R2, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale* gajeni 4 nedelje, na klijanje semena i rast klijanaca arabidopsisa. BM je korišćen kao kontrola.

Tabela 16. Efekat FM u kome su kontrolni (K) ili različiti klonovi transformisanih korenova (R1, R2, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale* gajeni 4 nedelje, na dužinu korenova (cm), dužinu najdužeg lista (mm), broj listova u rozeti, svežu masu klijanaca (mg) i finalno klijanje (%) semena arabidopsisa. BM je korišćen kao kontrola. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovom ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

Klonovi	Finalna klijavost (%)	Inhibicija (%)	Dužina najdužeg lista (mm)	Inhibicija (%)	Broj listova u rozeti	Inhibicija (%)	Dužina korena (cm)	Inhibicija (%)	Sveža masa klijanaca (mg)	Inhibicija (%)
BM	99 \pm 0,0d	–	10,2 \pm 0,1g	–	10,2 \pm 0,1f	–	7,9 \pm 0,1f	–	23,7 \pm 0,1h	–
K	0 \pm 0,0a	100	–	–	–	–	–	–	–	–
R1	78 \pm 0,3b	21	2,9 \pm 0,1a	72	5,4 \pm 0,1a	47	1,0 \pm 0,0a	87	5,4 \pm 0,1a	77
R2	90 \pm 0,2c	9	5,1 \pm 0,1d	50	7,3 \pm 0,1de	28	2,6 \pm 0,1c	67	10,8 \pm 0,2d	54
R3	88 \pm 0,1c	11	3,6 \pm 0,1c	65	6,4 \pm 0,1b	37	2,6 \pm 0,0c	67	8,1 \pm 0,1c	66
R5	100 \pm 0,0d	–	5,2 \pm 0,0d	49	7,2 \pm 0,1cd	29	2,4 \pm 0,0c	70	11,7 \pm 0,2e	51
R8	81 \pm 0,3b	18	3,1 \pm 0,1b	70	5,4 \pm 0,1a	47	2,1 \pm 0,0b	73	7,0 \pm 0,1b	70
C9	100 \pm 0,0d	–	6,7 \pm 0,1e	34	7,1 \pm 0,1c	30	3,2 \pm 0,1d	59	13,1 \pm 0,1f	45
C10	100 \pm 0,0d	–	7,2 \pm 0,1f	29	7,4 \pm 0,0e	27	4,2 \pm 0,1e	47	15,6 \pm 0,2d	34

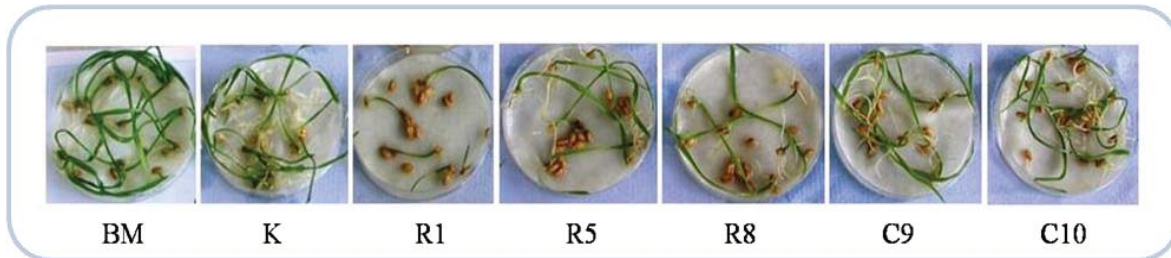
4.2.2. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje semena i rast klijanaca pšenice

Procenat iskljajalih semena pšenice, gajenih na BM, iznosio je 85% (Tabela 17, Slika 20). Iskljajavanje semena na FM dovelo je do inhibicije klijanja. Iskljajavanje na FM K uslovalo je inhibiciju finalnog klijanja od 24%, a iskljajavanje na FM različitih klonova transformisanih korenova je inhibiralo klijavost od 8% (R5 i C9) do 53% (R8).

Osim na sam proces klijanja, FM su imali negativan efekat i na razvoj klijanaca pšenice. Maksimalno smanjenje dužine izdanka (67%) je izazvano gajenjem na FM klona R1 (Tabela 17). Srednje inhibitorni efekat imali su FM klonova C9 i R5, kada je dužina izdanka bila smanjena za 50% odnosno 39%, dok su najmanji fitotoksični efekat imali FM klonova R8 i C10 (26%, odnosno 17%).

Prilikom iskljajavanja semena na FM u kome su gajeni netransformisani korenovi (K) dužina korenova je bila smanjena samo 14% u odnosu na dužinu kontrolnih korenova klijanaca iskljajvanih na BM. Najveća inhibicija rasta korenova (89% i 77%) izazvana je iskljajavanjem semena pšenice na FM u kome su gajeni klonovi R1 i C9. Od transformisanih klonova najmanji inhibitorni efekat pokazao je, takođe, FM klona C10 (14%). Ovaj klon je imao najmanji efekat i kod inhibicije prirasta sveže mase klijanaca, dok su najjače inhibitorno dejstvo imali klonovi R1 i C9 (78% i 67%).

Na osnovu svih analiziranih parametara možemo zaključiti da je najveći fitotoksičan efekat na razvoj klijanaca pšenice imao FM klona R1, dok je na samu klijavost najveći fitotoksičan efekat imao FM klona R8. Kao i kod arabidopsisa, od svih praćenih parametara razvoja klijanaca pšenice iskljajvanih na FM, najveći inhibitorni efekat je ispoljen na nivou dužine korenova.



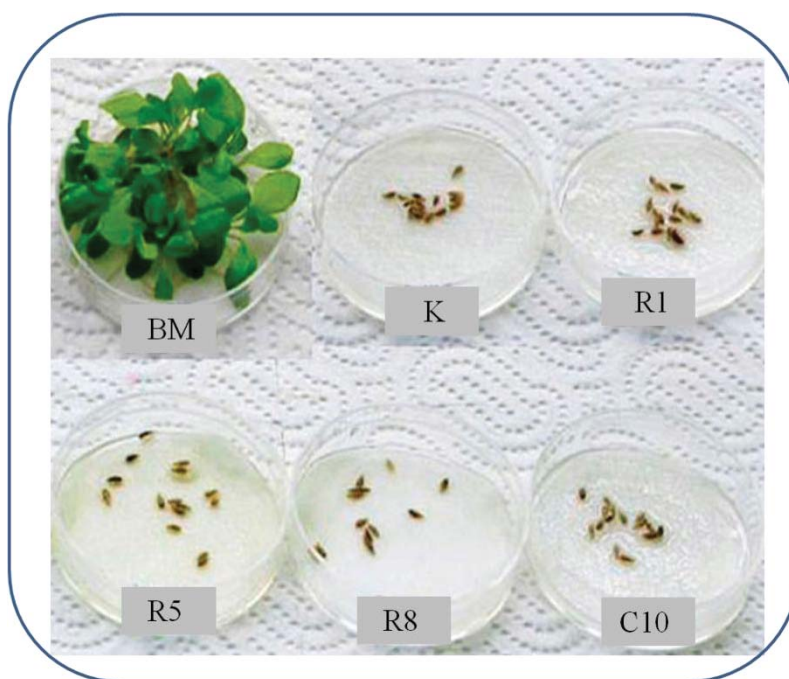
Slika 20. Efekat FM u kome su netransformisani korenovi (K) ili različiti klonovi transformisanih korenova (R1, R2, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale* gajeni 4 nedelje, na klijanje semena i rast klijanaca pšenice. BM je korišćen kao kontrola.

Tabela 17. Efekat FM poreklom od kontrolnih (K) ili transformisanih (R1, R5, R8, C9 i C10) korenova *C. murale*, gajenih 4 nedelje, na dužinu najdužeg korena (cm), dužinu izdanka (cm), svežu masu kljanaca (mg) i krajnju kljajavost semena (%) pšenice. BM je korišćen kao kontrola. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

Klonovi	Finalna kljajavost (%)	Inhibicija (%)	Dužina izdanka (cm)	Inhibicija (%)	Dužina korena (cm)	Inhibicija (%)	Sveža masa kljanaca (mg)	Inhibicija (%)
BM	85,0 \pm 1,4c		5,4 \pm 0,3e		3,5 \pm 0,2d		88,4 \pm 3,9e	
K	64,3 \pm 0,7b	24	4,5 \pm 0,2d	17	3,0 \pm 0,2c	14	65,5 \pm 2,6d	26
R1	68,3 \pm 2,2b	20	1,8 \pm 0,2a	67	0,4 \pm 0,0a	89	18,8 \pm 1,9a	78
R5	78,3 \pm 0,8c	8	3,3 \pm 0,3bc	39	1,9 \pm 0,2b	46	40,9 \pm 4,2c	53
R8	40,0 \pm 4,3a	53	4,0 \pm 0,4cd	26	1,4 \pm 0,2b	60	43,6 \pm 4,4c	50
C9	78,3 \pm 2,2c	8	2,7 \pm 0,3b	50	0,8 \pm 0,1a	77	29,3 \pm 3,3b	67
C10	70,6 \pm 3,27b	17	4,5 \pm 0,4d	17	3,0 \pm 0,3c	14	60,0 \pm 5,2d	32

4.2.3. Ispitivanje alelopatskog efekta fitotoksičnih medijuma na klijanje semena i rast klijanaca salate

Svi FM, kako oni u kome su gajeni netransformisani korenovi (K), tako i oni u kojima su gajeni različiti klonovi transformisanih korenova (R1, R5, R8 i C10) su pokazali totalni inhibitorni efekat (100%) na klijanje semena salate. Klijanaci salate, koji su isključivani na kontrolnom BM bez eksudata korenova, normalno su rasli (Slika 21).



Slika 21. Efekat FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8 i C10) *C. murale* na klijanje semena i rast klijanaca salate. Korenove su gajeni u FM 4 nedelje. BM je korišćen kao kontrola.

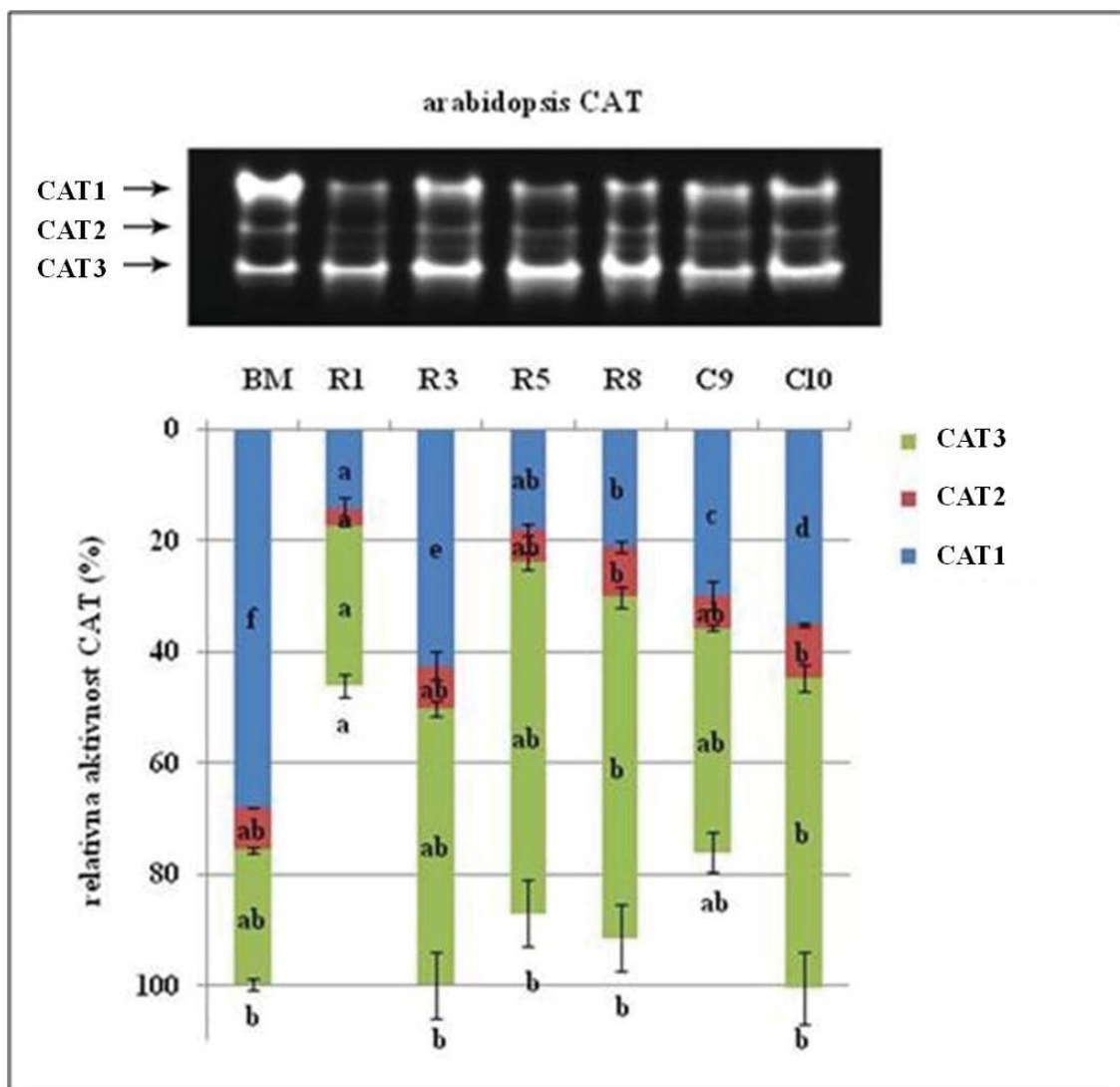
4.3. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima kod test biljaka tretiranih fitotoksičnim medijumima

Aktivnost antioksidativnih enzima je analizirana kod kontrolnih klijanaca arabidopsisa i pšenice koji su isključivani na BM, kao i kod klijanaca koji su isključivani na FM kontrolnih netransformisanih korenova (K) i na FM u kojima su rasli različiti klonovi transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Klijanci arabidopsisa su gajeni 3 nedelje, a klijanci pšenice 1 nedelju, jer se posle tog perioda moglo uočiti inhibitorno dejstvo, a istovremeno se moglo i sakupiti dovoljno materijala za analizu aktivnosti antioksidativnih enzima. Pošto su klijanci arabidopsisa veoma slabo rasli na FM, a korenovi bili izuzetno tanki i laki, kod njih su analizirani antioksidativni enzimi u celim klijancima, dok je kod klijanaca pšenice, koji su bili mnogo krupniji, bilo moguće odvojeno i u korenovima i u izdancima analizirati aktivnost antioksidativnih enzima. Kod klijanaca pšenice inhibicija korenova na FM klona R1 je bila izuzetno velika, njihova prosečna dužina je bila 0,4 mm, tako da je za analizu bilo moguće sakupiti samo izdanke. Rađeno je elektroforetsko razdvajanje izoenzima katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza u poliakrilamidnom gelu, kao i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza.

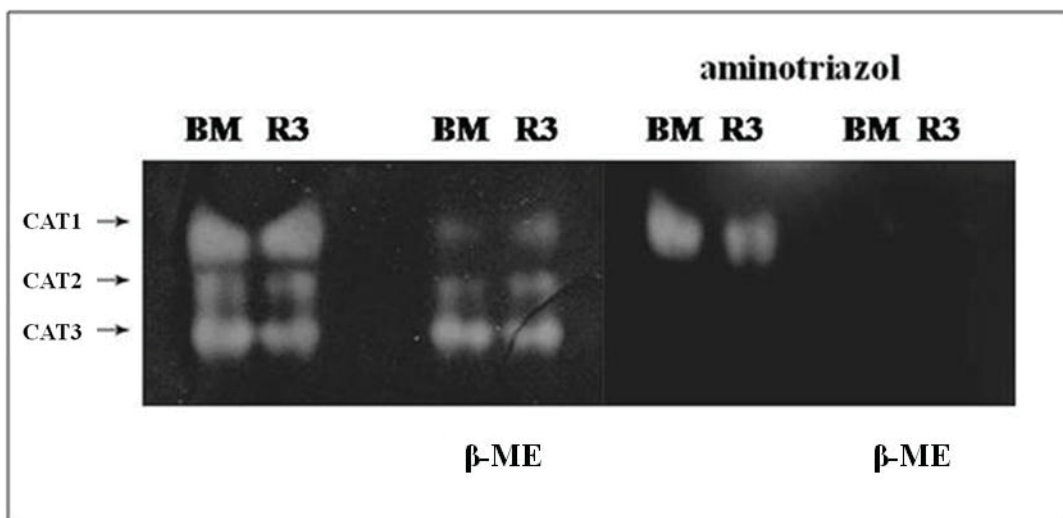
4.3.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod kljanaca arabidopsisa

4.3.1.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza

Kod svih ispitivanih uzoraka kljanaca arabidopsisa na gelu su se uočavale 3 jasno odvojene izoforme katalaza, kao i jedna bleđa traka (ispod CAT2) kod uzoraka kljanaca tretiranih FM (R1, R3, R5, R8, C9 i C10), ali se ona nije kvantifikovala (Slika 22). Ukupna aktivnost katalaza kod kontrolnih kljanaca arabidopsisa je normalizovana na 100%. Kod kljanaca tretiranih FM (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) je ukupna aktivnost bila ista (100%) kod klonova R3 i C10 ili manja (kod svih ostalih klonova), s tim što je samo kod klona R1 ona bila statistički značajno smanjena i iznosila je 46% u odnosu na relativnu ukupnu aktivnost kontrole (Slika 22). Aktivnost CAT1 kod kljanaca arabidopsisa gajenih na svim ispitivanim FM (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) je bila statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolu (Slika 22). CAT2 i CAT3 kod kljanaca arabidopsisa gajenih na svim ispitivanim fitotoksičnim medijumima (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) nisu imale statistički značajno različitu aktivnost u odnosu na odgovarajuće izoforme kod kontrolnih kljanaca. Pokazano je da je CAT1 osetljiva na β -merkaptetanol, dok su CAT2 i CAT3 osetljive na inhibiciju aminotriazolom (Slika 23).



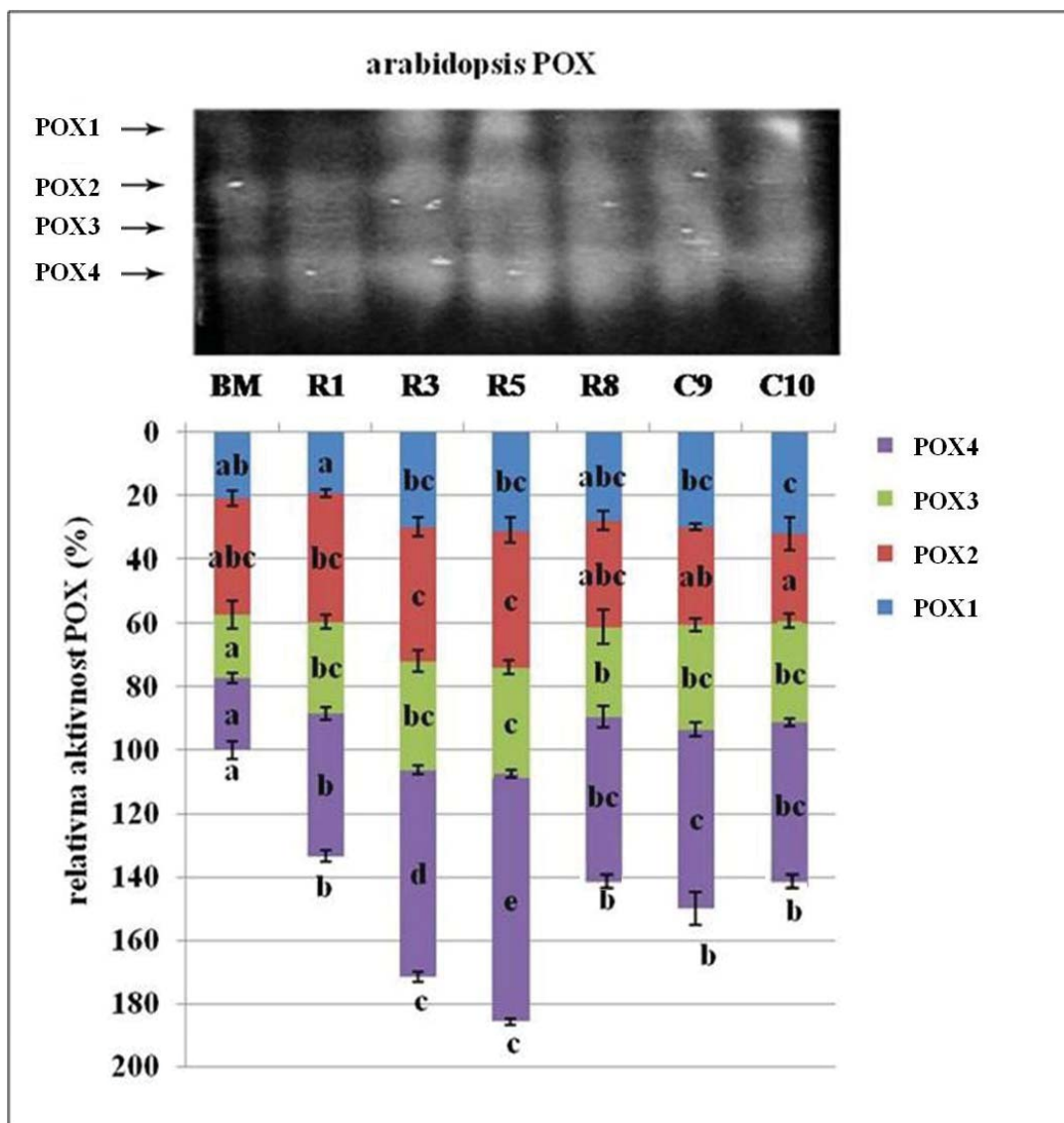
Slika 22. Analiza aktivnosti CAT kod klijanaca arabidopsisa gajenih 3 nedelje na kontrolnom BM i FM različitih klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost različitih izoformi određivana je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na 1,5% akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje $K_3Fe(CN)_6$ i $FeCl_3$ kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.



Slika 23. Ispitivanje osetljivosti CAT izoformi klijanaca arabidopsisa iskljivanih na kontrolnom BM i FM klona R3 *C. murale*, na inhibitore. Pokazano je da β -merkaptoetanol (β -ME) inhibira CAT1, a aminotriazol (AT) inhibira CAT2 i CAT3.

4.3.1.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza

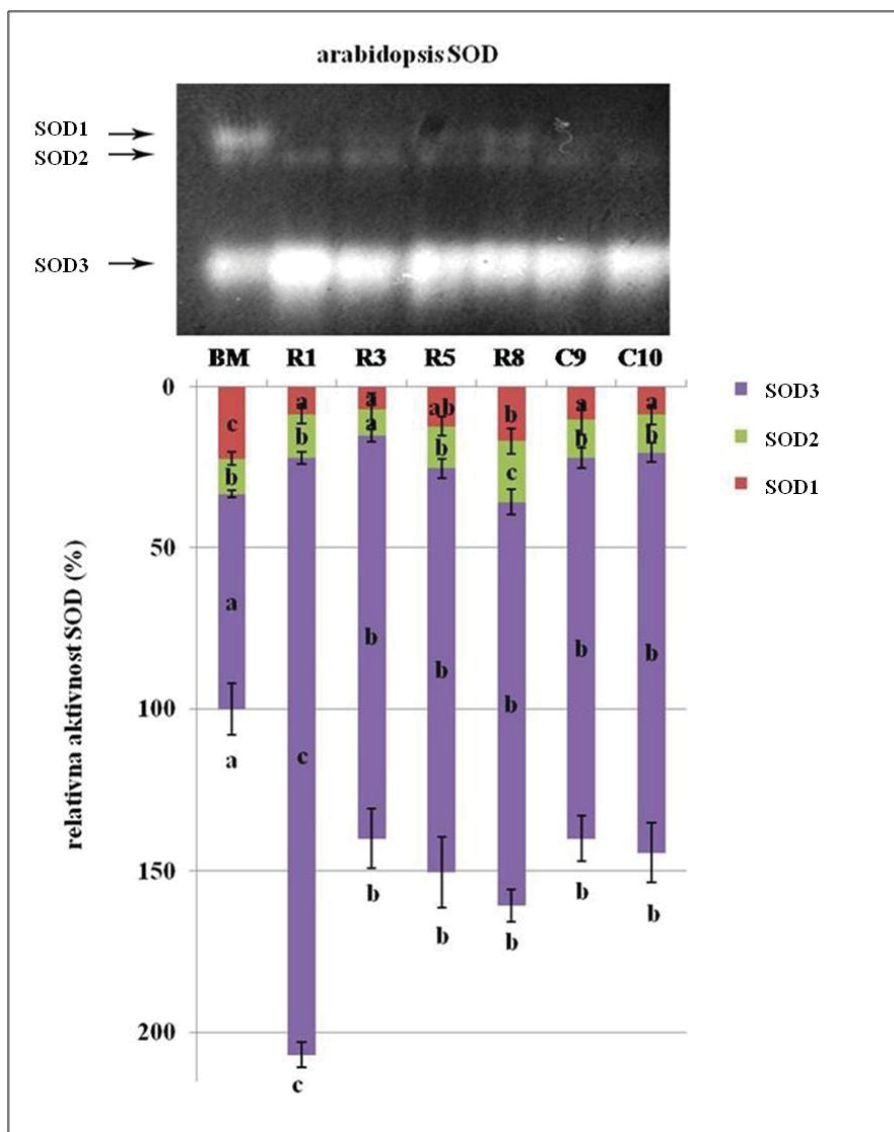
Relativna ukupna aktivnost peroksidaza u kontrolnim klijanacima, gajenim na BM, je normalizovana na 100%. Kod klijanaca tretiranih FM (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) aktivnost peroksidaza je bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolu i kretala se od 133% kod klona R1 do 186% kod klona R5 (Slika 24). Klonovi R3 i R5 su uslovili najveće povećanje aktivnosti peroksidaza u tretiranim klijancima, 172% odnosno 186%. Kod svih ispitivanih uzoraka klijanaca arabidopsisa na gelu su se uočavale četiri izoforme peroksidaza (Slika 24). Relativna aktivnost POX1 kod tretiranih klijanaca arabidopsisa se nije statistički značajno razlikovala od kontrole, sem kod klona C10, gde je ona bila statistički značajno povećana (Slika 24). Što se tiče relativne aktivnosti POX2 nije bilo statistički značajne razlike između kontrole (BM) i tretiranih klijanaca. Aktivnosti POX3 i POX4 su bile statistički značajno veće kod svih tretiranih klijanaca arabidopsisa FM (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) u odnosu na odgovarajuće kontrole (Slika 24).



Slika 24. Analiza aktivnosti POX kod klijanaca arabidopsisa gajenih 3 nedelje na kontrolnom BM i FM različitih klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost različitih izoformi određivana je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na 1,5% akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.3.1.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza

Relativne ukupne aktivnosti SOD u klijancima iskljavanim na svim FM su statistički značajno bile veće u odnosu na relativnu ukupnu aktivnost SOD kod kontrolnih klijanaca koji su iskljavani na BM (Slika 25). Njihove vrednosti su se kretale od 140% kod klijanaca tretiranih FM klonova R3 i C9 do 207% kod onih tretiranih FM klona R1. Na gelu su se eksprimirale tri izoforme SOD kod svih analiziranih uzoraka, s tim što je značajno veću aktivnost imala SOD3 izoforma u odnosu na druge dve (SOD1 i SOD2). SOD3 je kod svih tretiranih klijanaca arabidopsisa FM (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) imala statistički značajno veću aktivnost, a SOD1 statistički značajno manju aktivnost u odnosu na odgovarajuće kontrole (Slika 25). Aktivnost SOD2 kod klijanaca tretiranih FM klona R3 je bila statistički značajno manja, dok je na FM R8 ona bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolu i ostale ispitivane uzorke. Iskljavanje i rast klijanaca na FM klona R1 dovelo je do povećanja relativne ukupne aktivnosti SOD (čak 2 puta više nego kod kontrolnih klijanaca), pri čemu je SOD3 najviše bila aktivna (Slika 25).



Slika 25. Analiza aktivnosti SOD kod klijanaca arabidopsisa gajenih na kontrolnom BM i FM različitih klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost različitih izoformi određivana je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na 1,5% akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje NBT kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.3.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca pšenice

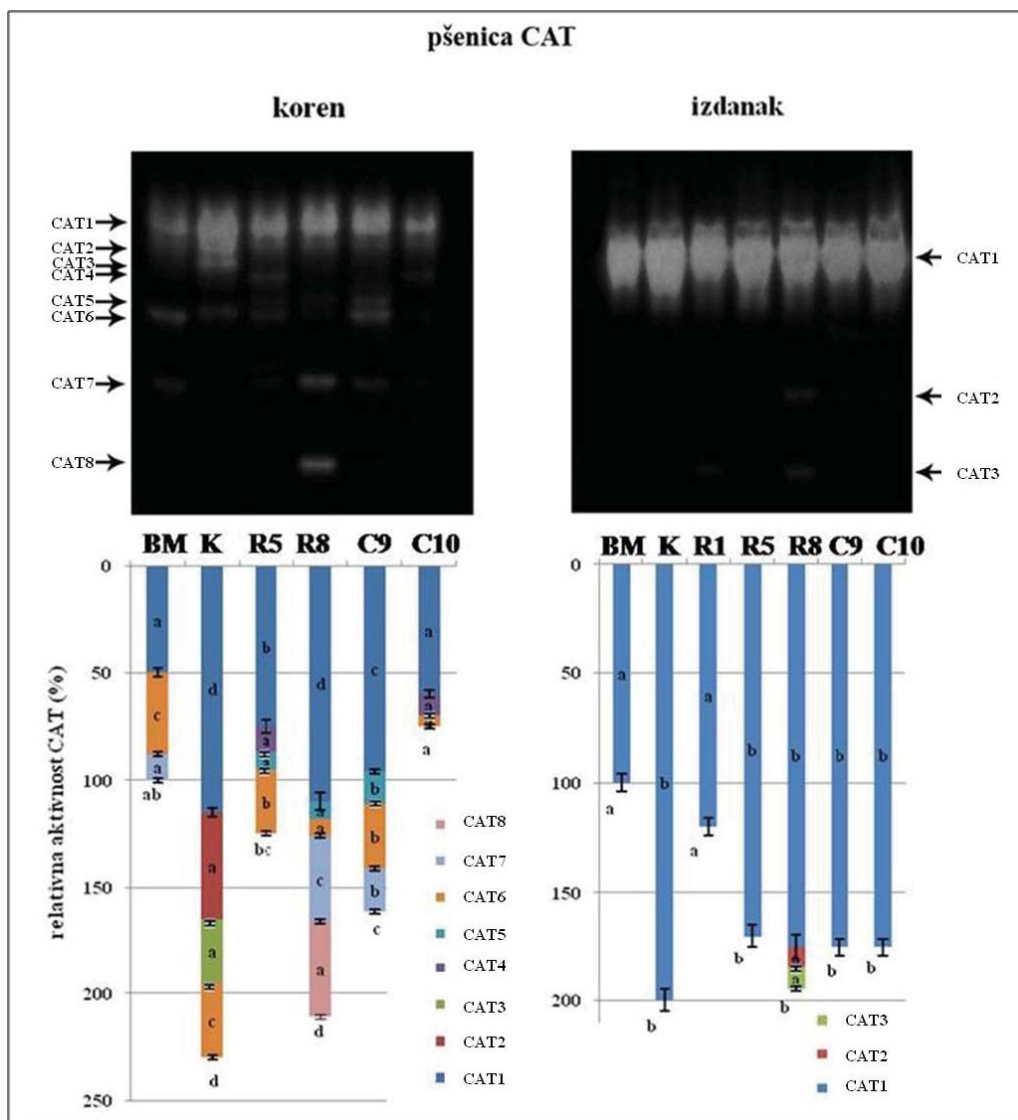
4.3.2.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza

Na gelu su odvojeno analizirane aktivnosti CAT korenova i izdanaka klijanaca pšenice, koji su isključivani na kontrolnom BM, kao i na FM netransformisanih korenova (K) i transformisanih klonova R1, R5, R8, C9 i C10 (Slika 26). Kod korenova je uočeno 8 izoformi, dok su kod izdanaka uočene 3 izoforme CAT. Ukupna relativna aktivnost CAT u izdancima značajno je bila veća u odnosu na ukupnu relativnu aktivnost u korenovima (Slika 26).

Ukupna aktivnost CAT u korenovima i izdancima klijanaca gajenih na BM je označena sa 100%. Suprotno klijancima arabidopsisa, kod tretiranih klijanaca pšenice je zabeleženo povećanje aktivnosti katalaza u odnosu na kontrolu. Statistički značajno povećanje aktivnosti CAT je zabeleženo u korenovima klijanaca gajenih na FM K, R8 i C9, kao i u izdancima klijanaca gajenim na svim FM, sem onog u kome je gajen klon R1.

U uzorcima korenova najveća ukupna relativna aktivnost CAT je zabeležena kada su klijanci gajeni na FM K (230%) i R8 (211%). Na FM R8 se eksprimiralo najviše izoformi – pet. Izoforme CAT1 su, u odnosu na sve ostale, imale najveću aktivnost, od 50% od ukupne relativne aktivnosti kod BM do 115% kod K (Slika 26).

Što se tiče aktivnosti CAT u izdancima klijanaca, dominantna je bila CAT1, čija je aktivnost bila najveća kod klijanaca gajenih na FM kontrolnih korenova (200% od ukupne aktivnosti kontrole BM, Slika 26). Pretpostavljamo da se CAT1 sastojala od više izoformi kod kojih je aktivnost bila velika. CAT2 i CAT3 su se eksprimirale samo u uzorcima izdanaka klijanaca gajenih na FM klona R8 (Slika 26).



Slika 26. Analiza aktivnosti CAT kod klijanaca pšenice gajenih na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost različitih izoformi određivana je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na 1,5% akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje $K_3Fe(CN)_6$ i $FeCl_3$ kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$) prema *Fisher's LSD* testu.

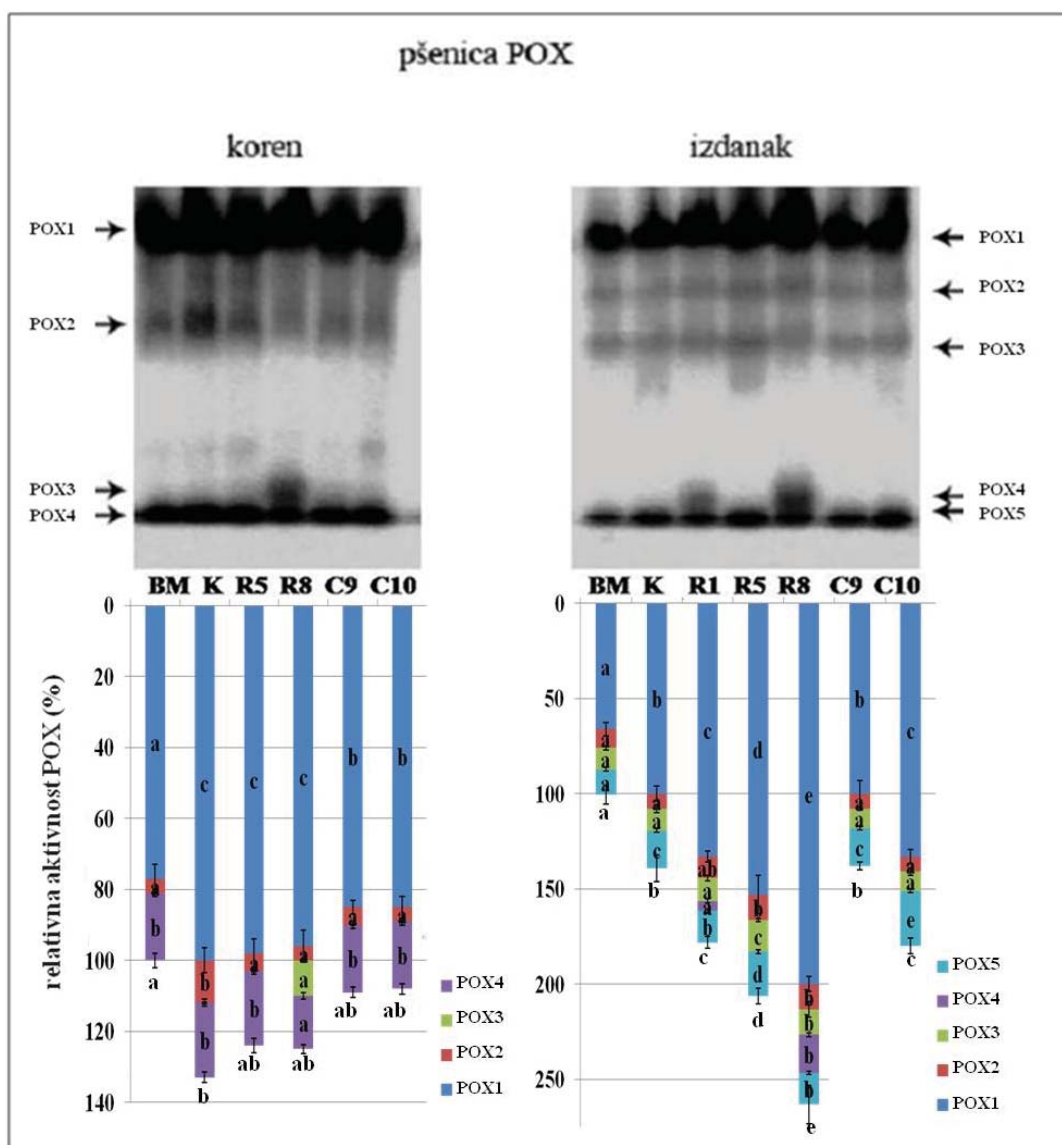
4.3.2.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza

Na gelu je uočena intenzivna POX aktivnost kako u korenovima tako i u izdancima klijanaca pšenice, koji su isključivani na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) što se vidi na Slici 27. Relativna ukupna aktivnost POX u korenovima je bila veća u odnosu na aktivnost u izdancima (Slika 27). Izvršena je normalizacija vrednosti tako da je ukupna relativna aktivnost POX u korenovima i izdancima klijanaca gajenih na BM bila 100%.

Statistički značajno povećanje aktivnosti POX je u korenovima bilo jedino kod klijanaca gajenih na FM K, dok je u izdancima ono zapaženo na svim FM (K, R1, R5, R8, C9 i C10). Ukupna relativna aktivnost POX u izdancima klijanaca gajenim na FM klona R8 je bila maksimalno povećana i iznosila je 263% u odnosu na BM (100%); takođe je i broj izoformi bio najveći (pet).

Pet izoformi se uočavalo kod uzoraka izdanaka, a 4 izoforme kod uzoraka korenova. Na FM R8 se eksprimiralo najviše izoformi i kod izdanaka i kod korenova. Kod svih testiranih korenova POX1 su u odnosu na ostale izoforme imale najveću aktivnost (Slika 27). Kod tretiranih klijanaca pšenice u korenovima aktivnost POX1 je bila statistički značajno povećana u poređenju sa kontrolom. Aktivnost POX2 je bila statistički značajno veća jedino kod klijanaca gajenih na FM K u poređenju sa aktivnostima ostalih POX2. POX3 se eksprimirala samo u korenovima klijanaca gajenih na FM klona R8. Aktivnost POX4 je bila statistički značajno manja kod klijanaca gajenih na FM klona R8, kada se uporedi sa ostalim POX4 u korenovima klijanaca pšenice (Slika 27).

Što se tiče POX aktivnosti u izdancima klijanaca, dominantna je bila POX1; kod klona R8 do 200% od ukupne aktivnosti kontrole (BM). Kod svih tretiranih klijanaca pšenice u izdancima aktivnost POX1 je bila statistički značajno veća u poređenju sa kontrolom (Slika 27). Aktivnosti POX2 i POX3 u izdancima klijanaca gajenih na FM klonova R5 i R8 su bile statistički značajno veće u odnosu na ostale odgovarajuće POX2 i POX3. Aktivnost POX4 u izdancima svih tretiranih klijanaca je bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolu (Slika 27).



Slika 27. Analiza aktivnosti POX kod klijanaca pšenice gajenih na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost različitih izoformi određivana je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na 1,5% akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje gvajakola kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

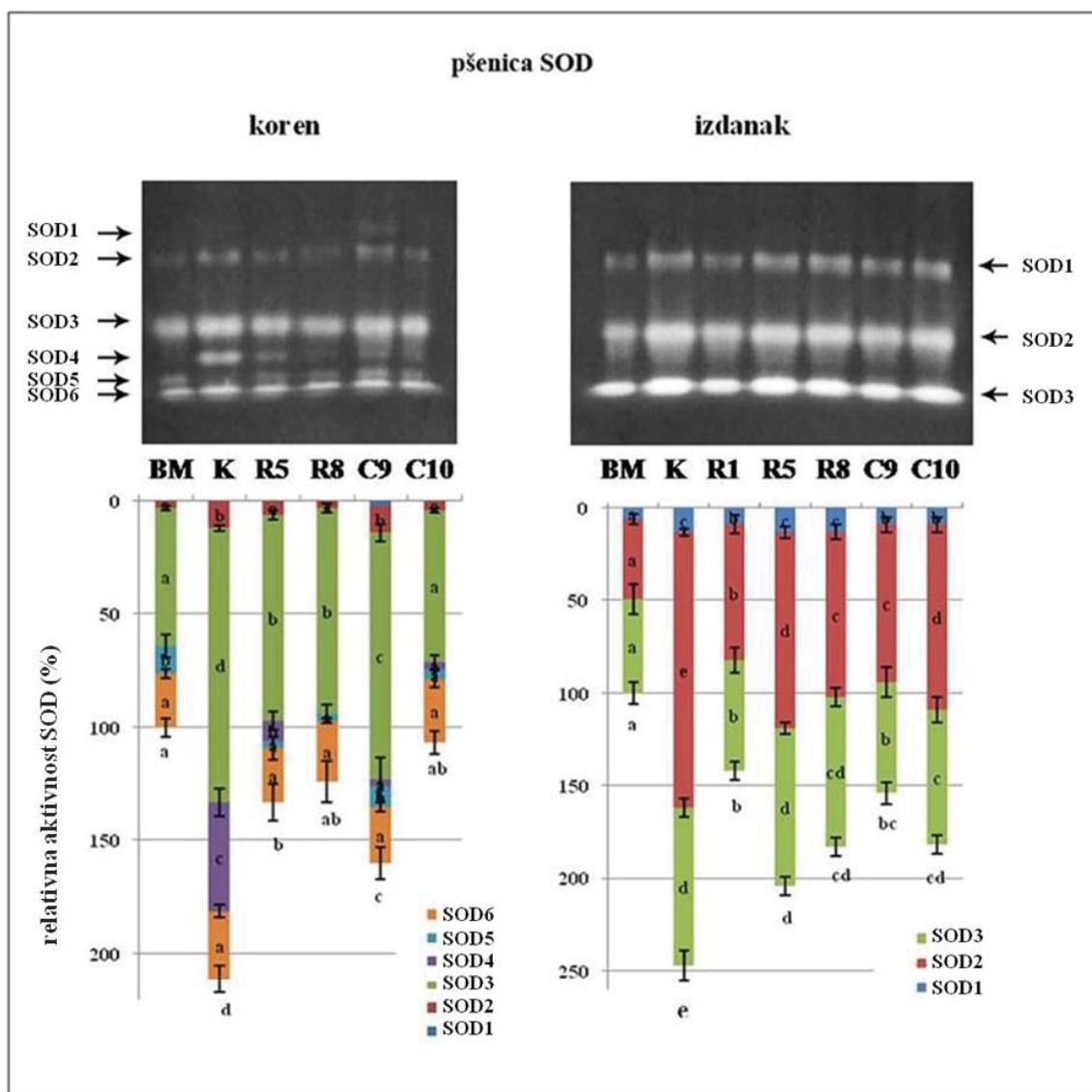
4.3.2.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza

Na gelu je zapažena intenzivna SOD aktivnost i u korenovima i u izdancima klijanaca pšenice koji su isključivani na kontrolnom BM i FM kontrolnih netransformisanih korenova (K), kao i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10), što se vidi na Slici 28. Relativna ukupna aktivnost SOD u izdancima je bila veća u odnosu na aktivnost u korenovima klijanaca (Slika 28). Tri izoforme su se uočavale kod uzoraka izdanaka, a šest izoformi kod uzoraka korenova.

Statistički značajno povećanje aktivnosti SOD, nakon tretmana FM je bilo u korenovima jedino kod klijanaca gajenih na FM kontrolnih korenova (K) i klonova R5 i C9, kao i u izdancima klijanaca gajenim na svim FM (K, R1, R5, R8, C9 i C10).

U uzorcima korenova najveća relativna ukupna aktivnost SOD je zabeležena kada su klijanci gajeni na FM netransformisanih korenova K (211%) u odnosu na kontrolni BM (100%). U korenovima klijanaca gajenih na FM klona C9 se ekspresiralo najviše izoformi (šest). SOD1 se ekspresirala samo u korenovima klijanaca gajenim na FM klona C9. Aktivnost SOD2 je bila statistički značajno povećana u korenovima klijanaca gajenih na FM netransformisanih korenova (K) i klona C9, u odnosu na sve druge SOD2. SOD3 u korenovima klijanaca, u odnosu na sve ostale izoforme, su imale najveću aktivnost: 61% od ukupne aktivnosti kontrole kod BM, do 121% kod K (Slika 27). Od SOD3 najmanja aktivnost je zabeležena kod klijanaca gajenih na kontrolnom BM medijumu i FM klona C10. SOD4 se ekspresirala u korenovima klijanaca gajenih na FM kontrolnih netransformisanih korenova (K), gde je imala najveću aktivnost, i kod klonova R5 i C9. SOD5 se jedino nije ekspresirala u korenovima klijanaca gajenih na FM kontrolnih netransformisanih korenova (K). SOD6 je imala istu aktivnost kod svih ispitivanih uzoraka korenova.

Ukupna relativna aktivnost SOD u izdancima klijanaca gajenim na FM netransformisanih korenova (K) je bila maksimalno povećana i iznosila je 247% u odnosu na kontrolu (BM, 100%). Aktivnosti svih pojedinačnih izoformi SOD u izdancima tretiranih klijanaca su bile statistički značajno veće u odnosu na odgovarajuće kontrolne (Slika 28).

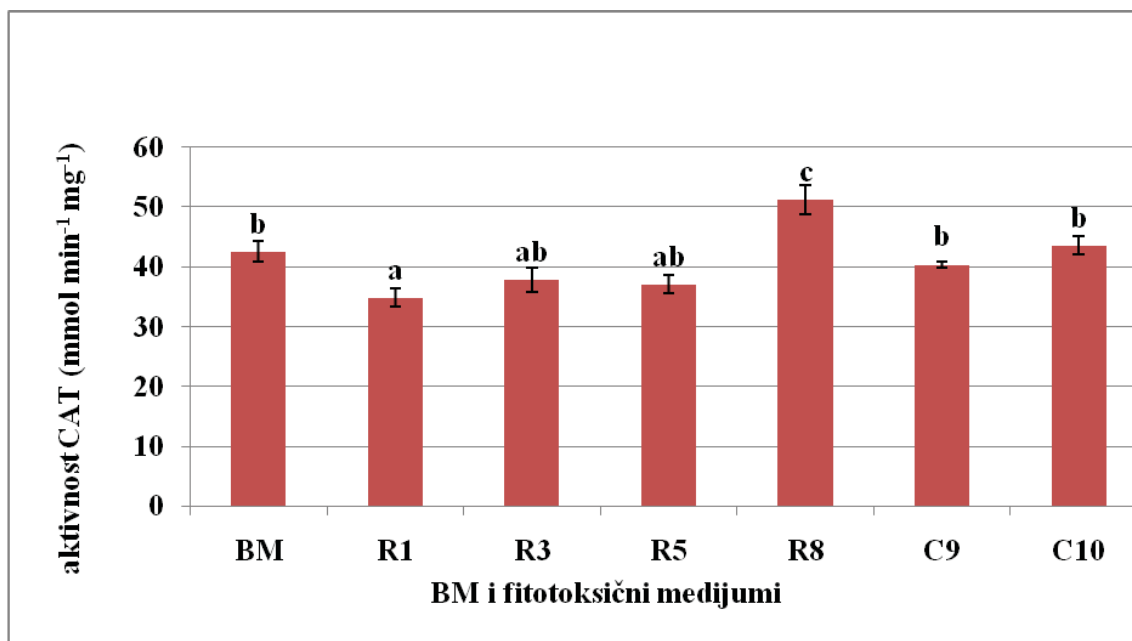


Slika 28. Analiza aktivnosti SOD kod klijanaca pšenice gajenih na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost različitih izoformi određivana je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na 1,5% akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje NBT kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.3.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca arabidopsisa

4.3.3.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza

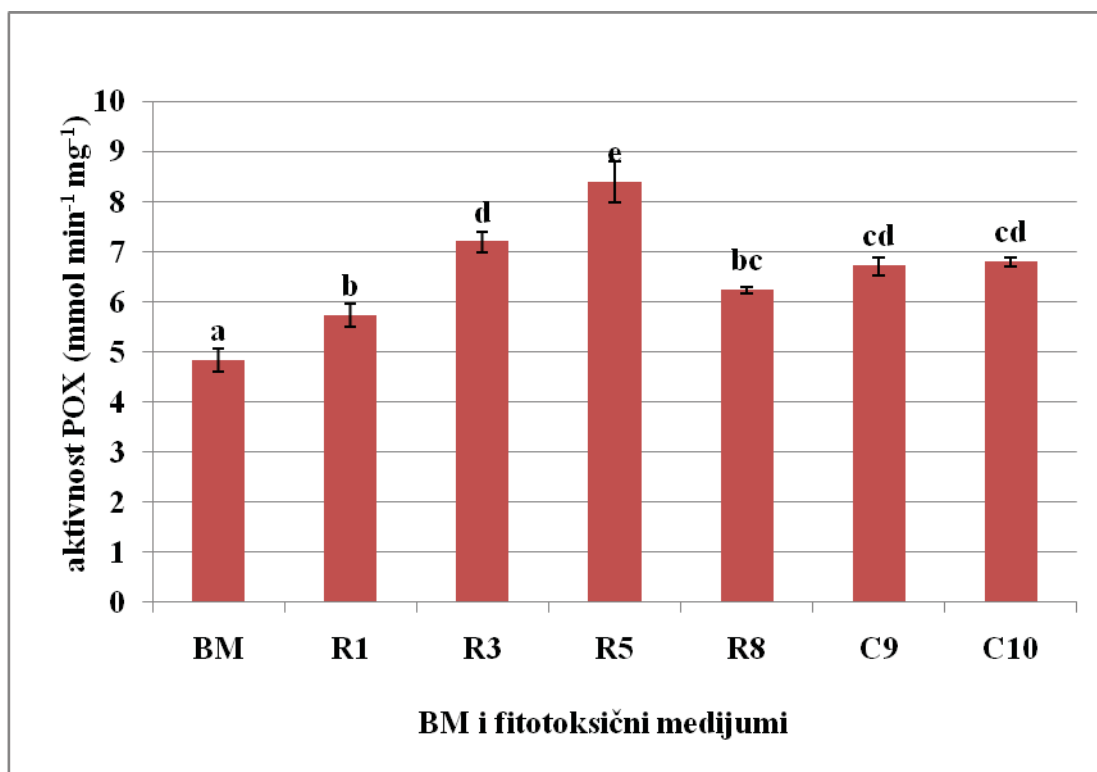
Rezultati spektrofotometrijske kvantifikacije aktivnosti ukupnih CAT u klijancima arabidopsisa, koji su isključivani i rasli 3 nedelje na kontrolnom BM, kao i na FM različitim klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) su pokazali da je aktivnost ista ili smanjena kod svih klonova, sem kod klona R8, u odnosu na kontrolu (BM). Najmanja aktivnost ($35 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) je zabeležena kod klona R1 (Slika 29).



Slika 29. Ukupna aktivnost katalaza (CAT) u klijancima arabidopsisa, koji su isključivani na kontrolnom BM i FM različitim klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini 240 nm uz korišćenje H_2O_2 kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.3.3.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza

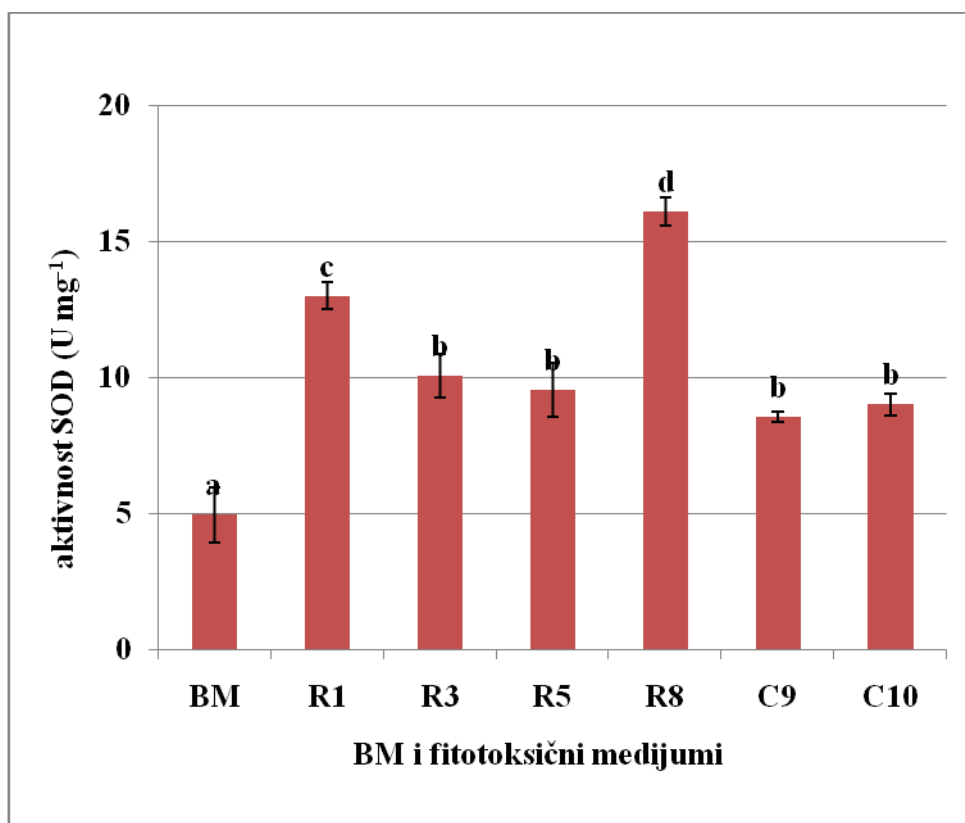
Što se tiče ukupne POX aktivnosti kod klijanaca arabidopsisa, ona je statistički značajno bila povećana kod svih klijanaca tretiranih FM u odnosu na kontrolu BM (Slika 30). Maksimalno povećanje od 1,86 puta je dobijeno kod klona R5.



Slika 30. Ukupna aktivnost peroksidaza (POX) u klijanacima arabidopsisa, koji su isključivani na kontrolnom BM i FM različitih klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini 430 nm uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.3.3.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza

Ukupna SOD aktivnost kod klijanaca arabidopsisa je bila statistički značajno veća u svim tretiranim klijancima u odnosu na kontrolu (BM) gde je iznosila $4,9 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, što se vidi na Slici 31. Najveća aktivnost je izmerena kod klonova R8 ($6,2 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) i R1 ($13,0 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

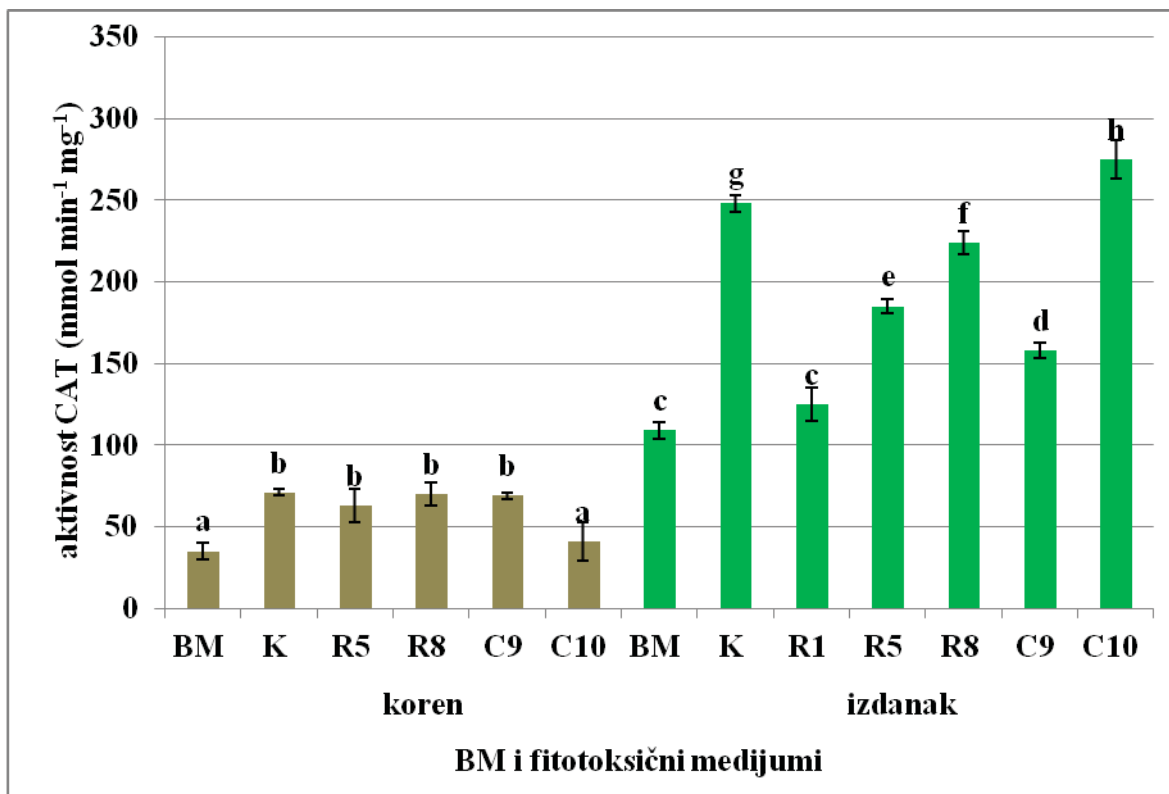


Slika 31. Ukupna aktivnost superoksid dismutaza (SOD) u klijancima arabidopsisa, koji su isključivani na kontrolnom BM i FM različitih klonova transformisanih korenova (R1, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini 540 nm uz korišćenje NBT kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.3.4. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza kod klijanaca pšenice

4.3.4.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza

Ukupna aktivnost CAT je bila uglavnom statistički značajno povećana i u korenovima i u izdancima klijanaca koji su gajeni na FM netransformisanih korenova (K), kao i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (BM), osim u korenovima klijanaca koji su rasli na FM C10 i izdancima klijanaca koji su rasli na FM klona R1. Aktivnost ukupnih CAT je bila veća u izdancima u poređenju sa korenovima klijanaca pšenice. Najveća aktivnost CAT je zabeležena u izdancima klijanaca koji su rasli na FM klona C10 ($275 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) i FM netransformisanih korenova (K) gde je iznosila $248 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Interesantno je da je aktivnost CAT u korenovima klijanaca koji su rasli na FM klona C10 bila najmanja ($41 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) dok je u izdancima ta aktivnost bila najveća ($275 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), što se vidi na Slici 32.

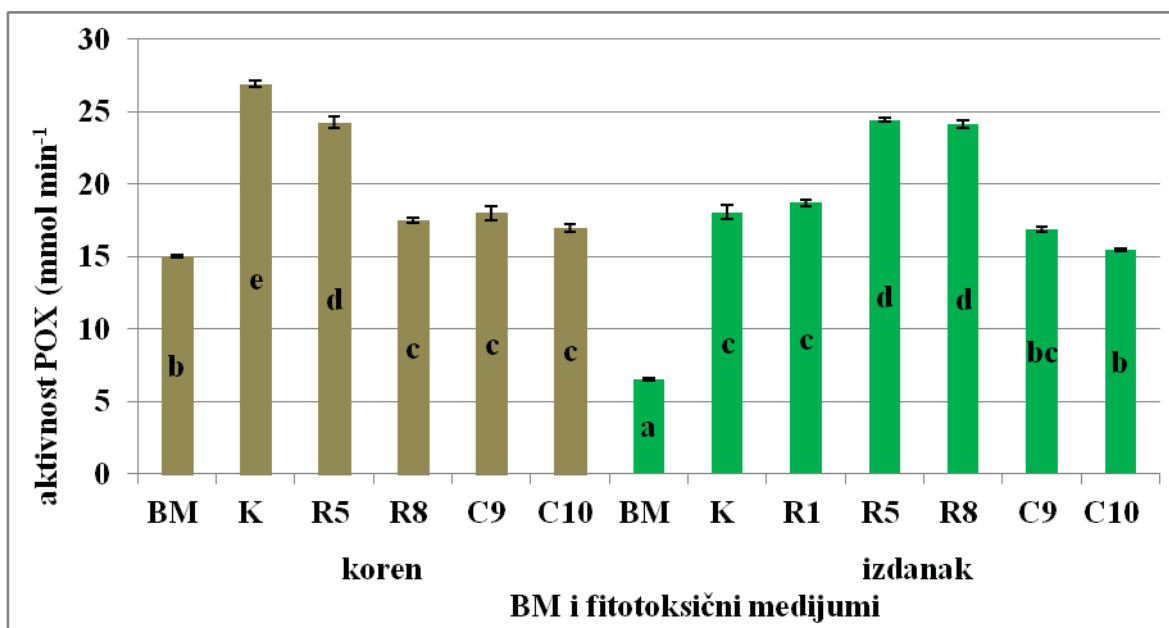


Slika 32. Ukupna aktivnost katalaza (CAT) u korenovima i izdancima klijanaca pšenice, koji su isklijavani na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini 240 nm uz korišćenje H₂O₂ kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

4.3.4.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza

Ukupna aktivnost POX je bila statistički značajno veća i u korenovima i u izdancima klijanaca pšenice, koji su gajeni na FM netransformisanih korenova (K), kao i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) u odnosu na

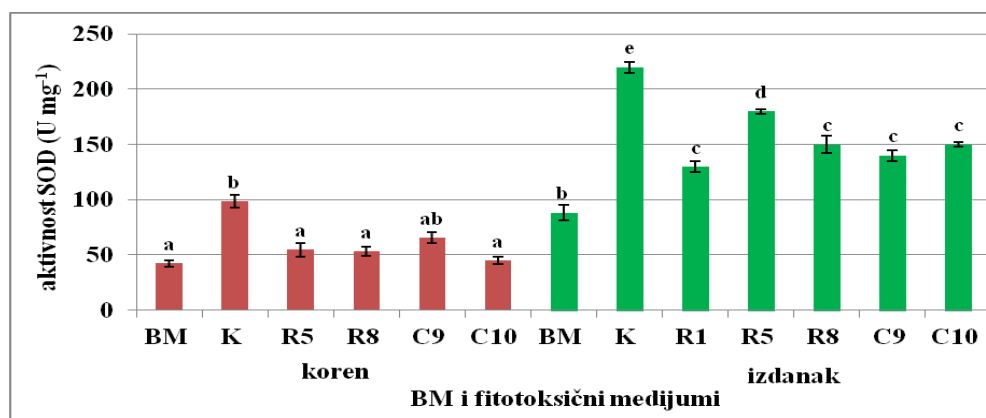
odgovarajuće kontrole (BM). U korenovima je aktivnost POX bila povećana od 1,1 (klon C10) do 1,8 puta (netransformisani korenovi K), a u izdancima od 2,4 (klon C10) do 3,8 puta (klon R5). Kod klona R5 je POX aktivnost bila velika i u korenovima (24,2 mmol min⁻¹ mg⁻¹) i u izdancima (24,5 mmol min⁻¹ mg⁻¹) klijanaca pšenice, dok je kod klona R8 bila veća u izdancima (24,2 mmol min⁻¹ mg⁻¹), a manja u korenovima (17,5 mmol min⁻¹ mg⁻¹), što se vidi na Slici 33.



Slika 33. Ukupna aktivnost peroksidaza (POX) u korenovima i izdancima klijanaca pšenice, koji su isključivani na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitim klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini 430 nm uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

4.3.4.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza

Ukupna aktivnost SOD u korenovima je bila statistički značajno veća jedino u korenovima klijanaca pšenice koji su isključivani na FM netransformisanih korenova (K) u odnosu na kontrolne klijanke isključivane na BM medijumu. Aktivnost SOD u izdancima klijanaca isključivanih na FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) je bila svugde statistički značajno veća u odnosu na odgovarajuću kontrolu (BM). U korenovima je aktivnost SOD bila povećana od 1,1 (klon C10) do 2,3 puta (K), a u izdancima od 1,5 (klon R1) do 2,5 (K). Kod pšenice SOD aktivnost je bila najveća i u korenovima ($98,5 \text{ U mg}^{-1}$) i u izdancima ($220,0 \text{ U mg}^{-1}$) klijanaca isključivanih na FM netransformisanih korenova (K) što se vidi na Slici 34. FM transformisanih korenova nisu doveli do povećanja SOD aktivnosti u korenovima pšenice, ali su zato izazvali značajno povećanje u izdancima.



Slika 34. Ukupna aktivnost superoksid dismutaza (SOD) u korenovima i izdancima klijanaca pšenice, koji su isključivani na kontrolnom BM i FM netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini 540 nm uz korišćenje NBT kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

4.4. Određivanje nivoa ekspresije gena regulatora ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa i pšenice tretiranih fitotoksičnim medijumom

Deoba ćelija u meristemima je regulisana univerzalnim molekularnim mehanizmima u kojima ključnu ulogu imaju geni koji kodiraju kinaze zavisne od ciklina (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDK) i cikline (*Cyclins*, CYC), poznati kao *CDK* i *CYC* geni.

Od oko 200 gena za CYC i CDK i drugih proteina uključenih u ćelijski ciklus arabidopsisa, koji se nalaze u bazi podataka GenBank, u našem radu je za praćenje nivoa ekspresije nakon tretmana sa fitotoksičnim medijumom *C. murale* izabrano 11 (Tabela 18), dok je za pšenicu uzeto svih 5 sekvenciranih gena (Tabela 19).

Tabela 18. Geni ćelijskog ciklusa koji su odabrani za analizu kod arabidopsisa.

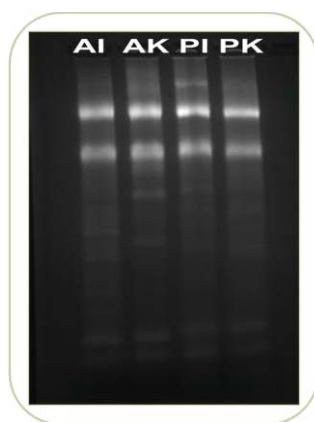
Ime gena	Ime prajmera	GenBank	Bp gena
<i>ACTIN7</i>	ACT	NM_121018	1700
<i>APC1</i>	APC1	NM_120638	5108
<i>CDKA;1</i>	CDKA;1	NM_114734	1417
<i>CDKB1;1</i>	CDKB1;1	NM_115278	1204
<i>CDKB1;2</i>	CDKB1;2	NM_129419	1438
<i>CDKB2;1</i>	CDKB2;1	NM_106304	1338
<i>CDKB2;2</i>	CDKB2;2	NM_101946	1214
<i>CYCA3;1</i>	CYCA3;1	NM_123674	1068
<i>CYCB2;4</i>	CYCB2;4	NM_106281	1347
<i>CYCD2;1</i>	CYCD2;1	NM_127815	1708
<i>CYCD4;2</i>	CYCD4;2	NM_121082	1061
<i>CYCH;1</i>	CYCH;1	NM_122644	1640

Tabela 19. Geni ćelijskog ciklusa koji su odabrani za analizu kod pšenice.

Ime gena	Ime prajmera	GenBank	Bp gena
<i>ACTIN</i>	ACT	AB181991	1163
<i>CYCD2</i>	CYCD2	AF512432	1645
<i>CDC2</i>	CDC2	U23409	1170
<i>CDKA;3</i>	CDKA;3	FJ883562	1573
<i>CDKB2</i>	CDKB2	FJ811975	1569
<i>CDKD;2</i>	CDKD;2	FJ811976	1663

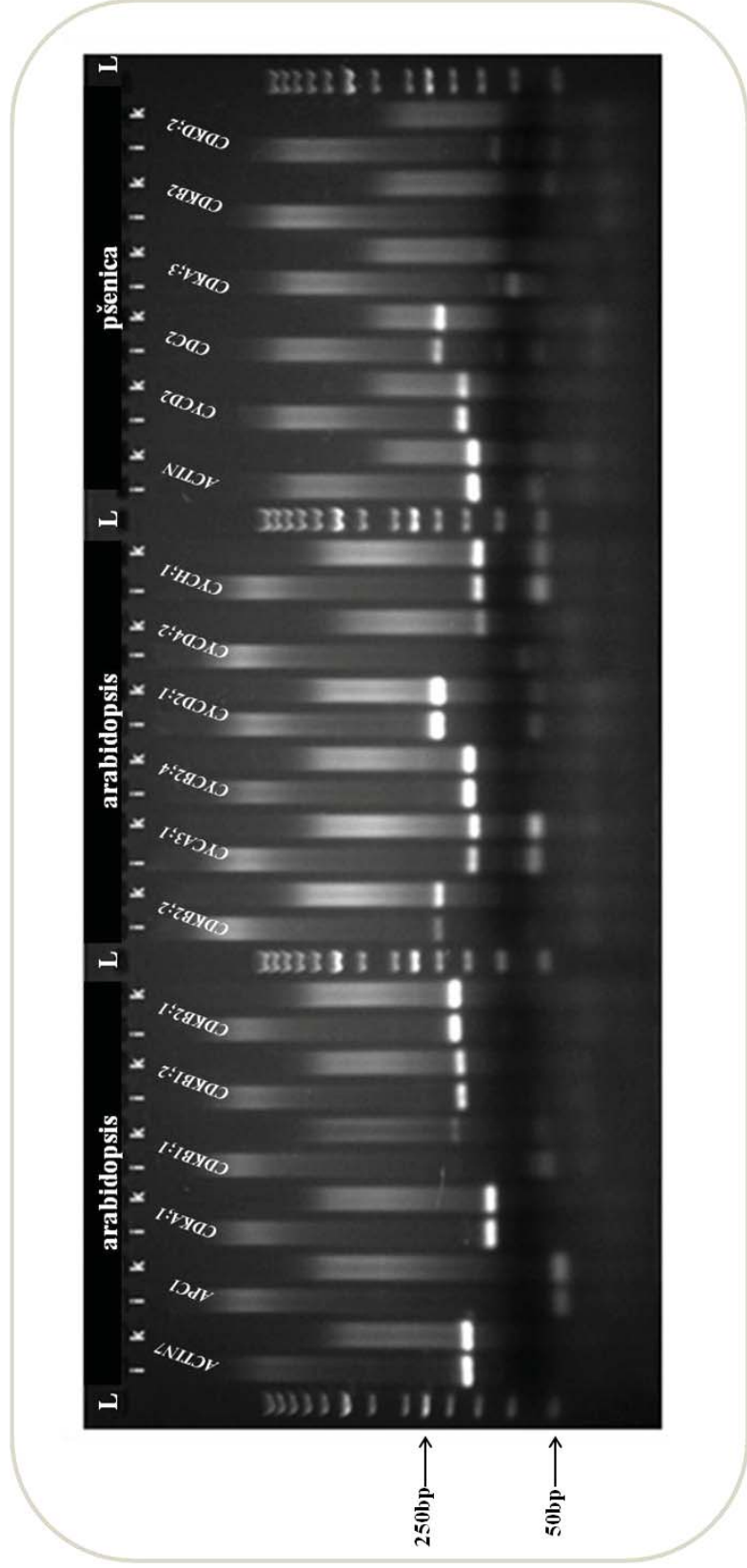
Nivo ekspresije gena ispitivan je u apeksima izdanaka i korenova klijanaca arabidopsisa starih 10 dana i klijanaca pšenice starih 7 dana, koji su 15 h bili podvrgnuti tretmanu sa FM klonu R8. Kao kontrola korišćeni su klijanci isključivani na BM medijumu.

Iz datog materijala je najpre izolovana ukupna RNK. Kvalitet izolovanih RNK je proveren na agaroznom gelu. Utvrđeno je da su izolovane RNK bile zadovoljavajućeg kvaliteta i koncentracije (Slika 35).



Slika 35. RNK izolovane iz apeksa izdanaka i korenova arabidopsisa i pšenice. Elektroforeza se odvijala na 120 V na 2% agaroznom gelu sa po 2 µg RNK u bunariću. AI–izdanak arabidopsisa; AK–koren arabidopsisa; PI–izdanak pšenice; PK–koren pšenice.

Izolovane RNK su iskorišćene za proveru ispravnosti prajmera odabranih gena arabidopsisa odnosno pšenice. U daljem radu su korišćeni svi prajmeri osim prajmera APC1 kod arabidopsisa i CDKA3, CDKB2, CDKD2 kod pšenice, koji su se pokazali neodgovarajućim, jer se dobijena dužina amplikona nije poklapala sa očekivanom dužinom (Slika 36, Tabela 20 i Tabela 21).



Slika 36. PCR produkti *CDK* i *CYC* gena arabidopsisa i pšenice; L – DNK marker, i – apeks izdanka, k –apeks korena.

Tabela 20. Provera dužine amplifikovanih fragmenata *CDK* i *CYC* gena arabidopsisa pomoću TotalLab TL 120 v 2009 programa; žuto obojeno – dobijena dužina amplikona koja nije odgovarala očekivanoj dužini.

Ime prajmera	Bp očekivano	Bp dobijeno
ACT	171	173
APC1	211	360
CDKA;1	124	122
CDKB1;1	177	176
CDKB1;2	163	163
CDKB2;1	170	171
CDKB2;2	193	194
CYCA3;1	134	138
CYCB2;4	141	140
CYCD2;1	194	200
CYCD4;2	122	126
CYCH;1	125	129

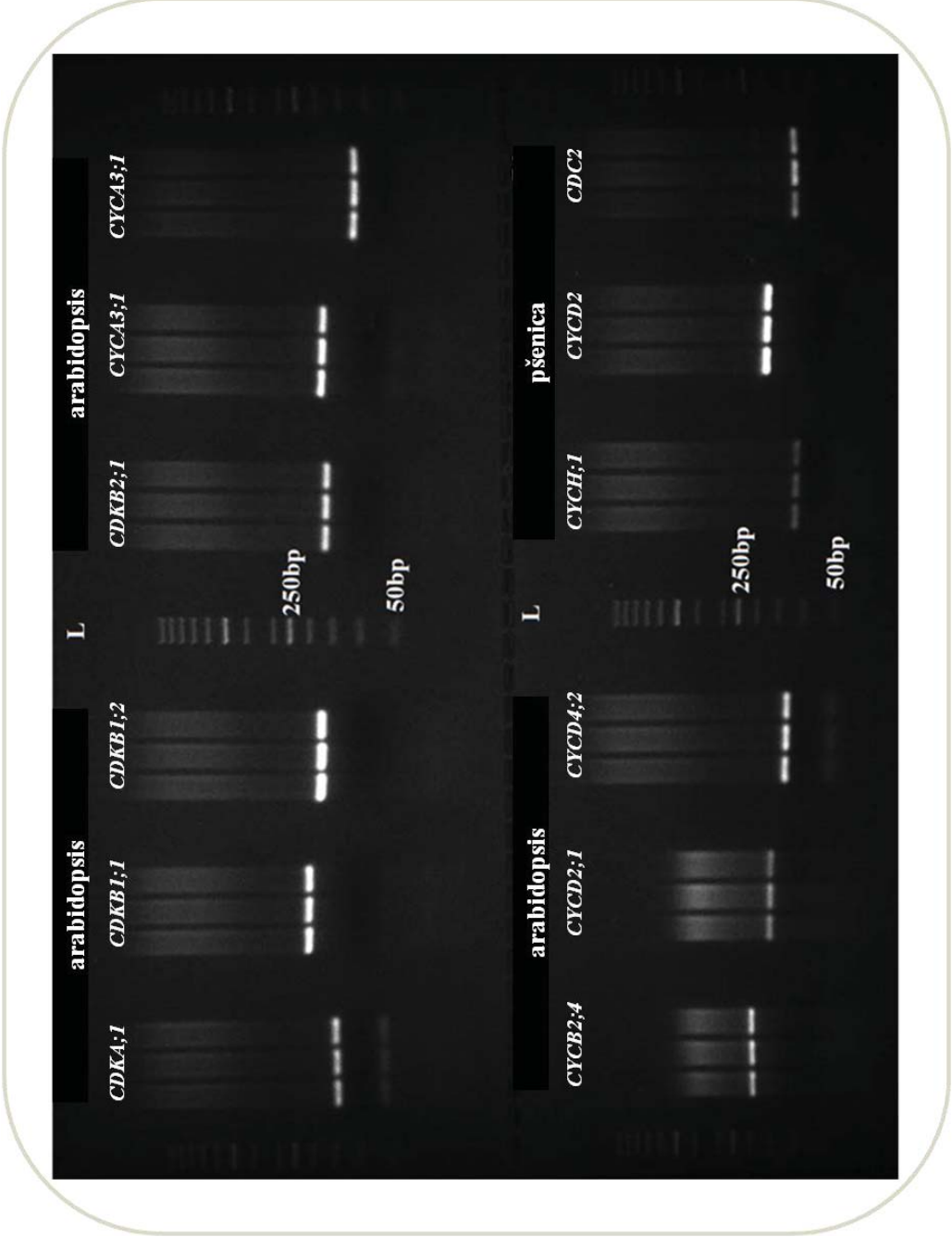
Tabela 21. Provera dužine amplifikovanih fragmenata *CDK* i *CYC* gena pšenice pomoću TotalLab TL 120 v 2009 programa; žuto obojeno – dobijena dužina amplikona koja nije odgovarala očekivanoj dužini. Vrednosti u zagradama predstavljaju veličine nespecifičnih produkata amplifikacije, koji su na gelu bili mnogo bleđi u odnosu na intenzitet specifičnih amplikona.

Ime prajmera	Bp očekivano	Bp dobijeno
ACT	132	136, (236)
CYCD2	149	152, (254)
CDC2	196	(40), 208
CDKA;3	207	45,83,448
CDKB2	207	59, 304
CDKD;2	197	55,153,254

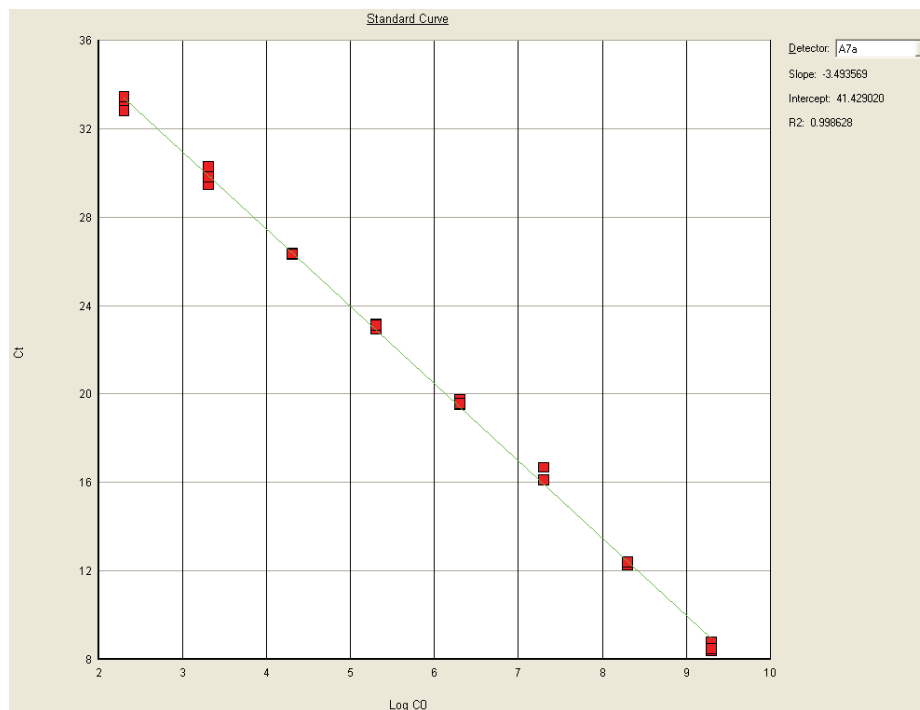
Izolovana RNK arabidopsisa i pšenice je reverzno transkribovana i potom amplifikovana specifičnim prajmerima. Dobijeni amplikoni su prečišćeni agaroznom elektroforezom (Slika 37), ekstrahovani su iz gela i spektrofotometrijski su kvantifikovani. Za svaki gen je napravljena serija razblaženja od 10^9 do 10^2 kopija/ μ l, koji su potom korišćeni kao standardi.

Za arabidopsis primer standardne krive poznate koncentracije amplifikovanih PCR produkata *CDKB2;2* gena prikazan je na Slici 38. Krive topljenja svih analiziranih amplikona, kako izdanaka tako i korenova, ukazivale su na to da su prajmeri za aktin i *CDK* i *CYC* gene kod arabidopsisa i pšenice bili efikasni i specifični jer su one dostizale maksimum na istim temperaturama. Primer krive topljenja amplifikovanih PCR produkata *CYCD4;2* gena prikazan je na Slici 39.

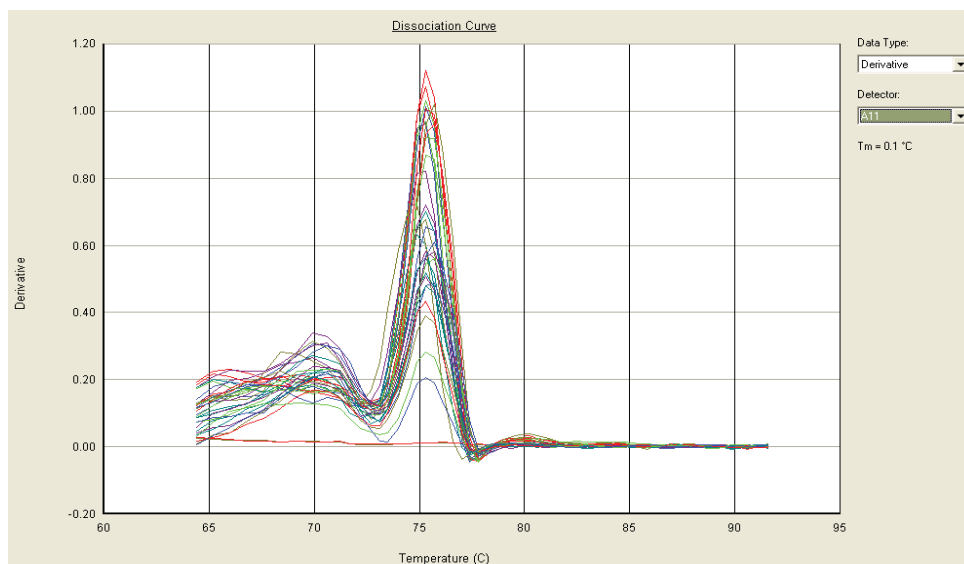
Ujednačena količina ukupne cDNK svih uzoraka potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena za aktin. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostizao prag detekcije (Ct) referentnog gena za aktin bio je ujednačen, što je potvrdilo i odsustvo statistički značajne razlike između analiziranih uzoraka apeksa izdanaka i korenova (Slika 40). Prosečna Ct vrednost referentnog gena za aktin, u apeksima izdanaka (AI), apeksima korenova (AK), apeksima izdanaka tretiranih biljaka FM klona R8 (tAI) i apeksima korenova tretiranih biljaka FM klona R8 (tAK) prikazan je na Slici 40.



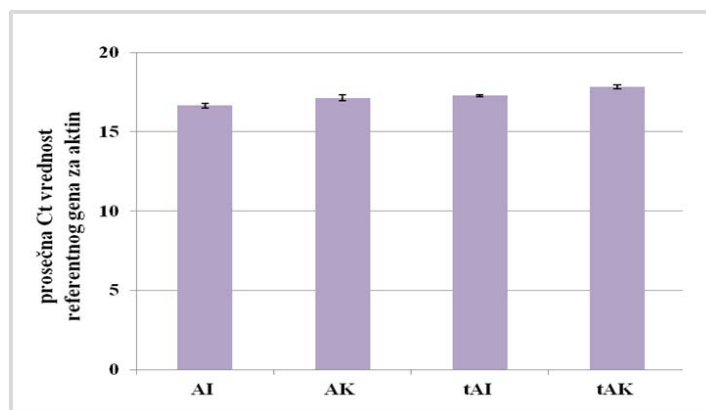
Slika 37. Gel sa koga je vršena ekstrakcija produkata PCR amplifikacije *CDK* i *CYC* gena arabidopsisa i pšenice; L – DNK marker.



Slika 38. Primer standardne krive poznate koncentracije amplifikovanih PCR produkata *CDKB2;2* gena.



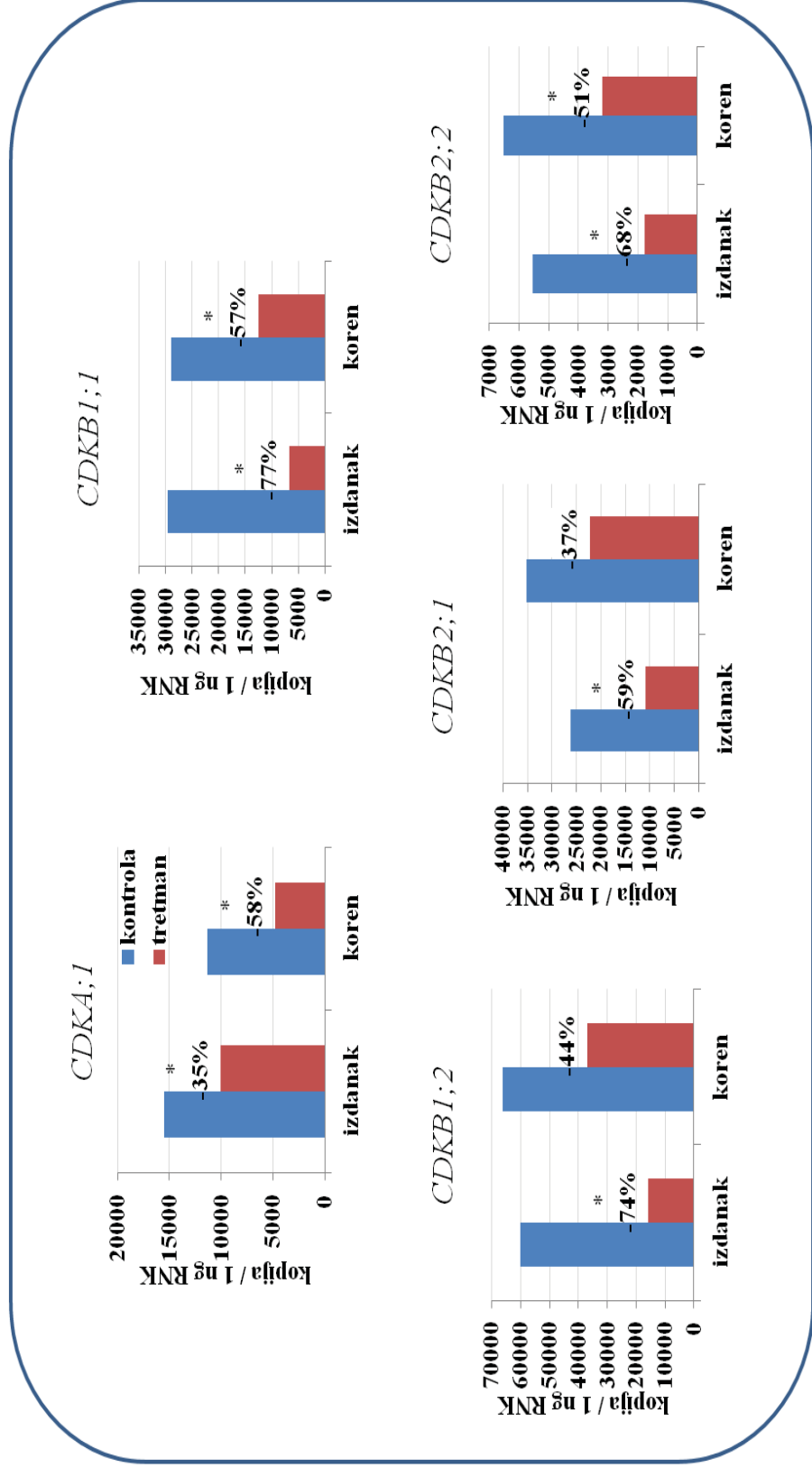
Slika 39. Primer dobro oblikovane krive topljenja amplifikovanih PCR produkata *CYCD4;2* gena.



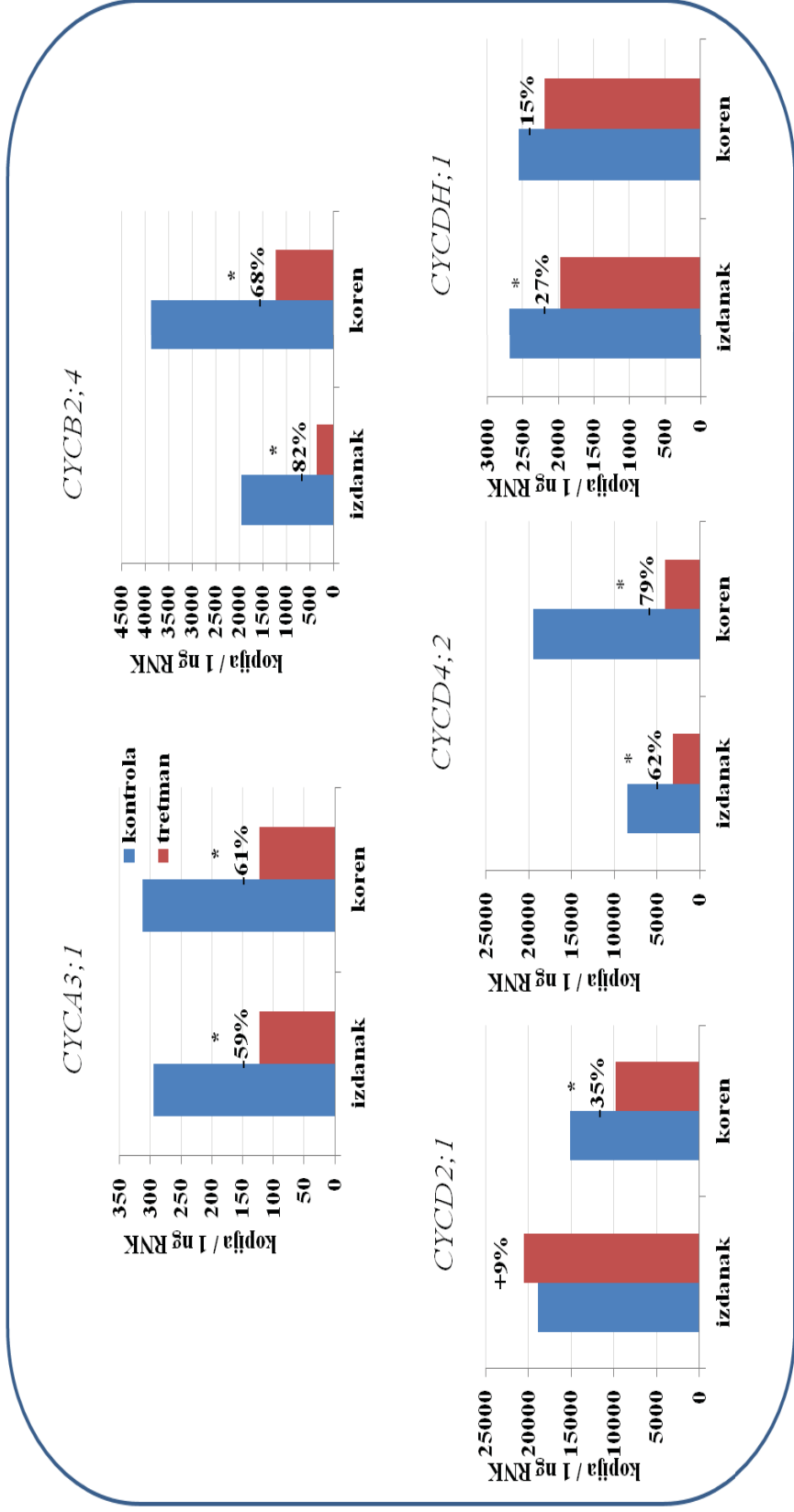
Slika 40. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostiže prag detekcije referentnog gena za aktin (Ct vrednost) u apeksima izdanaka (AI), apeksima korenova (AK), apeksima izdanaka tretiranih biljaka FM klona R8 (tAI) i apeksima korenova tretiranih biljaka FM klona R8 (tAK) kod arabidopsisa.

Metodom qPCR-a je pokazano statistički značajno smanjenje ekspresije *CDKA;1*, *CDKB1;1*, *CDKB2;2*, *CYCA3;1*, *CYCB2;4*, i *CYCD4;2* gena kod arabidopsisa (Slika 41 i 42) i *CDC2* gena kod pšenice (Slika 43), kako u apeksima korenova tako i u apeksima izdanaka tretiranih FM klona R8 u odnosu na ekspresiju pomenutih gena kod netretiranih kontrolnih uzoraka. Statistički značajno smanjenje ekspresije gena samo u apeksima izdanaka je zabeleženo za gene *CDKB1;2*, *CDKB2;1* i *CYCH;1* kod arabidopsisa (Slika 42). Geni *CYCD2;1* kod arabidopsisa (Slika 42) i *CYCD2* kod pšenice (Slika 43) su pokazivali statistički značajno smanjenje ekspresije samo u apeksima korenova, dok je u izdancima ekspresija ovih gena bila povećana i to statistički značajno kod pšenice. Interesantno je da su homologni geni: *CDKA;1* kod arabidopsisa i *CDC2* kod pšenice, kao i *CYCD2;1* kod arabidopsisa i *CYCD2* kod pšenice, pokazivali sličan profil ekspresije (*CDKA;1* i *CDC2* – inhibicija ekspresije i u apeksima korenova i u apeksima izdanaka; *CYCD2;1* i *CYCD2* – stimulacija ekspresije u apeksima izdanaka, a inhibicija ekspresije u apeksima korenova) nakon tretmana FM klona R8.

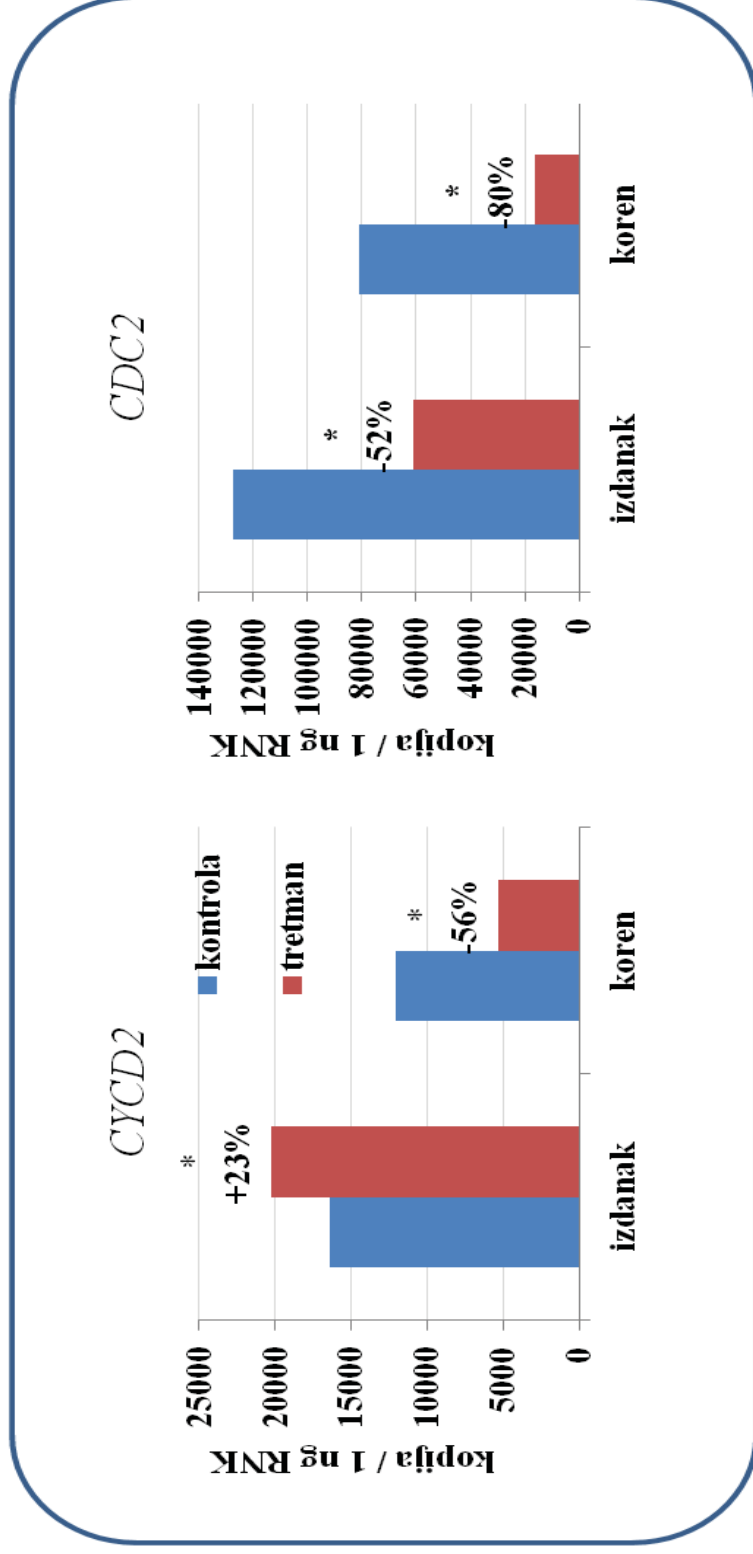
Dobijeni rezultati ukazuju na uticaj FM transformisanih korenova *C. murale* na procese koji se dešavaju tokom deoba ćelija u apikalnim meristemima test biljaka – arabidopsisa i pšenice.



Slika 41. Broj kopija transkripata *CDK* gena (po 1 ng RNK) u apeksima korenova i izdanaka kljanaca arabidopsisa tretiranih FM transformisanog klona R8. BM je korišćen kao kontrola. Vrednosti izražene u procentima sa predznakom – predstavljaju inhibiciju ekspresije *CDK* gena u odnosu na kontrolu. Vrednosti označene * pokazuju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u nivou ekspresije gena kod kontrolnih i tretiranih uzoraka utvrđene *Tukey's HSD* testom.



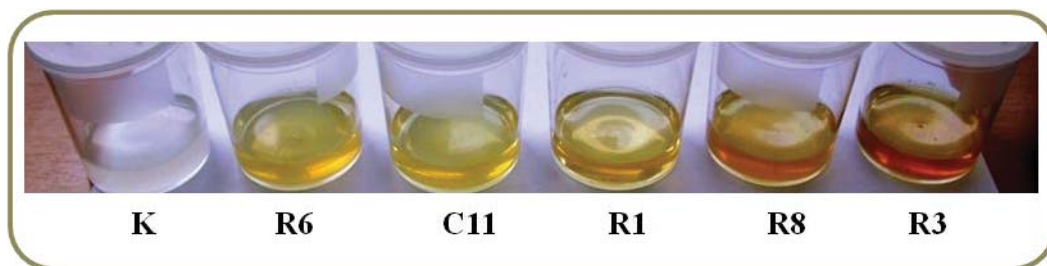
Slika 42. Broj kopija transkripata *CYC* gena u apeksima korenova i izdanaka kljanaca arabidopsisa tretiranih FM transformisanog klona R8. BM je korišćen kao kontrola. Vrednosti izražene u procentima sa predznakom – predstavljaju inhibiciju, a sa predznakom + predstavljaju stimulaciju ekspresije *CYC* gena u odnosu na kontrolu. Vrednosti označene * pokazuju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u nivou ekspresije gena kod kontrolnih i tretiranih uzoraka utvrđene Tukey's HSD testom.



Slika 43. Broj kopija transkripata *CYC* i *CDK* gena u apeksima korenova i izdanaka kljanaca pšenice tretiranih FM transformisanog klona R8. BM je korišćen kao kontrola. Vrednosti izražene u procentima sa predznakom – predstavljaju inhibiciju, a sa predznakom + predstavljaju stimulaciju ekspresije *CDK* gena u odnosu na kontrolu. Vrednosti označene * pokazuju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u nivou ekspresije gena kod kontrolnih i tretiranih uzoraka utvrđene *Tukey's* *HSD* testom.

4.5. Analiza fenolnih jedinjenja i šećera u fitotoksičnim medijumima

FM su se međusobno razlikovali po boji. Netransformisani korenovi nisu bojili medijum, dok su transformisani korenovi bojili medijum u različite nijanse žute boje u zavisnosti od klona (Slika 44).



Slika 44. Izgled FM posle 4 nedelje gajenja kontrolnih netransformisanih korenova (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R6, C11, R1, R8 i R3).

4.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u FM korišćena je spektrofotometrijska (*Folin–Ciocalteu*) metoda. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u FM kontrolnih, netransformisanih korenova (K) nije bio statistički značajno različit u odnosu na FM različitih klonova transformisanih korenova (Tabela 22) i iznosio je od 92,4 μg ekv. g. k. / 1 ml FM (R4) do 249,7 μg ekv. g. k. / 1 ml FM (R5).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je određivan i u korenovima koji su rasli u FM (Tabela 22). Kao u slučaju FM, i u korenovima se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja nije statistički razlikovao između kontrolnih (4,7 mg ekv. g. k./1 g suve mase) i transformisanih korenova gde je iznosio od 4,5 mg g. k./1 g suve mase (klon R5) do 5,1 mg g. k./1 g suve mase (klon R4). Ovo ukazuje da transformacija nije značajno uticala na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kod *C. murale*.

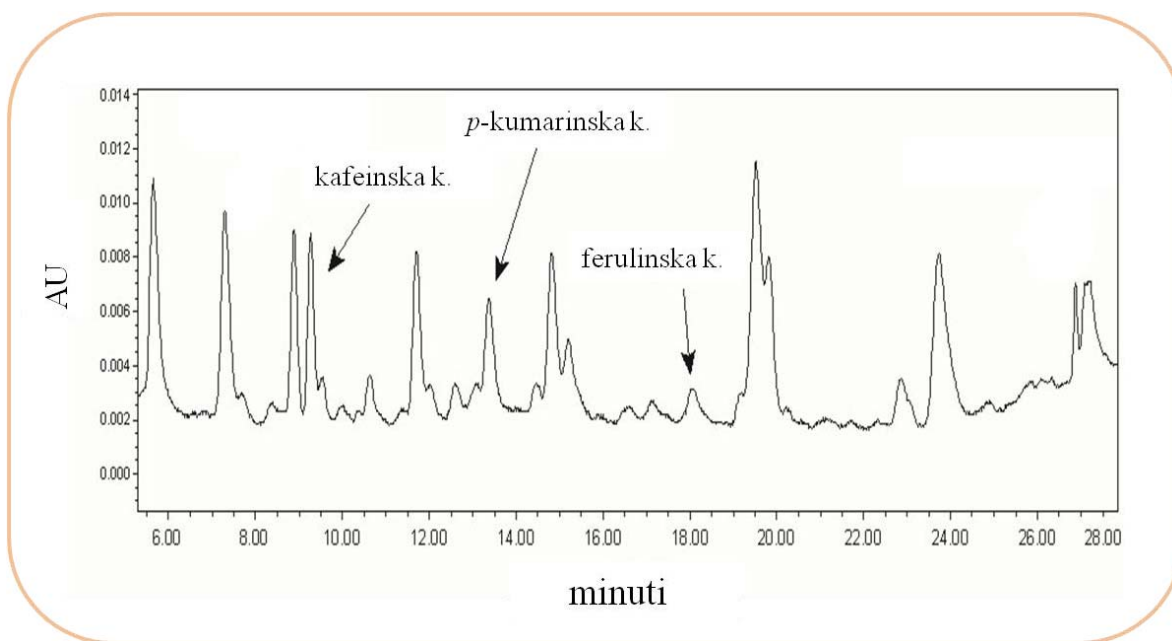
Tabela 22. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (izražen u mikrogram ekvivalentima galne kiseline (μg ekv. g. k.)/ 1 ml FM ili u miligram ekvivalentima galne kiseline (mg ekv. g. k.)/ 1 g suve mase kontrolnih netransformisanih korenova (K) i klonova transformisanih korenova (R4, R5, R6, R8, C9 i C11) *C. murale*. Korenovi su gajeni 4 nedelje u BM. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's *LSD* testu.

uzorci	FM	korenovi
	μg ekv. g. k. / 1 ml	mg ekv.g. k. / 1 g suve mase
K	205,5 \pm 16ab	4,7 \pm 0.1a
R4	92,5 \pm 5.3a	5,1 \pm 0.1a
R5	249,7 \pm 21.6b	4,5 \pm 0.1a
R6	175,7 \pm 8.9ab	4,5 \pm 0.0a
R8	143,1 \pm 16.7a	4,7 \pm 0.0a
C9	137,9 \pm 5.4a	4,5 \pm 0.4a
C11	141,7 \pm 8.6a	4,9 \pm 0.5a

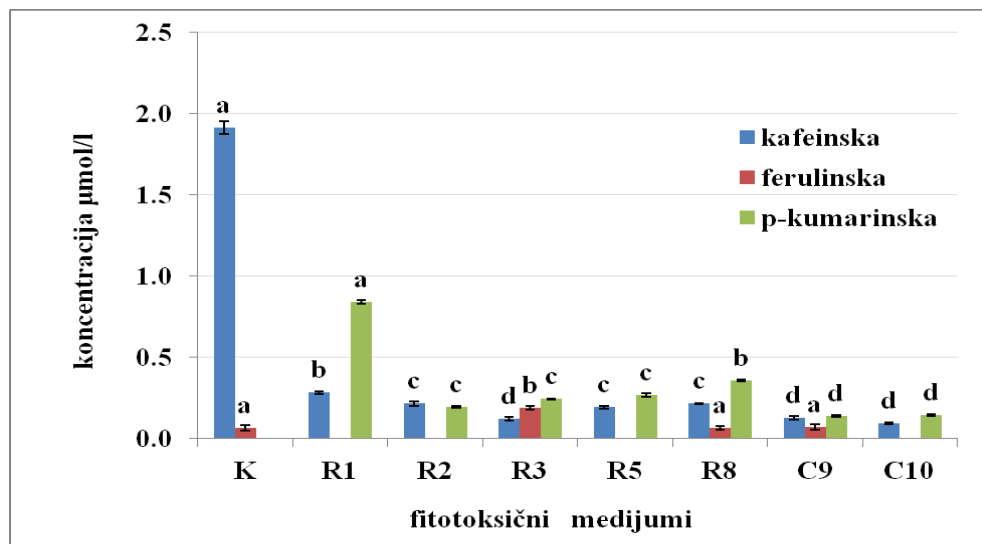
4.5.2. HPLC analiza fenolnih jedinjenja

Fenolne kiseline: kafeinska, ferulinska i *p*-kumarinska, detektovane su HPLC analizom u FM *C. murale* (Slika 45). Koncentracija kafeinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline u FM je varirala u zavisnosti od vrste korenova (netransformisani ili transformisani), kao i od klona transformisanog korena (Slika 46). Kao dominantna fenolna kiselina u FM netransformisanih korenova (K) bila je zastupljena kafeinska kiselina (1,91 $\mu\text{mol/l}$), dok je u FM svih klonova transformisanih korenova bilo najviše *p*-kumarinske kiseline (od 0,14 $\mu\text{mol/l}$ kod C9, do 0,84 $\mu\text{mol/l}$ kod R1). Ferulinska kiselina je

detektovana u FM kontrolnih korenova (K) i klonova R8 i C9 u koncentraciji od 0,07 $\mu\text{mol/l}$, dok je kod klona R3 njena koncentracija iznosila 0,19 $\mu\text{mol/l}$. Klonovi R1 i R8 su imali najviše koncentracije *p*-kumarinske kiseline (0,84 $\mu\text{g/ml}$ odnosno 0,36 $\mu\text{mol/l}$). Inače iz grupe fenolnih kiselina *p*-kumarinska kiselina je, pored ferulinske, u literaturi poznata kao supstanca sa jakim alelohemijskim dejstvom (Batish i sar., 2008).



Slika 45. HPLC hromatogram FM klona C9, starog 4 nedelje. Pikovi nađenih fenolnih kiselina su označeni strelicama.

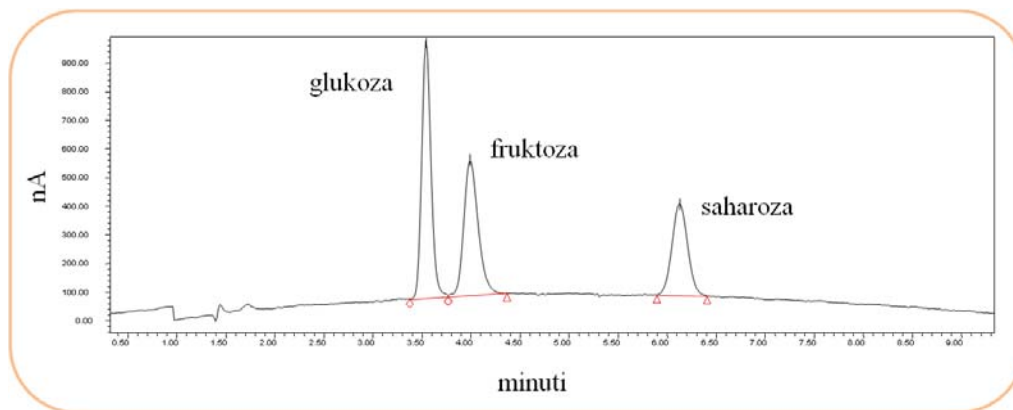


Slika 46. Sadržaj fenolnih kiselina – kafeinske, ferulinske i *p*-kumarinske (µmol/l) u FM kontrolnih netransformisanih (K) i različitih klonova transformisanih korenova (R1, R2, R3, R5, R8, C9 i C10) *C. murale*, određen HPLC analizom. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$) prema *Fisher's LSD* testu.

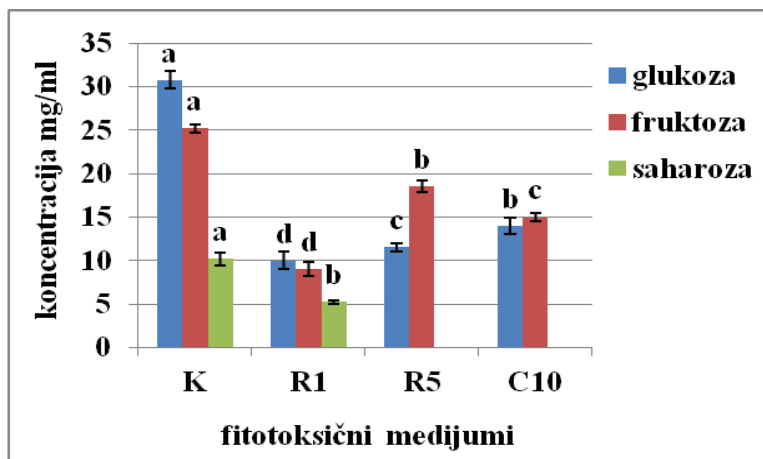
4.5.3. HPLC analiza šećera

HPLC analizom je pokazano prisustvo glukoze, fruktoze i saharoze u FM *C. murale* (Slika 47). Njihova koncentracija varirala je u zavisnosti od vrste korenova (kontrolni i transformisani) i od vrste klonova (R1, R5 i C10) što se vidi na Slici 48. U FM netransformisanih korenova (K) sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze je bio veći u poređenju sa FM transformisanih korenova (klonovi R1, R5 i C10). Kontrolne korenove odlikovao je spor rast, pa je zato i utrošak šećera bio manji. Kod transformisanih klonova saharoza je detektovana jedino u FM klona R1 (5,2 mg/ml) i to u skoro upola manjoj koncentraciji u odnosu na kontrolni netransformisani koren, dok je kod ostala dva klona ona bila u potpunosti razgrađena do glukoze i fruktoze (Slika 48). Odnos glukoze i fruktoze je varirao u zavisnosti od analiziranog klona. Tako je u FM kontrolnih netransformisanih korenova (K) i klona R1 sadržaj glukoze bio veći u poređenju sa sadržajem fruktoze, dok je

kod FM klonova R5 i C10 on bio manji (Slika 48). FM su se međusobno razlikovali po sadržaju saharoze, glukoze i fruktoze u njima.



Slika 47. HPLC hromatogram FM netransformisanih korenova (K), starog 4 nedelje, na kome su označeni pikovi nađenih šećera.



Slika 48. Sadržaj šećera – glukoze, fruktoze i saharoze (mg/ml) u FM u kome su rasli netransformisani (K) i transformisani klonovi (klonovi R1, R5 i C10) *C. murale* tokom 4 nedelje, određen HPLC metodom. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SE. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku za koncentracije određenog šećera ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

4.6. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca test biljaka

Pošto je HPLC analizom u FM detektovano prisustvo kafeinske kiseline (C), ferulinske kiseline (F) i *p*-kumarinske kiseline (*p*-C), za koje se u literaturi navodi da imaju alelopatski efekat, u narednom eksperimentu ispitan je efekat čistih supstanci ovih fenolnih kiselina na klijanje i rast klijanaca test biljaka – arabidopsisa, pšenice i salate.

4.6.1. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca arabidopsisa

Najmanja koncentracija fenolnih kiselina, koja je inhibirala klijavost semena i rast klijanaca arabidopsisa isključivanih 21 dan, bila je 0,5 mmol/l (Slika 49). Na kontrolnim BM i BM sa 0,04% DMSO nije bilo statistički značajnih razlika u srednjim vrednostima finalne klijavosti, dužine najdužeg lista, broja listova u rozeti, dužini korena i svežoj masi klijanaca (Tabela 23).

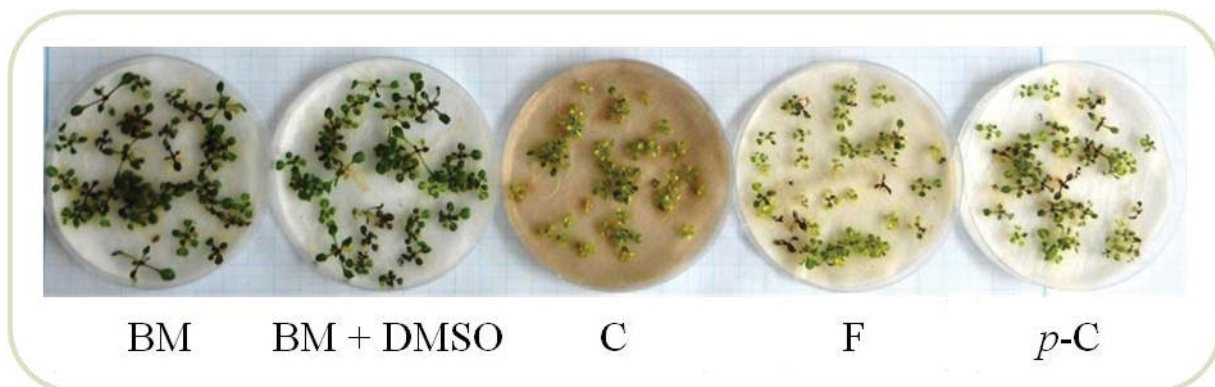
Finalno klijanje semena arabidopsisa, nakon 3 nedelje gajenja na medijumu sa fenolnim kiselinama, bilo je smanjeno u odnosu na klijanje kontrolnih semena. Najizraženiji inhibitorni efekat je imala *p*-C koja je inhibirala finalno klijanje za 19%, dok je inhibitorni efekat ostale 2 kiseline bio blaži (11%) što se vidi u Tabeli 23.

Suprotno klijanju, maksimalno smanjenje dužine najdužeg lista izazvale su C (56%) i F (54%), dok su F (33%) i *p*-C (29%) imale najveći negativni efekat na broj listova u rozeti (Tabela 23).

Sve tri ispitivane kiseline su statistički značajno inhibirale rast korenova klijanaca u odnosu na kontrolu. Maksimalno smanjenje dužine korenova (85%) je izazvala C. Srednje inhibitorno dejstvo na rast korenova je imala F (71%), dok je najmanje inhibitoran efekat ispoljila *p*-C (56%), što se vidi u Tabeli 23.

Najjače inhibitorno dejstvo na prirast sveže mase klijanaca je imala C (71%), dok je najslabiji efekat (46%) imala *p*-C (Tabela 23).

Klijanci iskljavani u prisustvu C imali su svetlo-žuto-zelenu boju, a korenovi su bojili filter papir braon. Svetlo žuta boja se uočavala i kod klijanaca koji su iskljavani u prisustvu F i *p*-C (Slika 49).



Slika 49. Efekat kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) kiseline u koncentraciji od 0,5 mmol/l na klijavost semena i razvoj klijanaca arabidopsisa. BM – bazalni medijum, DMSO – dimetil sulfoksid (0,04%).

Tabela 23. Efekat kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) kiseline (0,5 mmol/l) na klijavost semena i razvoj klijanaca arabidopsisa. Procenat proklijalih semena (%), dužina korena (cm), dužina najdužeg lista (mm), broj listova u rozeti i sveža masa klijanaca (mg) su mereni nakon 21 dana. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SE tri nezavisna eksperimenta sa po 100 semena u svakom tretmanu. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's *LSD* testu.

	Finalna klijavost (%)	Inhibicija (%)	Dužina najdužeg lista (mm)	Inhibicija (%)	Broj listova u rozeti	Inhibicija (%)	Dužina korena (cm)	Inhibicija (%)	Sveža masa klijanaca (mg)	Inhibicija (%)
BM	99,3 \pm 0,0c		10,2 \pm 0,1c		10,2 \pm 0,1c		7,9 \pm 0,1d		20,2 \pm 0,4d	
DMSO (0,04 %)	99,0 \pm 0,1c	0	10,3 \pm 0,1c	0	10,2 \pm 0,1c	0	7,9 \pm 0,1d	0	19,9 \pm 0,4d	1
C	88,0 \pm 0,1b	11	4,5 \pm 0,1a	56	8,5 \pm 0,1b	16	1,2 \pm 0,0a	85	6,0 \pm 0,2a	71
F	88,0 \pm 0,1b	11	4,7 \pm 0,1a	54	6,8 \pm 0,1a	33	2,3 \pm 0,0b	71	8,7 \pm 0,3b	57
<i>p</i> -C	80,0 \pm 0,3a	19	5,9 \pm 0,1b	42	7,3 \pm 0,1a	29	3,5 \pm 0,1c	56	11,0 \pm 0,3c	46

4.6.2. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca pšenice

Najmanja inhibitorna koncentracija vodenih rastvora fenolnih kiselina, primenjenih pojedinačno ili u binarnim i tercijarnim smešama (videti Materijal i metode, poglavlje 3.14), koja je uticala na klijavost i rast klijanaca pšenice, iskljivanih 7 dana, bila je 5 mmol/l vode (Slika 50).

Na kontrolnim (voda i voda sa 0,3% DMSO) rastvorima nije bilo statistički značajnih razlika u srednjim vrednostima finalne klijavosti, dužine izdanaka, dužine korenova i sveže mase klijanaca, dok su na svim tretmanima, one bile statistički značajno manje u odnosu na kontrole (Tabela 24).

Što se tiče dejstva rastvora pojedinačnih fenolnih kiselina na finalno klijanje, ono je bilo najviše inhibirano (42%) u rastvoru *p*-C, a najmanje (31%) u rastvoru C. Inhibicija finalnog klijanja semena pšenice na tretmanima sa binarnim i tercijarnim smešama fenolnih kiselina iznosila je od 25% (u binarnoj smeši C i F) do 48% (u tercijarnoj smeši), što se vidi u Tabeli 24.

Klijanci pšenice na oba kontrolna tretmana, voda i vodeni rastvor DMSO, su se normalno razvijali dostižući posle 7 dana dužinu od 8,2 cm, onosno 8,4 cm. Međutim, klijanci koji su iskljavani u prisustvu različitih fenolnih kiselina imali su redukovanu dužinu izdanaka u odnosu na kontrolne. Najmanje inhibitorno (13%) delovao je rastvor C, a najviše (33%) rastvor F (Tabela 24). Maksimalna inhibicija dužine izdanaka u rastvorima binarnih ili tercijarnih smeša (38%) je bila u binarnoj smeši F i *p*-C, a najmanja (26%) u binarnoj smeši C i *p*-C, što je prikazano u Tabeli 24.

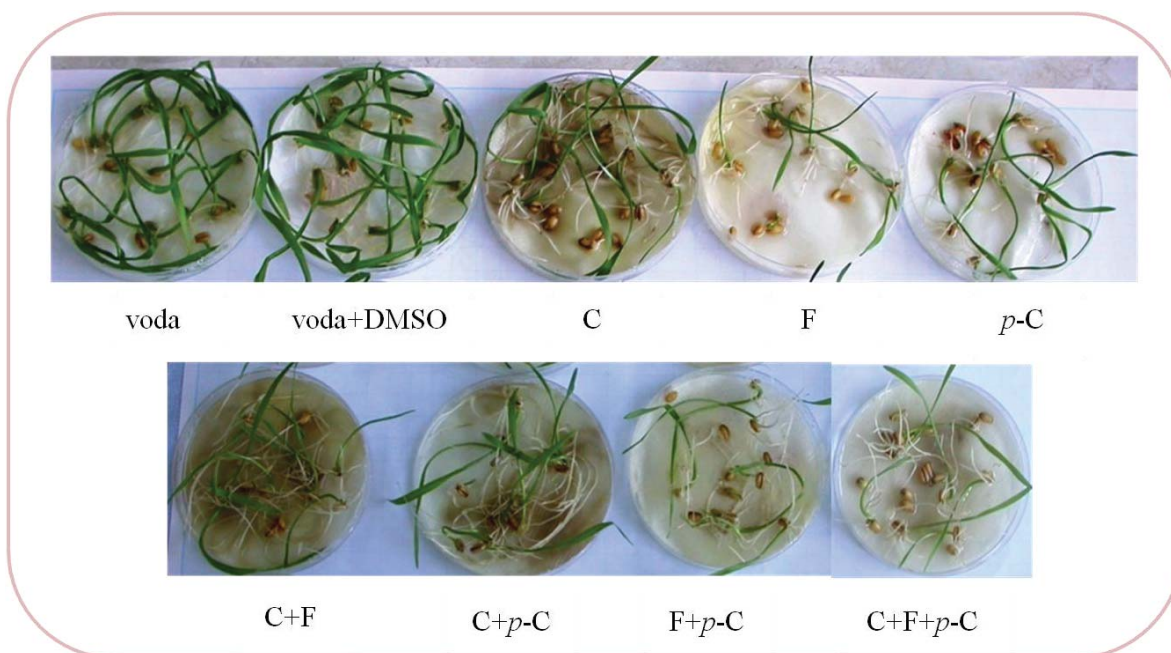
Korenovi kontrolnih klijanaca su se takođe normalno izduživali dostižući dužinu od oko 10 cm (Tabela 24). *p*-C i tercijarna smeša uticali su na značajno smanjenje (60%) dužine korena kod tretiranih klijanaca u odnosu na kontrolne (Tabela 24). C i binarna smeša C i F ispoljili su najmanji inhibitorni efekat na dužinu korenova klijanaca pšenice (49%, odnosno 46%), što se vidi u Tabeli 24.

Kontrolni klijanci imali su najveću vrednost sveže mase (137,5 mg). Najmanje inhibitorni (42%) rastvor pojedinačnih fenolnih kiselina, za svežu masu klijanaca, bio je

rastvor C, a najviše inhibitoran (48%) je bio rastvor F (48%). Od binarnih i tercijarnih smeša, na svežu masu klijanaca najveći efekat imala je binarna smeša F i *p*-C (58%), dok je u svim ostalim tretmanima sveža masa bila umanjena za 40–50% u odnosu na kontrolu i u tom pogledu između pojedinih tretmana nije bilo statistički značajnih razlika (Tabela 24).

Na osnovu rezultata eksperimenta može se zaključiti da je binarna smeša F i *p*-C imala najveći negativni efekat na dužinu korena, dužinu izdanaka i na svežu masu klijanaca (Tabela 25).

Korenovi klijanaca pšenice koji su isklijavani u rastvoru koji je sadržao C ispuštali su braon obojene metabolite (Slika 50).



Slika 50. Efekat kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) kiseline, pojedinačno (5 mmol/l) ili u binarnim (2x2,5 mmol/l) i tercijarnim (3x1,7 mmol/l) mešama, na klijavost semena i razvoj klijanaca pšenice.

Tabela 24. Efekat kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) kiseline, pojedinačno (5 mmol/l) ili u binarnim (2x2,5 mmol/l) i tercijarnim (3x1,7 mmol/l) smešama, na klijavost semena i razvoj klijanaca pšenice. Procenat proklijalih semena (%), dužina klijanaca (korena i izdanka, cm) i sveža masa klijanaca (mg) su mereni nakon 7 dana. Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SE tri nezavisna eksperimenta sa po 60 semena u svakom tretmanu. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

	Finalna klijavost (%)	Inhibicija (%)	Dužina izdanka (cm)	Inhibicija (%)	Dužina korena (cm)	Inhibicija (%)	Sveža masa klijanaca (mg)	Inhibicija (%)
VODA	86,7±1,9d		8,2±0,4d		10,4±0,6d		137,5±8,2c	
DMSO (0,3%)	93,3±1,7d	–	8,4±0,4d	–	10,2±0,4d	2	135,6±5,5c	1
C	60,0±0,0bc	31	7,1±0,4c	13	5,3±0,4bc	49	80,4±4,5b	42
F	55,0±2,9abc	37	5,5±0,4a	33	4,7±0,4abc	55	70,9±6,3ab	48
<i>p</i> -C	50,0±1,2ab	42	6,8±0,4bc	17	4,2±0,3ab	60	77,2±3,4b	44
C+F	65,0±2,9c	25	5,7±0,4a	30	5,6±0,5c	46	68,1±5,7ab	50
C+ <i>p</i> -C	58,3±4,4abc	33	6,1±0,4ab	26	4,9±0,5abc	53	74,8±5,2b	46
F+ <i>p</i> -C	51,7±3,5abc	40	5,1±0,5a	38	4,1±0,5a	61	58,1±7,3a	58
C+F+ <i>p</i> -C	45,0±2,9a	48	5,4±0,4a	34	4,2±0,5ab	60	75,4±5,3b	45

4.6.3. Ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca salate

Najmanja koncentracija vodenih rastvora fenolnih kiselina koja je negativno uticala na klijavost i rast klijanaca salate, iskljivanih 7 dana, bila je 5 mmol/l, pojedinačno ili ukupno u binarnim i tercijarnim smešama (Slika 51). Kontrolni klijanči koji su gajeni na 0,3% rastvoru DMSO i vodi normalno su rasli i razvijali se. Kod klijanaca tretiranih fenolnim kiselinama finalna klijavost, dužina kotiledona, dužina korena i sveža masa su bili statistički značajno smanjeni u odnosu na kontrole (Tabela 25).

Za razliku od FM koji su u potpuno inhibirali klijanje semena salate (Slika 21), inhibitorni efekat fenolnih kiselina je bio znatno blaži.

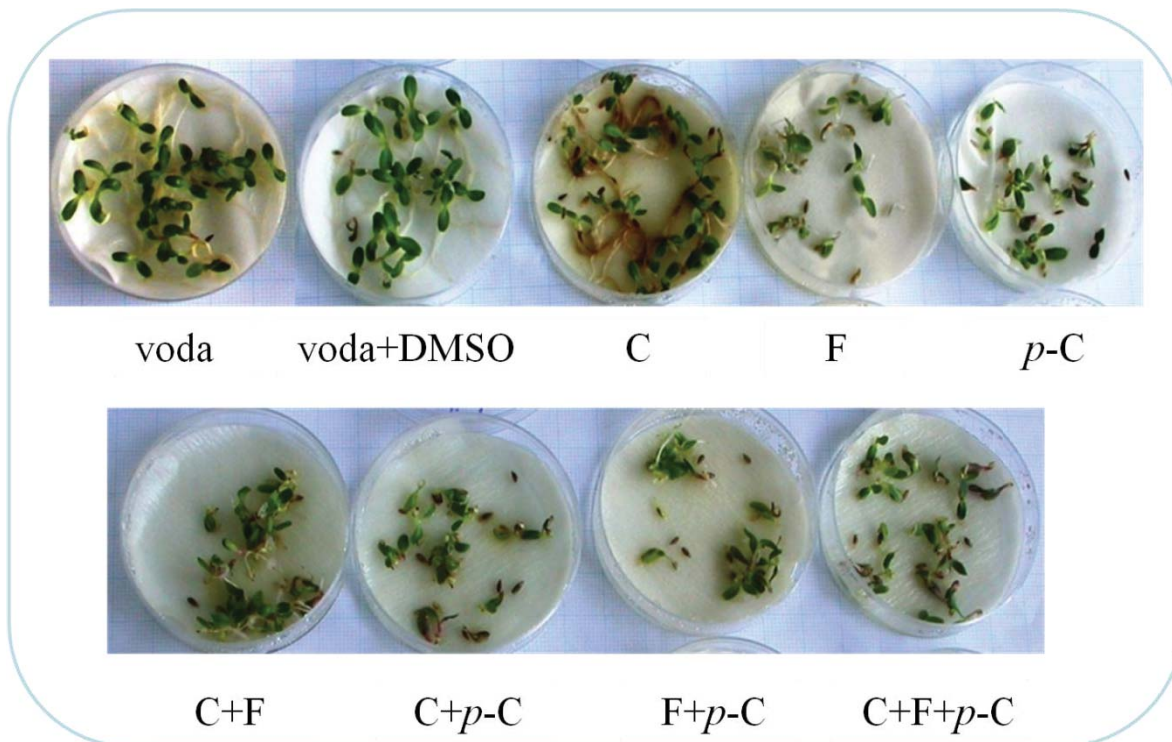
Najveća inhibicija finalnog klijanja (16 %) u pojedinačnim rastvorima fenolnih kiselina u poređenju sa kontrolom je bila u rastvoru *p*-C, dok je u binarnim ili tercijarnim smešama (40%) zabeležena u binarnoj smeši F i *p*-C, što se vidi u Tabeli 25.

Maksimalna inhibicija razvoja kotiledona (28%) je zapažena u rastvoru F, kada se posmatraju pojedinačni rastvori, a u binarnoj smeši C i *p*-C (13%), kada se posmatraju binarne i tercijarne smeše (Tabela 25).

Dužina korenova klijanaca je bila najviše smanjena u poređenju sa finalnim klijanjem, dužinom kotiledona i svežom masom klijanaca i to 90% i više u većini tretmana koje su sadržale *p*-C (Tabela 25). Očigledno je da je *p*-C imala presudnu ulogu u inhibiciji dužine korenova (Tabela 25).

Fenolne kiseline su, takođe, imale značajan inhibitoran uticaj na svežu masu klijanaca salate. Najveću inhibiciju od rastvora pojedinačnih fenolnih kiselina, pokazao je rastvor F (47%), a od binarnih i tercijarnih smeša, binarna smeša C i *p*-C (49%), što je prikazano u Tabeli 25.

Korenovi klijanaca su bojili braon filter papir, kada je u rastvoru bila prisutna C (Slika 51).



Slika 51. Efekat kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) kiseline, pojedinačno (5 mmol/l) ili u binarnim (2x2,5 mmol/l) i tercijarnim (3x1,7 mmol/l) smešama, na klijavost semena i razvoj klijanaca salate.

Tabela 25. Efekat kafeinske (C), ferulinske (F) i *p*-kumarinske (*p*-C) kiseline, pojedinačno (5 mmol/l) ili u binarnim (2x2,5 mmol/l) i tercijarnim (3x1,7 mmol/l) smešama, na klijavost semena i razvoj klijanaca salate. Procenat prokljalih semena (%), dužina kotiledona (mm) i korena (mm) i sveža masa klijanaca (mg) su mereni nakon 7 dana. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SE tri nezavisna eksperimenta sa po 90 semana u svakom tretmanu. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema *Fisher's LSD* testu.

	Finalna klijavost (%)	Inhibicija (%)	Dužina kotiledona (mm)	Inhibicija (%)	Dužina korena (mm)	Inhibicija (%)	Sveža masa klijanaca (mg)	Inhibicija (%)
VODA	94,7 \pm 0,9e		6,1 \pm 0,3e		45,1 \pm 2,0d		12,0 \pm 0,9d	
DMSO (0,3%)	91,7 \pm 1,5e	3	6,0 \pm 0,2de	2	46,5 \pm 2,4d	–	12,1 \pm 0,7d	–
C	88,7 \pm 1,9de	6	4,5 \pm 0,2ab	26	17,0 \pm 2,0c	62	9,5 \pm 0,7c	21
F	82,3 \pm 1,5cd	13	4,4 \pm 0,3a	28	4,6 \pm 1,0ab	90	6,4 \pm 0,6a	47
<i>p</i> -C	80,0 \pm 0,0c	16	5,1 \pm 0,3bc	16	2,7 \pm 0,6a	94	7,0 \pm 0,6ab	42
C+F	88,3 \pm 3,3e	7	5,5 \pm 0,2cd	10	6,7 \pm 0,6b	85	7,2 \pm 0,5ab	40
C+p-C	70,0 \pm 2,9b	26	5,3 \pm 0,2c	13	1,8 \pm 0,2a	96	6,1 \pm 0,5a	49
F+p-C	57,0 \pm 5,1a	40	5,6 \pm 0,2cde	8	3,5 \pm 0,6ab	92	8,3 \pm 0,7bc	31
C+F+p-C	78,3 \pm 1,7c	17	5,4 \pm 0,2c	11	2,1 \pm 0,3a	95	6,9 \pm 0,5ab	43

5. DISKUSIJA

5.1. Genetička transformacija *C. murale* pomoću *A. rhizogenes* A4M70GUS

Poznato je da odgovor biljke prilikom infekcije sa *A. rhizogenes* varira u zavisnosti od bakterijskog soja, kao i njegove interakcije sa biljnom vrstom i tipom tkiva (Sinkar i sar., 1988; Christey, 2001; Veena i Taylor, 2007). S obzirom da u literaturi ne postoje podaci o transformaciji *C. murale*, u našem radu je upotrebljen bakterijski soj agropinskog tipa *A. rhizogenes* A4M70GUS, koji se pokazao kao optimalan za transformaciju drugih biljnih vrsta (*Catharanthus roseus* – Batra i sar., 2004; *Tylphora indica* – Chaudhuri i sar., 2005; *Coffea arabica* – Alpizar i sar., 2006; *Withania somnifera* – Bandyopadhyay i sar., 2007; *Scutellaria baicalensis* – Tiwari i sar., 2008). Kao i kod većine prethodno pomenutih biljnih vrsta, inokulacija sa *A. rhizogenes* A4M70GUS je i kod *C. murale* dovela do pojave transformisanih korenova (*hairy roots*). U poređenju sa drugim biljnim vrstama dobijena efikasnost transformacije je bila prilično niska (do 11%), što ukazuje na povećanu otpornost *C. murale* prema infekciji sa sojevima *Agrobacterium* (Tabela 14).

Dodavanjem fenolnog jedinjenja – acetosiringona u kokultivacioni medijum tokom interakcije između bakterije i biljnog tkiva, moguće je poboljšati efikasnost transformacije. Poznato je da acetosiringon povećava efikasnost transformacije aktivirajući *vir* gene (Gelvin, 2000). Žitarice, koje su do skoro važile kao biljke nepodobne za transformaciju, uspešno su transformisane pomoću *A. tumefaciens* dodavanjem acetosiringona u kokultivacioni medijum (Rashid i sar., 2011). Nekoliko autora (Zdravković–Korać, 2004; Kumar i sar., 2006) ukazuje da acetosiringon takođe povećava efikasnost formiranja transformisanih korenova. U našim eksperimentima dodavanje 50 µmol acetosiringona u medijum, tokom kokultivacije, povećalo je indukciju *hairy roots* na eksplantatima korenova sa 7,4% na 11,1%. Na eksplantatima hipokotila u prisustvu acetosiringona u podlozi tokom kokultivacije, efikasnost transformacije je bila 3,2%, dok se bez acetosiringona *hairy roots* nisu ni formirali (tabela 14).

Transformisani korenovi su se javljali uglavnom na zasečenim stranama eksplantata biljaka, na mestima aktivne proliferacije ćelija, gde su se prvobitno formirali mali kalusi

(Slika 9 d, e). Poznato je da je na mestima povrede, gde su aktivne ćelijske deobe, sadržaj auksina veliki, što pogoduje formiranju transformisanih korenova (Nilsson i Olsson, 1997; Tiwari i sar., 2007).

Povrede biljnog tkiva su preduslov za genetičke transformacije pomoću bakterija roda *Agrobacterium* jer doprinose oslobađanju hemotoksičnih supstanci, kao što je acetosiringon (Gelvin, 2000).

Većina biljnih tkiva i organa, uključujući koren, hipokotil, kotiledon, list, lisnu dršku i stablo su podložni infekciji sa *A. rhizogenes*, a krajnji rezultat je formiranje transformisanih korenova (Yazaki i sar., 1998; Giri i sar., 2001; Krolicka i sar., 2001; Azlan i sar., 2002). Među različitim eksplantatima korišćenim za transformaciju pomoću *A. rhizogenes*, korenovi se nisu pokazali kao dobri eksplantati, naročito kod biljaka koje proizvode sekundarne metabolite u korenovima. Dobar primer je *Sapponaria vaccaria* čiji su korenovi bili nepogodni za transformaciju (Schmidt i sar., 2007). Suprotno tome, kod *Aralia elata* indukcija *hairy roots* na eksplantatima korenova je bila efikasnija (27%) od indukcije na eksplantatima petiola (10%), prema Kang i sar. (2006). U našem radu od svih ispitivanih eksplantata korenovi su se pokazali kao najbolji eksplantati za transformaciju.

Prvobitna selekcija transformisanih korenova u ovom radu je izvršena na osnovu brzog rasta izolovanih adventivnih korenova bez prisustva faktora rastenja (hormona) na čvrstom BM, kao što su sugerisali Tepfer i Casse–Delbart (1987). Ovaj metod je u skladu sa konceptom pozitivne selekcije, jer su transformisane ćelije stekle kompetenciju za rizogenezu, što im je omogućilo da se diferenciraju u odsustvu regulatora rastenja, nasuprot netransformisanim ćelijama koje nisu imale ovu sposobnost.

Hairy roots klonovi, nastali od pojedinačnih transformisanih korenova koji su odsecani sa različitih eksplantata, bili su podvrgnuti GUS histohemijskom bojenju i efikasnost transformacije je izražavana prema rezultatima tog testa. Od ukupno 86 potencijalnih klonova, 57 (tj. 66,3%) je pokazalo GUS ekspresiju. Iako je kao promotor *uidA* u ovom konstrukt korišćen pojačani 35S, koji se smatra konstitutivnim, ipak su se uočavale razlike u intenzitetu i distribuciji GUS boje (vršni delovi i centralni cilindar) kod različitih klonova. Momčilović i sar. (1997) su kod gencijana transformisanih istim konstruktom, takođe konstatovali variranje intenziteta boje korenova usled GUS reakcije

između različitih klonova, kao i unutar istog klona,. Ovakva varijabilnost ekspresije reporter gena pod kontrolom 35S promotora je u skladu i sa istraživanjima Van Leeuwen i sar. (2001), koji su pokazali, koristeći reporterski *luciferase (luc)* gen, da je aktivnost promotora CaMV 35S, koji bi trebalo da se eksprimira konstitutivno, zapravo prostorno i vremenski regulisana. Razlika u ekspresiji *luc* gena je ustanovljena ne samo među različitim transformantima *Petunia hybrida* (Vilm.), nego i među različitim listovima iste transformisane biljke, pa čak i među različitim delovima jednog lista. Autori pretpostavljaju da ova variranja u aktivnosti promotora mogu biti uslovljena lokalnom razlikom u količini, odnosno aktivnosti transkripcionih faktora unutar ćelija određenog tkiva, kao i usled razlike u dostupnosti hormonskih signala. Faktori koji takođe utiču na ekspresiju reporter gena su mesto integracije, broj kopija, kao i proces utišavanja gena.

U skladu sa tim postoji mogućnost da transformisano tkivo ne reaguje sa X-Gluc-om, ako je gen *uidA* utišan, npr. na transkripcionom nivou metilacijom *de novo* (Park i sar., 1996) ili post-transkripciono degradacijom specifične iRNK (Agrawal i sar., 2003). U našem radu svi nebojени klonovi su smatrani netransformisanim.

Pozitivna reakcija sa X-Gluc-om nije dovoljno pouzdan dokaz aktivnosti β -glukuronidaze, pa se ovaj rezultat prihvata kao preliminaran. Prisustvo *uidA* gena u svim analiziranim klonovima dodatno je potvrđena RT-PCR analizom.

Trinaest *hairy roots* klonova, koji su se najintenzivnije bojili u GUS reakciji i koji su intenzivno rasli na podlozi bez regulatora rastenja, odabrani su za dalja proučavanja i to 8 klonova koji su dobijeni na eksplantatima korenova (R1-R8), 3 na eksplantatima kotiledona (C9-C11) i 2 na eksplantatima listova (L12-L13). Intenzitet rasta kontrolnih netransformisanih korenova je bio veoma slab, dok je uvećanje sveže mase transformisanih korenova išlo od 16 puta (kod klona L13) do čak 359 puta (kod klona R2) u poređenju sa netransformisanim korenovima (Slika 11). Transformisani korenovi mnogih drugih biljaka pokazuju znatno manje uvećanje biomase, npr. *Scutellaria baicalensis* je imala povećanje od 37 puta (Tiwari i sar., 2008). Sem intenziteta rasta, transformisani klonovi su se razlikovali međusobno i po svom fenotipskom izgledu, što je pokazano i kod velikog broja drugih biljnih vrsta (Chaudhuri i sar., 2005; Batra i sar., 2004; Bandyopadhyay i sar., 2007; Tiwari i sar., 2007; Thimmaraju i sar., 2008; Triplett i sar., 2008; Taneja i sar., 2010).

Pomenuti autori smatraju da su ova variranja posledica različitih integracija T_L- i T_R-DNK gena u biljni genom, odnosno različite ekspresije *rol* gena. Shen i sar., (1988) smatraju da različiti nivoi ekspresije *rol* gena mogu promeniti odnos endogenih regulatora rasteanja (auksina i citokinina) što se odražava na fenotipski izgled biljaka.

U našem radu trinaest klonova je testirano i prisustvo *rolA*, *rolB* i *rolC* gena je potvrđeno kod svih transformisanih klonova. Razlika između klonova je nađena jedino u prisustvu *aux1* gena koji je potvrđen kod 7 klonova (R1–R5, R7 i C11). Takođe je aktivnost *rolA*, *rolB* i *rolC* gena potvrđeno kod svih ispitivanih klonova, dok je prisustvo *aux1* RNK detektovano samo kod 3 klona (R2, R3 i C11). Slični rezultati o parcijalnoj integraciji T_L- i T_R-DNK su dobijeni u kulturi transformisanih korenova kafe (Alpizar i sar., 2008), kada je pokazano da se *rol* onkogeni sa T_L-DNK fragmenta Ri plazmida integrišu u brojne *hairy roots* klonove kafe, za razliku od T_R-DNK koja se nikada ne integriše.

U našem radu kod klonova kod kojih je bilo zapaženo slabije ili intenzivnije kalusiranje, prisustvo *aux1* gena nije potvrđeno, što je u suprotnosti sa otkrićima nekih autora koji ukazuju na značaj *aux* gena u formiranju kalusirajućih korenova (Moyano i sar., 1999; Mallol i sar., 2001; Mirjalili i sar., 2009). Da bi se objasnile eventualne fenotipske razlike među *hairy roots*, neophodno je analizirati druge faktore, kao što su genotip klijanaca sa kojih su uzeti eksplantati, broj kopija transgena, pozicioni efekat, epigenetski efekat itd. Pošto su *hairy roots* klonovi koji su dobijeni na eksplantatima korenova imali veći potencijal za rast i robusniji izgled od onih dobijenih na eksplantatima listova i kotiledona, moguće je da i tip eksplantata, odnosno tkiva iz koga su indukovani, utiče na osobine transformisanih korenova.

Kontrolni netransformisani korenovi (K) i različiti klonovi transformisanih korenova *C. murale* (R1, R3, R5, C9 i C10) nisu se značajno razlikovali u pogledu histoloških odlika. Fenotipske razlike među korenovima su postojale. Kontrolni korenovi su bili tanki, beli i odlikovao ih je veoma spor rast. Klonovi R1 i R3 su bili debeli, žuti i brzorastući, dok je klon R5 bio kalusirajući, žuto obojen, sa srednjom brzinom rasta. Klonovi C9 i C10 su bili tanki, beličasti i brzorastući. Za uspostavljanje kultura korenova R1, R3 i R5 klonova korišćen je koren kao početni eksplantat, dok su klonovi C9 i C10 imali poreklo od kotiledona. Uprkos gore opisanim razlikama, svi analizirani korenovi su

imali tipičnu organizaciju korenova, što je podrazumevalo jasno diferencirani epidermis, koru i centralni cilindar (Slika 15 i 16). Udaljavajući se od vrha korena, između ćelija kore formirali su se intercelularni prostori. U zreloj zoni korena intercelulari si bili krupni, nepravilnog oblika i neravnomerno raspoređeni. Intercelularni prostori ovog tipa mogli su nastati razmicanjem ili lizom ćelija (Esau, 1965). Ovakva građa kore podsećala je na aerenhim, tkivo biljaka koje je karakteristično za korenove koji rastu u uslovima anaerobije, što može da ukazuje da gajenje korenova submerzno na šejkeru ne omogućuje potpunu aerisanost kultura. Longstreth i Borkhsenius (1999) su proučavajući aerenhimska tkiva tri biljne vrste: *Sagittaria lancifolia*, *Thalia geniculata* i *Pontederia cordata*, pokazali da narušavanje strukture kore korenova, ne dovodi do odumiranja ćelija, jer ćelije zadržavaju intaktne membrane i normalne organele, što nije u skladu sa našim rezultatima, jer je kod nas dolazilo do lize ćelija. Aerenhim omogućava transport kroz simplast između centralnog cilindra i epidermisa.

Park i Facchini (2000) su došli do zaključaka koji su u saglasnosti sa našim, da ne postoji značajna razlika u histološkoj građi netransformisanih i različitih klonova transformisanih korenova (pomoću *A. rhizogenes* R1000) kod dve vrste maka *Papaver somniferum* i *Eschscholzia californica*, što kulturu transformisanih korenova čini dobrim modelom za proučavanje metaboličkih puteva medicinski značajnih jedinjenja ovih biljaka. Za razliku od njih, Budimir i sar. (1998) su utvrdili histološki značajne promene (fascijacije) u strukturi transformisanih korenova *Gentiana lutea* u odnosu na kontrolne korenove. Takođe Webb i sar. (1990) su ukazali na značajne razlike u histološkim odlikama kontrolnih netransformisanih korenova s jedne strane i različitih klonova transformisanih korenova sa druge strane kod *Trifolium repens*, *T. pratense* i *Lotus corniculatus*.

Izolovani korenovi su u našim eksperimentima gajeni submerzno u tečnim hranljivim podlogama, pri čemu je aeracija bila obezbeđena stalnim mešanjem. U ovakvim uslovima, kao i usled odsustva nadzemnih delova biljke korenovi su imali specifične morfološke, fiziološke i biohemijske odlike, koje nisu bile promenjene transformacijom, što opravdava korišćenje našeg model sistema za proučavanje alelopatije.

5.2. Alelopatski efekti fitotoksičnih medijuma na klijanje i rast test biljaka

Radi utvrđivanja alelopatskog efekta transformisanih korenova *Chenopodium murale* u našem radu je ispitivan fitotoksični efekat medijuma u kome su gajeni klonovi transformisanih korenova na klijanje i razvoj klijanaca tri test biljke - arabidopsisa, pšenice i salate. Bez obzira na izvesne nedostatke upotrebe laboratorijskih bioeseja sa test biljkama, kao što je na primer sumnja da ne odražavaju realno stanje u ekosistemu (Inderjit i Keating, 1999), oni su veoma korisni, jer se fokusiraju na najvažniji aspekt alelopatije, a to je detektovanje prisustva alelohemikalija, kao i njihovog dejstva na test biljke, što je bio cilj i naših eksperimenata.

Test biljke koje su do sada najčešće korišćene u alelopatskim ispitivanjima su salata i različite žitarice. Osobine dobrih test biljaka su: laka dostupnost, brzo, kompletno i uniformno klijanje i dobijanje ponovljivih i realnih rezultata. Takođe, test biljke moraju da poseduju veliku senzitivnost na različita hemijska jedinjenja koja na njih deluju. Pennachio i sar. (2005) su sugerisali da je arabidopsis pogodniji objekat za alelopatska istraživanja u odnosu na salatu, jer je senzitivniji na čak 7 ispitivanih alelohemikalija (taničnu kiselinu, juglon, cinamičnu i kafeinsku kiselinu, kumarin, salicilnu kiselinu i 1,8 – cineol) kada se ispituje klijanje semena (procenat klijanja i prosečan period kompletnog klijanja). Izuzetna prednost arabidopsisa je ta što je ceo genom sekvenciran (*The Arabidopsis Genome initiative*, 2000), i takođe, što postoji veliki broj mutanata. Zbog toga smo i mi, pored pšenice i salate izabrali arabidopsis kao još jednu test biljku.

Poznato je da alelohemikalije mogu direktno uticati na mnoštvo fizioloških i biohemijskih procesa, a samim tim i na klijanje semena i rast i razviće biljnih organa klijanaca mnogih test biljaka (Weir i sar., 2004). Kao jedan od poznatijih primera alelopatskog dejstva navodi se efekat *Centaurea maculosa* na 8 test biljaka, među kojima su i arabidopsis i pšenica (Bais i sar., 2002). *C. maculosa* izlučuje (\pm) katehin, a samo ($-$) enantiomer ima fitotoksično dejstvo. Sve ispitivane test biljke su venule nakon dodavanja eksudata korenova *C. maculosa* u podlogu i imale su redukovanu diferencijaciju izdanaka i korenova. Takođe, Parvez i sar. (2004) su ustanovili alelopatski efekat bioflavonoida kvercetina i njegovih 7 derivata na rast izdanaka klijanaca arabidopsisa. Između ostalih,

Tanveer i sar. (2010) su ispitujući dejstvo vodenog ekstrakta različitih delova biljke *Euphorbia helioscopia* na pšenicu, ustanovili znatno smanjenje rasta pšenice, dok je krajnja klijavost semena bila nepromenjena. Fritz i sar. (2007) su utvrdili inhibitoran efekat etanolskog ekstrakta nadzemnih delova biljaka *Hypericum myrianthum* i *H. polyanthemum* na klijanje i rast klijanaca salate: inhibirana je bila dužina radikule uz pojavu nekroze, kao i dužina hipokotila i epikotila.

Što se tiče alelopatskog dejstva *Chenopodium murale*, Qasem (1993) je ustanovio da vodeni ekstrakt izdanaka i korenova *C. murale* inhibira klijanje i rast klijanaca pšenice i ječma. Takođe, El-Khathib i sar. (2004b) su pokazali alelopatsko dejstvo vodenih ekstrakata izdanaka i korenova *C. murale* na klijanje semena i rast klijanaca *Melilotus indicus*, *Trifolium alexandrinum*, *Triticum pyramidal*, *Lycopersicon esculentum* i *Cucumis sativus*, s tim što je procenat inhibicije zavisio od vrste tkiva koje se ekstrahovalo (efekat ekstrakta izdanaka je bio veći u odnosu na ekstrakt korenova) i koncentracije ekstrakta. Prilikom ispitivanja alelopatskog efekta eksudata korenova *C. murale* na rast klijanaca pšenice ustanovljeno je da postoji inhibitoran efekat na masu klijanaca, dužinu izdanaka i dužinu korenova, s tim što je dužina korenova bila više inhibirana u odnosu na dužinu izdanaka (Batish i sar., 2007a).

U našem radu je potvrđen inhibitorni efekat FM netransformisanih i različitih klonova transformisanih korenova *C. murale* na klijanje i rast klijanaca arabidopsisa i pšenice, što je ukazivalo na prisustvo alelohemikalija u BM. Finalno klijanje semena treće test biljke – salate je bilo kompletno inhibirano na svim ispitivanim FM (K, R1, R5, R8 i C10). Goncalves i sar. (2009) su istakli da su manja semena senzitivnija na fitotoksična jedinjenja u odnosu na veća. Međutim, naši rezultati sa semenima arabidopsisa, koja su bila najmanja od svih test biljaka, to ne potvrđuju. Objašnjenje može da se nađe u brojnim radovima koji pokazuju da su alelopatski efekti istih biljnih vrsta različiti na ispitivane test biljke (Cipollini i sar., 2012). Tako su u radu Qasem-a (1993) klijanci ječma bili senzitivniji na alelopatske supstance *C. murale* u odnosu na klijance pšenice, što nam govori da čak i srodne biljke u različitom stepenu reaguju na iste alelohemikalije.

Kada se uporede efekti FM transformisanih korenova *C. murale* na klijanje semena i razvoj klijanaca arabidopsisa i pšenice, uočava se da su klonovi sa najvećim inhibitornim

efektom kod arabidopsisa bili R1 i R8, a kod pšenice R1 i C9. Ovi klonovi su najviše inhibirali dužinu korena i svežu masu klijanaca kod obe test biljke, s tim što su klijanici arabidopsisa bili osetljiviji, tj. kod njih je inhibicija bila veća (Tabela 16, 17). Dužina korenova klijanaca pšenice je bila inhibirana više (prosečna inhibicija za sve ispitivane FM je 50%) u odnosu na dužinu izdanaka (prosečna inhibicija 36%), što je u skladu sa prethodnim rezultatima alelopatskog uticaja eksudata korenova *C. murale* na rast klijanaca pšenice (Qasem, 1993; Batish i sar., 2007a).

U međusobnoj suprotnosti su bili efekti FM K, u kome su gajeni netransformisani, kontrolni korenovi, na klijanje semena arabidopsisa i pšenice. Kod arabidopsisa krajnja klijavost semena je bila inhibirana 100% na FM K, dok je inhibicija FM K na krajnju klijavost semena pšenice bila slabija i iznosila je 24%. S druge strane, krajnja klijavost semena pšenice je bila nešto manje inhibirana u odnosu na dužinu izdanaka, dužinu najdužeg korena i svežu masu klijanaca, što je u skladu sa efektom alelohemikalija poreklom iz *Euphorbia helioscopia* kod pšenice (Tanveer i sar., 2010). Ukoliko se izuzme rezultat za efekat FM K na krajnju klijavost semena arabidopsisa, onda se može zaključiti da transformisani korenovi poseduju daleko veći alelopatski potencijal, što predstavlja prednost u upotrebi ovih korenova za izučavanje mehanizma delovanja alelopatskih supstanci.

Transformisani klonovi dobijeni na eksplantatima korenova (R1 i R8) su pokazali najveći inhibitorni potencijal. Objašnjenje za to može da bude razlika u metabolizmu ćelija korena i drugih delova klijanaca od kojih vode poreklo transformisani korenovi *C. murale*, odnosno u koncentraciji i vrsti izlučenih alelohemikalija. Najveća koncentracija *p*-kumarinske kiseline, potentne alelopatske supstance, detektovana je HPLC analizom u FM ovih klonova (Slika 46).

Ovim rezultatima je potvrđeno da izolovani korenovi *C. murale* izlučuju odgovarajuće metabolite sa alelopatskim svojstvima u svoje neposredno okruženje, pošto su FM osim BM sadržali eksudate netransformisanih i transformisanih korenova. To takođe pokazuje da se produkcija alelopatskih supstanci vrši u samim korenovima. Potvrđena alelopatska priroda eksudata korenova *C. murale* je u skladu sa prethodnim istraživanjima

(Batish i sar. 2007a; b). Dalja istraživanja su neophodna da se utvrdi hemijska priroda alelopatičkih supstanci i mehanizam njihovog delovanja.

5.3. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima kod test biljaka tretiranih fitotoksičnim medijumima

Poznato je da alelohemikalije u biljci na koju deluju izazivaju nekontrolisanu produkciju i akumulaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (*ROS*), aktivirajući ćelijske antioksidacione sisteme (Weir i sar., 2004). Jedan od primera su rezultati Oracz i sar. (2007) koji su ustanovili da ekstrakt suncokreta (*Helianthus annuus*) dovodi do snažne aktivacije antioksidativnih sistema slačice (*Sinapis alba*), ali bez znatnih ćelijskih oštećenja. Ekstrakt suncokreta prouzrokuje oksidativni stres, povećavajući koncentraciju H_2O_2 u klijajućim semenima slačice, pri čemu oni gube vijabilnost zbog povećanja lipidne peroksidacije (Bogatek i Gniazdowska, 2007). Sličan rezultat je dobijen u istraživanjima Bais-a i saradnika (2002) kada je ustanovljeno da (-) – katehin izaziva oksidativan stres, povećavajući koncentraciju *ROS* u korenovima arabidopsisa, što čak dovodi do ćelijske smrti. Takođe, ekstrakt listova i stabla *Callicarpa accuminata* povećava nivo slobodnih radikala, što dovodi do promena u membranama ćelija korenova paradajza (Cruz-Ortega i sar., 2002). Izlaganje korenova krastavca (*Cucumis sativus*) alelopatičkim hemikalijama – ferulinskoj i *p*-kumarinskoj kiselini, povećava nivo H_2O_2 u tkivima i aktivnost POX (Polyticka i sar., 2004), dok ekstrakt korenova krastavca povećava aktivnost CAT, SOD i POX u korenovima krastavca (Yu i sar., 2003).

Analizom aktivnosti antioksidativnih enzima u test biljkama arabidopsisa i pšenice, koji su isključivani tri, odnosno jednu nedelju na FM netransformisanih i transformisanih korenova *C. murale*, pokazano je da FM deluju na antioksidativni sistem ovih biljaka. Praćena je aktivnost CAT, POX i SOD. Povećane aktivnosti navedenih enzima su glavni markeri oksidativnog stresa.

U našem radu relativna ukupna aktivnost CAT kod tretiranih klijanaca arabidopsisa je bila ista ili manja u odnosu na kontrolu. To je u skladu sa istraživanjima Beffagna i Lutzu

(2007), koji su pokazali da do inhibicije katalazne aktivnosti dolazi u kulturi ćelija *Arabidopsis thaliana* koje su bile izlagane dejstvu fitotoksina fuzikokcina.

Što se tiče detekcije pojedinih izoformi CAT u ispitivanim klijancima arabidopsisa, jasno su se eksprimirale 3 izoforme (CAT1, CAT2 i CAT3) kod svih ispitivanih uzoraka (Slika 22). Primenom inhibitora CAT, β -merkaptetanola (β -ME) i aminotriazola (AT), pokazali smo da β -ME inhibira CAT1, a AT CAT2 i CAT3 izoforme (Slika 23). Kod kukuruza β -merkaptetanol je inhibirao mitohondrijalnu, a aminotriazol citosolnu (peroksizomalnu) izoformu CAT (Prasad, 1997).

Drazkiewicz i sar. (2004) su potvrdili da do smanjenja CAT aktivnosti u listovima *A. thaliana* dolazi kada se klijanci izlažu oksidativnom stresu indukovanom Cu, pri čemu je aktivnost POX povećana. I u našem slučaju došlo je do povećanja relativne ukupne aktivnosti POX kod klijanaca arabidopsisa tretiranih FM (Slika 24).

Sposobnost biljaka da prevaziđe oksidativni stres samo delimično zavisi od indukcije SOD aktivnosti, s obzirom na činjenicu da brojni faktori mogu da regulišu dostupnost supstrata za SOD: promene u putevima nastanka ROS, prostorna razdvojenost pojedinih oksidativnih procesa (naelektrisane ROS ne mogu da prolaze kroz ćelijske membrane).

Pretpostavljamo da su alelopatske supstance iz FM uslovile povećanje ROS u tkivima klijanaca arabidopsisa, što je pak uslovilo povećanje aktivnosti SOD (do 2,1 puta; FM klon R1) i POX (do 1,9 puta; FM klon R5). Ova povećanja su u skladu sa zapažanjima Singht i sar. (2006) da alelopatska supstanca α -pinen, kada se primeni u odgovarajućoj koncentraciji (1–5 mM), kod *Cassia occidentalis* uslovljava povećanje aktivnosti SOD oko 2,5 puta i POX oko 2,0 puta. Povećanje aktivnosti SOD je takođe zabeleženo kod krastavca, usled dejstva fenolne alelohemikalije iz eksudata korenova krastavca (Yu i sar., 2003).

U klijancima druge test biljke, pšenice, odvojeno je analizirana aktivnost CAT, POX i SOD u korenovima i izdancima. Za sva tri analizirana enzima aktivnost je bila veća u tretiranim klijancima u odnosu na kontrolu (Slika 26, 27 i 28). Kada se uporede aktivnosti enzima u korenovima i izdancima uočava se da su CAT i SOD imale veću aktivnost u izdancima, a POX u korenovima. Selote i Khanna–Chopra (2010) su pokazali da prilikom

aklimatizacije biljaka pšenice (*Triticum aestivum*) na sušne uslove, u korenovima dolazi do povećanja aktivnosti SOD, POX i CAT. To je u skladu sa našim rezultatima da stresor (FM) dovodi do povećanja aktivnosti navedenih enzima u korenovima i izdancima pšenice. Gore pomenuti istraživači su uspeli da uoče u uzorcima korenova 2 izoforme CAT, 2 izoforme SOD i 5 izoformi POX, dok smo mi u uzorcima korenova tretiranih i netretiranih FM klijanaca uočili čak 8 izoformi CAT, 6 izoformi SOD i 4 izoforme POX. Seckin i sar. (2009) su pokazali da u korenovima pšenice izloženoj povećanoj koncentraciji soli (NaCl) dolazi do povećane aktivnosti SOD i CAT, dok je aktivnost POX smanjena. Sistem za uklanjanje H₂O₂, koji čine askorbat peroksidaza, glutation reduktaza i CAT, ima mnogo veći značaj u toleranciji pšenice na oksidativni stres izazvan sušom, u poređenju sa ulogom koju u ovom procesu ima SOD (Sairam i sar., 1998).

Zaključak je da su arabidopsis i pšenica različito osetljive na različite FM, što je u skladu sa literaturnim podacima (Blokhina i sar., 2003) da različita biljna tkiva iste biljke, a naročito dve različite biljne vrste, aktiviraju različite komponente antioksidativnog sistema i u različitoj meri prilikom dejstva istog stresora (u našem slučaju dominantno su bile aktivirane POX i SOD kod arabidopsisa, i sva tri enzima: CAT, POX i SOD kod pšenice), što je pretpostavljamo u korelaciji sa nastalim ROS u tkivima.

Rezultati dobijeni elektroforezom i spektrofotometrijskom kvantifikacijom aktivnosti antioksidativnih enzima su bili u saglasnosti, tj. postojao je isti trend povećanja i smanjenja relativne aktivnosti zabeležene na gelovima i ukupne aktivnosti određene spektrofotometrijski.

5.4. Određivanje nivoa ekspresije gena regulatora ćelijskog ciklusa kod arabidopsisa i pšenice

Još davno je pretpostavljeno da je regulacija ćelijskog ciklusa potencijalna meta delovanja alelohemikalija (Rice, 1984). Nedavna istraživanja su pokazala da alelohemikalije osim do oksidativnog stresa, dovode i do retardacije ćelijskih deoba (Burgos i sar., 2004; Nishida i sar., 2005; Sanchez–Moreiras i sar., 2008; Zhang i sar., 2010; Soltys i sar., 2011).

U našem radu su istraživane promene nivoa ekspresije dve glavne grupe gena, koje su uključene u regulaciju različitih faza ćelijskog ciklusa, u apeksima korenova i izdanaka klijanaca test biljaka (arabidopsisa i pšenice) nakon delovanja FM transformisanih korenova *C. murale*. To su geni koji kodiraju kinaze zavisne od ciklina (*CDK* geni) i cikline (*CYC* geni).

Kod biljaka su najbolje okarakterisane dve klase *CDK* gena (*CDKA* i *CDKB*). Što se tiče ciklina, kod arabidopsisa se sreću A-, B-, D- i H- familije ciklina.

Interesantno je da su u našem radu homologni geni *CDKA;1* kod arabidopsisa i *CDC2* kod pšenice, kao i *CYCD2;1* kod arabidopsisa i *CYCD2* kod pšenice, pokazivali sličnu promenu profila ekspresije posle tretmana FM, što ukazuje na jedinstveni mehanizam delovanja alelopatskih supstanci kod različitih biljaka.

Mi smo pokazali da FM klon R8 dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije *CDKA;1* i *CYCD4;2* gena, kako u apeksima korenova, tako i u apeksima izdanaka klijanaca arabidopsisa, s tim što je smanjenje bilo veće u korenovima nego u izdancima što je verovatno i rezultiralo nešto većim smanjenjem dužine korenova u odnosu na dužinu lista arabidopsisa.

Ekspresija homolognih *CYCD2;1* gena arabidopsisa i *CYCD2* gena pšenice je smanjena samo u apeksima korenova klijanaca. U apeksima izdanaka klijanaca pšenice je ekspresija *CYCD2* gena bila čak statistički značajno povećana, pa se znatno manja inhibicija rasta izdanaka klijanaca, u odnosu na korenove možda može objasniti nivom ekspresije ovih gena. Pretpostavljamo da je smanjena ekspresija svih ovih gena uslovlila inhibiciju ćelijskih deoba na prvom kontrolnom mestu ćelijskog ciklusa (G1→S). Analiza sadržaja DNK u ćelijama bi nam omogućila potvrdu tačnog mesta delovanja FM u regionu apeksa korenova i izdanaka.

Drugo regulatorno mesto ćelijskog ciklusa (G2→M) je pod kontrolom *CDKB* gena (Joubes i sar., 2000) i *CYCA/B* gena (Mironov i sar., 1999; John i sar., 2001). *CDKB1;1* geni su odgovorni za prelaz G2→M fazu ćelijskog ciklusa arabidopsisa (Bursens i sar., 2000).

Dobijeni rezultati pokazuju statistički značajno smanjenje ekspresije *CDKB1;1* i *CDKB2;2* gena u apeksima korenova i izdanaka tretiranih klijanaca arabidopsisa FM klon

R8, i smanjenje ekspresije *CDKB1;2* i *CDKB2;1* gena samo u apeksima tretiranih izdanaka arabidopsisa. Za razliku od *CDKA* gena, smanjenje ekspresije svih *CDKB* gena je izraženije u izdancima nego u korenovima. Takođe su i geni koji kodiraju cikline A i B (*CYCA3;1* i *CYCB2;4*), a koji se isključivo vezuju za CDK tipa B (van Leene i sar., 2010), imali smanjenu ekspresiju u apeksima korenova i izdanaka klijanaca arabidopsisa, što je verovatno doprinosilo inhibiciji samih ćelijskih deoba i vodilo smanjenju sveže mase klijanaca. *CYCB*, poznat kao maker gen mitoze (Hemerly i sar., 1992; Ferreira i sar., 1994) je pokazivao izrazitu redukciju ekspresije u izdancima (i do 80%) sugerišući da je tranzicija od G2→M bila blokirana i da je mogućnost ćelija da uđu u deobe bila smanjena. Ovo smanjenje je u skladu sa efektom pojedinačnih alelohemikalija na G2→M kontrolno mesto meristema korena klijanaca salate (Sanchez–Moreiras i sar., 2008) i korena krastavca (Zhang i sar., 2010). Slično *CYCB*, ekspresija *CYCA* gena uključenog u kontrolu S→M faze je bila redukovana, samo u manjoj meri (do 60%). Poznato je da je ekspresija ovog gena osetljiva na oksidativni stres (Reichheld i sar., 1999; Ding i sar., 2007), pa je moguće da je i u našem eksperimentalnom sistemu prisustvo *ROS* usled alelopatskog tretmana, uticalo na smanjenu transkripciju ovog gena. Takođe je pokazano da stres uzrokovan solima, kao i elicitorima iz gljiva, reprimira ekspresiju ciklina B tipa (West i sar., 2004; Suzuki i sar., 2006).

Različiti CDK-ciklin kompleksi fosforilišu mnoštvo supstrata koji učestvuju u G1→S, i G2→M tranzicijama, otpočinjući procese DNK replikacije, odnosno mitoze. Ciklini H tipa (*CYCH*) čine regulatornu subjedinicu kompleksa CDKD/*CYCH* (Umeda i sar., 2005). S obzirom da je i ekspresija *CYCH* gena bila inhibirana u apeksima izdanaka klijanaca arabidopsisa tretiranim FM R8, to se direktno odražavalo na aktivnost kompleksa CDKD/*CYCH* koji je još jedna komponenta komplikovane grupe činilaca koji regulišu ćelijski ciklus.

Nivo aktivnosti *CDC2* gena pšenice nakon tretmana je bio značajno smanjen i u apeksima izdanaka i u apeksima kornova klijanaca pšenice. Kada je proučavan efekat vodnog stresa na ćelijske deobe i aktivnost *CDC2* kinaza u listovima pšenice (Schuppler i sar., 1998) pokazano je da umereni vodni stres utiče na ćelijski ciklus u kontrolnoj tački S→G2 i u kasnoj G2→M fazi, što uslovljava smanjeni rast listova pšenice. Autori

pretpostavljaju da vodni stres indukuje signal koji povećava fosforilaciju Tyr na aktivnom mestu CDC2 kinaze, što inaktivira enzima, a to dovodi do inhibicije mitotičkih procesa.

Na osnovu aktivnosti analiziranih gena možemo da pretpostavimo da je ćelijski ciklus i kod arabidopsisa i kod pšenice bio inhibiran FM *C. murale* na nivou oba regulatorna mesta, G1→S i G2→M. Za razliku od nas, Zhang i sar. (2010) su ispitujući efekte vodenog ekstrakta korenova krastavaca u različitim koncentracijama na ekspresiju gena regulatora ćelijskog ciklusa u radikulama krastavca, pokazali inhibiciju ćelijskih deoba na nivou samo drugog regulatornog mesta (G2→M). Pošto je statistički značajna inhibicija ekspresije gena utvrđena za *CDKB*, *CYCA*, *CYCB* s jedne strane, i nije utvrđena za *CDKA* i *CYCD3;1* s druge strane, autori ukazuju da je ćelijska deoba u njihovom slučaju inhibirana na mestu G2→M. S druge strane, hidrofobni eksudat korenova krastavaca je imao efekat na gene ćelijskog ciklusa u radikulama krastavca, na oba regulatorna mesta. Razliku u efektu autori su objasnili različitom hemijskom kompozicijom medijuma. Na osnovu naših rezultata očigledno je da alelohemikalije prisutne u eksudatu *C. murale* deluju na nivou oba kontrolna mesta.

Znanje o molekularnim mehanizmima alelopatije, koje se polako akumulira poslednjih godina, ukazuje da u odgovoru biljke na alelopatsko delovanje učestvuju geni regulatori ćelijskog ciklusa (Zhang i sar., 2010; Soltys i sar., 2011), geni koji regulišu odgovor na stres kombinovan sa antioksidativnom odbranom (Golisz i sar., 2008), kao i geni uključeni u metaboloizam amino kiselina i regulaciju homeostaze metala (Golisz i sar., 2011). Međutim, molekularni mehanizmi delovanja samih alelohemikalija su još uvek nepoznati. Transformisani korenovi *C. murale* mogu da služe kao dobar izvor alelohemikalija za izučavanje mehanizma alelopatije i odbrambenog odgovora biljaka.

5.5. Analiza šećera i fenolnih jedinjenja u fitotoksičnim medijumima i ispitivanje inhibitornog efekta fenolnih kiselina na klijanje semena i rast klijanaca test biljaka

Pošto je utvrđen inhibitoran efekat medijuma u kome su rasli netransformisani korenovi *C. murale*, kao i različiti klonovi transformisanih korenova, na finalno klijanje i rast klijanaca test biljaka, kao i efekat na antioksidativnu aktivnost i ekspresiju gena regulatora ćelijskog ciklusa u meristemima korena i izdanaka tretiranih klijanaca, pristupilo se hemijskoj analizi FM radi utvrđivanja prisustva potencijalnih alelohemikalija. Na analizu fenolnih jedinjenja su nas usmerili literaturni podaci koji kao potencijalne alelohemikalije kod *C. murale* navode fenolne kiseline.

Analizirani su i šećeri u FM, koji se u literaturi ponekad pominju kao alelohemikalije (Goo i sar., 2001), mada daleko češće, kao jedinjenja koja se vezuju za alelohemikalije formirajući neaktivna jedinjenja – glikozide. Visoke koncentracije glukoze i saharoze (0.3 M i više; što odgovara koncentraciji glukoze od 54,05 mg/ml i saharoze 102,70 mg/ml) izazivaju odloženo klijanje i rast klijanaca arabidopsisa (Gibson, 2005). U našem radu HPLC analizom je pokazano prisustvo znatno nižih koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze, (od 0,0 do 30,8 mg/ml), što znači da njihovo prisustvo nije uslovalo inhibiciju klijanja i rasta klijanaca test biljaka.

Fenolna jedinjenja su u literaturi poznati kao inhibitori rasta biljaka. Oni mogu da utiču na ishranu biljaka i fotosintezu (Blum i Gerig, 2005), propustljivost ćelijske membrane (Baziramakenga i sar., 1995), sintezu proteina (Mersie i Singh, 1993), respiraciju (Penuelas i sar., 1996), enzimsku aktivnost (Rama Devi i Prasad, 1992), balans hormona (Holappa i Blum, 1991), vodni potencijal (Booker i sar., 1992), kao i na ekspresiju gena ćelijskog ciklusa (Zhang i sar., 2010).

Od različitih sekundarnih metabolita produkovanih od strane *C. murale*, kao što su alkaloidi, saponini, flavon glikozidi itd., fenolna jedinjenja imaju inhibitorno dejstvo na klijanje semena i razvoj klijanaca pšenice, leblebije i graška (Batish i sar., 2007a; b). Autori su saopštili da eksudati korenova i ostaci biljaka *C. murale* u zemljištu negativno utiču na dužinu i suhu masu klijanaca pšenice, oslobađajući fenole kao potencijalne alelohemikalije.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u rizosferi *C. murale* je iznosio 9.29 µg/g zemljišta (Batish i sar., 2007b). Analizom sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u FM netrtransformisanih i transformisanih korenova *C. murale* utvrđen je od 10 do 27 puta (od 92,5 do 249,7 µg ekv. galne kiseline/ml) veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na njihov sadržaj u zemljištu koji su utvrdili Batish i sar. (2007b). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u FM netrtransformisanih i transformisanih korenova je bio sličan, što ukazuje da što se tiče produkcije ove vrste sekundarnih metabolita, između njih ne postoji značajna razlika, pa se tečna kultura transformisanih korenova može koristiti kao model sistem za izučavanje alelopatije.

U zemljištu sa ostacima korenova *C. murale* Batish i sar. (2007b) su identifikovali 4 fenolne kiseline: ferulinsku, *p*-kumarinsku, vanilinsku i benzoičnu kiselinu, dok su Ghareib i sar. (2010) u acetonskom ekstraktu listova *C. murale* identifikovali 7 fenolnih jedinjenja, među kojima i ferulinsku, *p*-kumarinsku i kafeinsku kiselinu. Prisustvo ove tri fenolne kiseline utvrđeno je HPLC analizom i u FM u kojima su gajeni transformisani korenovi *C. murale*. Koncentracija pojedinih fenolnih kiselina u FM razlikovala se u zavisnosti od klona transformisanog korena koji je u njemu gajen. FM u kome su gajeni kontrolni korenovi razlikovao se od onih u kojima su gajeni transformisani po tome što u njemu nije bila zastupljena *p*-kumarinska kiselina, ali je zato imao visoku koncentraciju kafeinske kiseline (1,91 µmol/l), što je 6 do 7 puta viša koncentracija od onih zabeleženih u FM transformisanih klonova. Izražen inhibitorski efekat FM kontrolnih korenova *C. murale* na klijanje semena arabidopsisa (Slika 18) se možda može objasniti visokim sadržajem kafeinske kiseline u njemu. Na značajan inhibitorski uticaj kafeinske kiseline na klijanje semena arabidopsisa ukazali su i Pennachio i sar. (2005). Ferulinska kiselina, osim u FM u kome su gajeni kontrolni korenovi, bila je identifikovana i u FM 3 (R3, R8 i C9) od 7 ispitanih FM klonova transformisanih korenova. *p*-Kumarinska kiselina koja je, pored ferulinske, u literaturi poznata kao supstanca sa jakim alelohemijskim dejstvom (Lodhi i sar., 1987; Batish i sar., 2007b) identifikovana je u FM svih klonova transformisanih korenova. FM klonova R1, R5 i R8, koji su pokazivali najveći inhibitorski potencijal na klijanje i razvoj klijanaca test biljaka, upravo su sadržali najveće koncentracije

p-kumarinske kiseline, a posebno klon R1 sa izrazitim inhibitornim potencijalom prema arabidopsisu i pšenici (Tabela 23, 24 i 25; Slika 49, 50 i 51).

Alelopatski potencijal fenolnih kiselina na klijanje i rast klijanaca različitih biljnih vrsta saopšten je ranije u mnogobrojnim radovima (Lodhi i sar., 1987; Kuiters, 1989; Caspersen i sar., 1999; Sasikumar i sar., 2002; Batish i sar., 2007b; Li i sar., 2010). Da fenolne kiseline detektovane u FM poseduju alelopatsko dejstvo potvrđeno je i u eksperimentima u kojima je određivan inhibitorni uticaj kafeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline ili njihovih binarnih ili tercijskih smeša na klijanje i razvoj klijanaca arabidopsisa, pšenice i salate. Najjači alelopatski efekat na sve tri test biljke imale su *p*-kumarinska i ferulinska kiselina ili njihova binarna smeša, dok je značajan alelopatski efekat kafeinske kiseline utvrđen samo kod arabidopsisa, što se slaže sa rezultatom koji je dobijen primenom FM kontrolnog korena koji je sadržao visok nivo upravo ove kiseline, o čemu je bilo reči u prethodnom pasusu. Po istraživanjima Duke i sar. (1983) relativna efikasnost ove tri fenolne kiseline, na inhibiciju klijanja semena salate, je bila takva da je *p*-kumarinska kiselina imala najjače, ferulinska srednje, a kafeinska najmanje dejstvo, što je uglavnom u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni u našim eksperimentima. Takođe, u saglasnosti sa ranijim saopštenjima (Kuiters, 1989; Wu i Guo, 1997) dužina korenova je bila najviše inhibirana kod tretiranih klijanaca sve tri biljne vrste. Međutim, da bi izazvale efekat sličan onom koji je izazvao FM, fenolne kiseline su morale biti primenjene u daleko većim koncentracijama, čak 1000 puta i više, u zavisnosti od test biljke, od onih koje su utvrđene u FM. U tom slučaju nivo inhibicije klijanja i rasta klijanaca pšenice i arabidopsisa je bio uporediv sa nivoom inhibicije koji je izazvan FM. Razlika u alelopatskom potencijalu FM i fenolnih kiselina je bila najizraženija kod salate kod koje su FM potpuno inhibirali klijanje.

Ove razlike u alelopatskoj aktivnosti FM i čistih fenolnih kiselina, kao i odsustvo jasne sinergističke aktivnosti fenolnih kiselina kada su primenjene u binarnim i tercijskim smešama, na šta je u poslednje vreme ukazao i Blum (2011), suprotno nekim ranijim saopštenjima da sinergističko dejstvo između fenolnih kiselina postoji (Frank i sar., 1978; Rasmussen i Einhellig, 1979), ukazuju da fenolne kiseline izgleda imaju ograničenu ulogu u alelopatskom potencijalu korenova *C. murale*. Da fenolne kiseline, kako se do tada

obično smatralo, nisu bile ključne supstance za alelopatski efekat eksudata korenova pirinča, već da je to momilakton B, ukazali su sledeći autori: Kato–Noguchi i Ino (2005), Kato–Noguchi i sar. (2008) i Kato–Noguchi i sar., (2010). Slično tome, alelopatsko svojstvo transformisanih korenova *C. murale* može se pripisati nekim drugim supstancama. Kako *C. murale* sadrži mnoštvo različitih jedinjenja, nije isključeno da ona mogu međusobno interagovati i doprineti opštem alelopatskom efektu. Zbog toga, da bi se u potpunosti rasvetlila alelopatska priroda i mehanizam dejstva alelohemikalija iz korenova *C. murale*, neophodno je sprovesti dalja istraživanja primenom metoda tečne ili gasne hromatografije (LC ili GC), masene spektrometrije (MS) ili nuklearno-magnetne rezonance (NMR) koje omogućavaju detekciju i identifikaciju svih sekundarnih metabolita (*non targeted metabolomic analysis*), a zatim je neophodno sprovesti dalja istraživanja molekula od posebnog interesa (*targeted analysis*). *Hairy root* klonovi sa najvećim inhibitornim potencijalom, kao što su R1 i R8, bili bi naročito pogodan materijal za ova istraživanja.

ZAKLJUČCI

Osnovni zaključci istraživanja izvedenih u okviru ovog rada bili su:

- ❖ Pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS uspešno su dobijeni transformisani korenovi *Chenopodium murale* L. i uspostavljena je njihova permanentna kultura. Transformacija je potvrđena PCR, RT-PCR i histochemijskom (GUS) analizom. Prisustvo *rolA*, *rolB*, *rolC* i *uidA* gena je potvrđeno u svim transformisanim klonovima (13), dok je gen *auxI* detektovan kod 7 klonova (R1–R5, R7 i C11). Od svih ispitivanih eksplantata (korenova, kotiledona, listova i internodija), eksplantati korenova su imali najveću efikasnost transformacije (11,1 %).
- ❖ Optimalan rast transformisanih korenova postignut je na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja (BM). Prirast sveže mase transformisanih korenova je bio od 16 (klon L13) do 359 puta (klon R2) veći u poređenju sa netransformisanim kontrolnim klonovima. Klonovi poreklom od eksplantata korenova R2, R4 i R8 imali su veoma brz rast. Na osnovu prečnika korenova izdvojene su dve grupe klonova (sa tankim klonovima – do 1mm u prečniku i sa debelim klonovima – više od 1 mm u prečniku). Svi klonovi koji su dobijeni na eksplantatima korenova, izuzev klona R7, su bili znatno deblji od onih dobijenih na eksplantatima kotiledona i listova. Skoro svi transformisani klonovi, za razliku od netransformisanih, formirali su bočnekorenove, a njihova gustina zavisila je od klona.
- ❖ Histološka građa transformisanih korenova *C. murale* je bila slična građi netransformisanih korenova, dok su se na citološkom nivou uočavale razlike u ćelijama kore kod pojedinih klonova: C9 i C10 – plazmolizirane ćelije sa izrazito tamnim sadržajem u vakuolama i citoplazmi; R1, R3 i R5 – crno obojene strukture u ćelijama kore.

- ❖ Potvrđeno je alelopatsko dejstvo fitotoksičnih medijuma u kojima su rasli transformisani korenovi *C. murale*, na klijanje i rast klijanaca test biljaka – arabidopsisa, pšenice i salate. Salata se pokazala kao najosetljivija test biljka, jer je inhibicija klijanja bila 100 % na svim ispitivanim fitotoksičnim medijumima. Kod druge dve test biljke najviše su bili inhibirani: dužina korena i sveža masa tretiranih klijanaca.
- ❖ Detekcijom i kvantifikacijom antioksidativnih enzima utvrđeno je da fitotoksični medijumi izazivaju oksidativni stres kod klijanaca arabidopsisa i pšenice. Najveće efekte na aktivnosti CAT, POX i SOD kod arabidopsisa imali su FM klonova R1 i R5, a kod pšenice FM klonova K i R8, što nas dovodi do zaključka da se osetljivost klijanaca na određeni FM razlikovala u zavisnosti od biljne vrste. Broj izoformi kod kontrolnih i tretiranih klijanaca arabidopsisa je bio isti za sva tri ispitivana enzima (za CAT i SOD je iznosio 3, a za POX 4). Kod tretiranih klijanaca pšenice se uočavao isti ili veći broj izoformi CAT, POX i SOD u odnosu na kontrolne klijance.
- ❖ Ekspresija gena ćelijskog ciklusa (*CDK* i *CYC*) u apeksima korenova i izdanaka klijanaca arabidopsisa i pšenice tretiranih fitotoksičnim medijumom *C. murale* je uglavnom bila smanjena, što ukazuje na smanjenje i prestanak ćelijskih deoba, a samim tim dovodi i do poremećaja u rastu test biljaka. Interesantno je da su homologni geni *CDKA;1* kod arabidopsisa i *CDC2* kod pšenice, kao i *CYCD2;1* kod arabidopsisa i *CYCD2* kod pšenice, pokazivali sličan profil smanjenja ekspresije, što ukazuje na jedinstveni mehanizam delovanja alelopatskih supstanci kod različitih biljaka.
- ❖ Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u fitotoksičnim medijumima netransformisanih i transformisanih korenova je bio sličan. HPLC analizom identifikovane su tri dominantne fenolne kiseline kao potencijalne alelohemikalije: kafeinska, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina, zastupljene u mikromolarnim koncentracijama.

- ❖ Efekat fenolnih kiselina na klijanje i rast test biljaka je bio sličan efektu fitotoksičnih medijuma, ali je za postizanje približno jednakog efekta bila neophodna oko 1000 puta veća koncentracija čistih supstanci, zbog čega se pretpostavlja da alelopatsko svojstvo fitotoksičnih medijuma ne potiče samo od fenolnih kiselina, već se možda može pripisati i nekim drugim, za sada nepoznatim, alelohemikalijama i njihovim interakcijama.

- ❖ Kultura transformisanih korenova *C. murale* predstavlja pogodan model sistem za izučavanje alelopatskih reakcija *in vitro*.

- ❖ Dobijeni fitotoksični medijumi *C. murale* se mogu koristiti kao potencijalni bioherbicidi.

LITERATURA

Abraham D., Braguini W.L., Kelmer–Bracht A.M., Ishii–Iwamoto E.L. (2000): Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology* 26: 611–24.

Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121 – 126.

Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohammed A., Malhotra P., Bhathagar R.K., Mukherjee S.K. (2003): RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 657 – 685.

Ahmad B., Jan Q., Bashir S., Choudhary M.I., Nisar M. (2003): Phytochemical evaluation of *Chenopodium murale* L. *Asian Journal of Plant Sciences* 2: 1072–1078.

Ahmad A.G., Elmazar M.M.A. (1997): Isolation of hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytotherapy Research* 11: 564 – 567.

Akiyoshi K., Etsuko M., Saori E., Shinkichi K., Kazuya Y., Atsuhiko S., Hiroyasu E. (2003): Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate, increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiology* 132: 1177 – 1185.

Alanis A.D., Calzada F., Cervantes J.A., Torres J., Ceballos J.M. (2005): Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicines for the treatment of gastrointestinal disorder. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 153 – 157.

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

Alpizar E., Dechamp E., Espeout S., Lecouls A.C., Nicole M., Bertrand B., Lashermes P., Etienne H. (2006): Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*–transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports* 25: 959 – 967.

Azlan G.J., Marziah M., Radzali M., Johari R. (2002): Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69 (3): 271 – 278.

Amselem J., Tepfer M. (1992): Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber. *Plant Molecular Biology* 19: 421 – 432.

Anaya A.L., Pelayo–Benavides H.R. (1997): Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L., (*Nyctaginaceae*): effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy* 4: 57–68.

Andersen S.U., Buechel S., Zhao Z., Ljung K., Novak O., Busch W., Schuster C., Lohmann J.U. (2008): Requirement of B2–type Cyclin–Dependent Kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 88 – 100.

Asada K. (1999): The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601 – 639.

Asada K. (1994): Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. Eds: Baker N.R., Bowyer J.R. *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. Bios Scientific Publishers, Oxford 129 – 142.

Asada K., Takahashi M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. Eds. Kyle D.J, Osmond C.B., Arntzen C.J. *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam 228 – 287.

Asada K., Kanematsu S., Okaka S., Hayakawa T. (1980): Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase. Eds. Bannister J.V., Hill A.O. Elsevier, North–Holland, New York: 136.

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. (2006): The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233 – 266.

Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M. (2004): How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9: 26–32.

Bais H.P., Park S.W., Stermitz F.R., Halligan K.M., Vivanco J.M. (2003a): Exudation of fluorescent beta-carbolines from *Oxalis tuberosa* L. roots. *Phytochemistry* 61: 539 – 543.

Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J.M. (2003b): Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377–1380.

Bais H.P., Walker T.S., Stermitz F.R., Hufbauer R.A., Vivanco J.M. (2002): Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128: 1173 – 1179.

Bais H.P., Loyola-Vargas V.M., Flores H.E., Vivanco J.M. (2001): Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 730 – 741.

Bandyopadhyay M., Jha S., Tepfer D. (2007): Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Reports* 26: 599 – 609.

Baron C., Zambryski P.C. (1995): The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual Review of Genetics* 29: 107 – 129.

Barroco R.M., Poucke K.V., Bergervoet J.H.W., Veylder L.D., Groot S.P.C., Inzé D., Engler G. (2005): The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiology* 137: 127 – 140.

Batish D.R., Lavanya K., Pal Singh H., Kohli R.K. (2007b): Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. *Plant Growth Regulation* 51: 119 – 28.

Batish D.R., Lavanya K., Pal Singh H., Kohli R.K. (2007a): Root-mediated allelopathic interference of nettleleaved goosefoot (*Chenopodium murale*) on wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Agronomy and Crop science* 193: 37 – 44.

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

Batley N.H., Blackbourn H. D. (1993): The control of exocytosis in plant cells. *New Phytologist* 125: 307 – 308.

Baziramakenga R., Leroux G. D., Simard R. R. (1995): Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology* 21(9): 1271 – 1285.

Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276 – 287.

Beemster G.T.S., Fiorani F., Inze D. (2003): Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* 8: 154 – 158.

Beffagna N., Lutz I. (2007): Inhibition of catalase activity as an early response of *Arabidopsis thaliana* cultured cells to the phytotoxin fusaric acid. *Journal of Experimental Botany* 58 (15/16): 4183 – 4194.

Beijerinck M.W., van Delden A. (1902): Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch *Bakterien*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II* (1902) 9:2 – 42.

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

Beyer W.F., Fridovich I. (1987): Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161(2): 559 – 566.

Bindoli A. (1988): Lipid peroxidation in mitochondria. *Free radical Biology and medicine* 5: 247 – 261.

Binns A., Campbell A. (2001): *Agrobacterium tumefaciens* –mediated transformation of plant cells. in Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, UK, 1 – 6.

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany* 91: 179 – 194.

Blum U. (2011): Plant–Plant Allelopathic Interactions. Springer. London – New York

Blum U., Gerig T.M. (2005): Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology*. 31 (8): 1907 – 1932.

Bogatek R., Gniazdowska A. (2007): ROS and phytohormones in plant–plant allelopathic interaction. *Plant Signaling and Behavior* 2 (4): 317 – 318.

Bomhoff G.W., Klapwijk P.M., Kester H.C.M., Schilperoort R.A., Hernalsteens J.P., Schell J. (1976): Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* 145: 177 – 181.

Bonhomme V., Laurain–Mattar D., Fliniaux M.A. (2000): Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *Journal of natural Products* 63: 1249 – 52.

Booker F.L., Blum U., Fiscus E.L. (1992): Short–term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. *Journal of Experimental Botany* 43: 649 – 655.

Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., C.L. Jansen, P. Wertheim van Dillen, van der Noordaa J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495 – 503.

Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principal of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 24 – 54.

Bridges S.M., Salin M.L. (1981): Distribution of iron–containing superoxide dismutases in vascular plants. *Plant Physiology* 68: 275 – 278.

Budimir S., Janošević D., Momčilović I., Grubišić D. (1998): Morphology and anatomy of *Gentiana lutea* hairy roots. *Archives of Biological Sciences* 50: 99 – 104.

Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Tchernoded G.K., Bulgakov D.V., Aminin D.L., Zhuravlev Y.N. (2012): The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiology* 158 (3): 1371 – 1381.

Bulgakov V.P. (2008): Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances* 26: 318 – 24.

Bulgakov V.P., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Kiselev K.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2005): Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta* 221: 471 – 478.

Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Shkryl Y.N., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2004): The *rolB* and *rolC* genes activate synthesis of anthraquinones in *Rubia cordifolia* cells by mechanism independent of octadecanoid signaling pathway. *Plant Science* 166: 1069 – 1075.

Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Shkryl Y.N., Glazunov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2003): Effects of Ca²⁺ channel blockers and protein kinase/phosphatase inhibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* cultures transformed by the *rolB* and *rolC* genes. *Planta* 217: 349 – 355.

Bulgakov V.P., Khodakovskaya M.V., Labetskaya N.V., Chernoded G.K., Zhuravlev Y.N. (1998): The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry* 49: 1929 – 34.

Burgos N.R., Talbert R.E., Kim K.S., Kuk Y.I. (2004): Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology* 30: 671 – 689.

Burssens S., Himanen K., Cotte B.V., Beeckman T., Montagu M.V., Inze D., Verbruggen N. (2000): Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 632 – 640.

Calzada F., Yopez–Mulia L., Aguilar A. (2006): *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 108: 367 – 370.

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

Caspersen S., Sundin P., Munro M., Adalsteinsson S., Hooker J.E., Jensen P. (1999): Interactive effects of lettuce (*Lactuca sativa* L.), irradiance, and ferulic acid in axenic, hydroponic culture. *Plant and Soil* 210: 115 – 126.

Cassells A.C., Curry R.F. (2001): Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 145 – 167.

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

Chevalier C., Yamaguchi J., Mc Court P. (1992): Nucleotide sequence of a cDNA for catalase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 99: 1726 – 1728.

Christey M.C. (2001): Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 37: 687 – 700.

Cipollini K., Titus K., Wagner, C. (2012): Allelopathic effects of invasive species (*Alliaria petiolata*, *Lonicera maackii*, *Ranunculus ficaria*) in the Midwestern United States. *Allelopathy Journal* 29 (1): 63 – 76.

Colasanti J., Cho S.O., Wick S., Sundaresan V. (1993): Localization of the functional p34cdc2 homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: Association with predicted division sites. *Plant Cell* 5: 1101 – 1111.

Cooke D.E., Webb K.J. (1997): Stability of CaMV 35S-gus gene expression in (Bird's foot trefoil) hairy root cultures under different growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 163 – 168.

Cruz-Ortega R., Ayala-Cordero G., Anaya A.L. (2002): Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum* 116: 20 – 27.

Daayf F., Lattanzio V. (2008): Recent Advances in Polyphenol Research. Wiley, New Jersey, 416.

Dat J., Vandenabeele J., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779 – 795.

Datta S.C., Ghosh K.N. (1987): Allelopathy in two species of *Chenopodium*, inhibition of germination and seedling growth of certain weeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 56: 257 – 70.

Devies K.J.A. (1987): Protein damage and degradation by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry* 262: 9895 – 9901.

Dewitte W., Murray J.A.H. (2003): The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54: 235 – 264.

Ding J., Sun Y., Xiao C.L., Shi K., Zhou Y.H., Yu J.Q. (2007): Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany* 58: 3765 – 3773.

Dmitrović S., Mitić N., Zdravković–Korać S., Vinterhalter B., Ninković S., Čulafić Lj. (2010): Hairy roots formation in recalcitrant–to–transform plant *Chenopodium rubrum*. *Biologia Plantarum* 54 (3): 566 – 570.

Donahue A.R.J., Cramer C.L. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224 – 233.

Drazkiewicz M., Skorzynska–Polit E., Krupa Z. (2004): Copper–induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17: 379 – 387.

Drumm H., Schopfer P. (1974): Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. A reinvestigation. *Planta* 120: 13 – 30.

Duke S.O., Dayan F.F., Rimando A.M. (1998): Natural products as tools for weed management. *Proceedings of Japan Weed Science*. 1 – 11.

Duke S.O., Williams R.D., Markhart A.H. (1983): Interaction of moisture stress and three phenolic compounds on lettuce seed germination. *Annals of Botany* 52: 923 – 926.

Einhellig F.A. (1995): Mechanisms of action of allelochemicals in allelopathy. In *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*, Ed. Inderjit, KMM Dakshini, FA Einhellig, 96. Washington, DC: Am. Chem. Soc.

Einhellig F.A., Rasmussen J.A. (1978): Synergistic effects of vanillic and *p*–hydroxybenzoic acids on radish and grain sorghum. *Journal of Chemical Ecology* 4 (4): 425 – 436.

El-Khatib A.A., Hegazy A.K., Galal H.K. (2004b): Does allelopathy have a role in the ecology of *Chenopodium murale*? *Annales Botanici Fennici* 41: 37 – 45.

El-Khatib A.A., Hegazy A.K., Galal H.K. (2004a): Allelopathy in the rhizosphere and amended soil of *Chenopodium murale* L. *Weed Biology and Management* 4: 35 – 42.

Esau. K. (1965). *Plant Anatomy* (Second Edition). Wiley. J. & Sons, Inc., New York, London, Sidney.

Estruch J.J., Chriqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A. (1991b): The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO Journal* 10: 2889 – 95.

Estruch J.J., Schell J., Spena A. (1991a): The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO Journal* 10: 3125 – 3128.

Faiss M., Strnad M., Redig P., Doležal K., Hanuš J., Van Onckelen H., Schmulling T. (1996): Chemically induced expression of the *rolC*-encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. *Plant Journal* 10: 33 – 46.

Feldman A.W., Hanks R.W. (1968): Phenolic content in the roots and leaves of tolerant and susceptible citrus cultivars attacked by *Radopholus similis*. *Phytochemistry* 7: 5 – 12.

Ferreira P.C.G., Hemerly A.S., Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G., Inze D. (1994): Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* 6: 1763 – 1774.

Filippini F., Rossi R., Marin O., Trovato M., Costantino P., Downey P.M., schiavo F.L., terzi M. (1996): A plant oncogene as a phosphatase. *Nature* 379: 499 – 500.

Foyer C.H., Noctor G. (2003): Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355 – 364.

Fridovich I. (1998): Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201: 1203 – 1209.

Fridovich I. (1986): Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247: 1203 – 1209.

Fritz D., Bernardi A.P., Haas J.S., Bruna M. Ascoli B.M., Sergio Augusto de Loreto Bordignon S.A.L., von Poser G. (2007): Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthemum* extracts on *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17 (1): 44 – 48.

Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L., McClunh C.R. (1996): Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 112: 327 – 336.

Galindo J.C.G., Hernandez A., Dayan F.E., Tellez F.A., Macias R.N., Paul S.O. (1999): Duke, dehydrozaluzanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochemistry* 52: 805 – 13.

Galston A.W., Bonnichsen R.K., Arnon D.I. (1951): The preparation of highly purified spinach leaf catalase. *Acta Chemica Scandinavica* 5: 781 – 790.

Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F., Dommes J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263 – 285.

Gaspar T.H., Penel C.L., Thorpe T., Grappin H. (1982): Chemistry and biochemistry of peroxidases. In: Peroxidases, a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Eds. Gaspar, T.H., Penel, C.L., Thorpe, T., Grappin, H., University the Geneve Press, Geneva, 10 – 60.

Gelvin S. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 223 – 256.

Ghareib H.R.A., Abdelhamed M.S., Ibrachim O.A. (2010): Antioxidative effects of acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. *Biology and Management* 10: 64 – 72.

Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977): Superoxide dismutases. *Plant Physiology* 59: 309 – 314.

Gibson S.I. (2005): Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 93 – 102.

Gill S.S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909 – 930.

Giri A., Ravindra S.T., Dhingra V., Narasu M.L. (2001): Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science* 81: 378 – 382.

Golisz A., Sugano M., Hiradate S., Fujii Y. (2011): Microarray analysis of *Arabidopsis* plants in response to allelochemical L-DOPA. *Planta*. 233: 231 – 240.

Golisz A., Sugano M., Fujii Y. (2008): Microarray expression profiling of *Arabidopsis thaliana* L. in response to allelochemicals identified in buckwheat. *Journal of Experimental Botany* 59 (11): 3099 – 3109.

Goncalves S., Ferraz M., Romano A. (2009): Phytotoxic properties of *Drosophyllum lusitanicum* leaf extracts and its main compound plumbagin. *Scientia Horticulturae* 122: 96 – 101.

Goo G.C., Choi S.T., Ahn H.G., Song K.S. (2001): Growth promotion of rice seedlings by allelopathic polysaccharide from Welsh onion. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65 (6): 1296 – 1301.

Grlić Lj. (1986): Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec Zagreb, 102 – 105.

Guern J., Renaudin J.P., Brown S.C. (1987): The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Ed. F. Constabel, I.K. Vasil. 43 Academic Press, San Diego, CA.

Guivarch A., Boccara M., Prouteau M., Chriqui D. (1999): Instability of phenotype and gene expression in long-term culture of carrot hairy root clones. *Plant Cell Reports* 19: 43 – 50.

Hardie D.G. (1999): Plant protein serine/threonine kinases: Classification and functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 97 – 131.

Havir E.A., McHale N.A. (1987): Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450 – 455.

Hemerly A.S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G., Inze D. (1993): *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5: 1711 – 1723.

Hemerly A., Bergounioux C., van Montagu M., Inze D., Ferreira P. (1992): Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1589: 3295 – 3299.

Hirt H., Mink M., Pfosser M., Bogre L., Gyorgyey J., Jonak C., Gartner A., Dudits D., Heberle-Bors E. (1992): Alfaalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs. *Plant Cell* 4: 1531 – 1538.

Holappa L.D., Blum U. (1991): Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compound, on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber, and bean. *Journal of Chemical Ecology* 17: 865 – 886.

Holm L., Doll J., Holm E., Pancho J., Herberger J. (1997): *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. New York: John Wiley and Sons Inc.

Huystee, V. R. B. (1987): Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthesis studies. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 205 – 219.

Huystee V.R.B., Carins W.L. (1982): Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Photo Chemistry* 21: 1843 – 1847.

Ibrahim L.F., Kawashty S.A., Baiuomy A.R., Shabana M.M., El-Eraky W.I., El-Negoumy S.I. (2007): A comparative study of the flavonoids and some biological activities of two *Chenopodium* species. *Chemistry of Natural Compounds* 43: 22 – 25.

Inderjit K.M.M.D., Keating K. I. (1999): Allelopathy: principles, procedures, processes, and promises for biological control. *Advances in Agronomy* 67: 141 – 231.

Inze D., De Veylder L. (2006): Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 40: 77 – 105.

Ishizaki T., Hoshino Y., Masuda K., Oosawa K. (2002): Explants of Ri-transformed hairy roots of spinach can develop embryogenic calli in the absence of gibberellic acid, an essential growth regulator for induction of embryogenesis from nontransformed roots. *Plant Science*. 163: 223 – 231.

Jacobs T.W. (1995): Cell cycle control. *Annual Review of Plant Physiology*. 46: 317 – 339.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901 – 3907.

Jimenez A., Gomez J.M., Navarro E., Sevilla F. (2002): Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 515 – 520.

John P.C.L., Mews M., Moore R. (2001): Cyclin/CDK complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma* 216: 119 – 142.

John P.C.L. (1996): The plant cell cycle: conserved and unique features in mitotic control. *Progress in Cell Cycle Research* 2: 59 – 72.

Josifović M., Stjepanović L., Janković M., Gajić M., Kojić M., Diklić N. (1972): Flora SR Srbije, M.Ed., SANU, Beograd, 3: 10, 14 – 15, 26 – 28.

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

Joubes J., Chevalier C., Dudits D., Heberle-Bors E., Inze D., Umeda M., Renaudin J.P. (2000): CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 607 – 620.

Kamal A.H.M., Kim K.H., Shin D.H., Seo H.S., Shin K.H., Park C.S., Heo H.Y., Woo S.H. (2009): Profile of pre-harvest sprouting wheat by using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Plant Omics Journal* 2: 110 – 119.

Kang H.J., Anbazhagan V.R., You X.L., Moon H.K., Yi J.S. Choi Y.E. (2006): Production of transgenic *Aralia elata* regenerated from *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformed roots. *Plant Cell Tissue and Organ culture* 85: 187 – 196.

Kato-Noguchi H., Hasegawa M., Ino T., Ota K., Kujime H. (2010): Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology* 167 (10): 787 – 91.

Kato-Noguchi H., Ino T., Ota K. (2008): Secretion of momilactone A from rice roots to the rhizosphere. *Journal of Plant Physiology* 165 (7): 691 – 696.

Kato–Noguchi H, Ino T. (2005): Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology* 162 (6): 718 – 21.

Kifle S., Shao M., Jung C., Cai D. (1999): An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports* 18: 514 – 519.

Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2007): The *rolB* gene–induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology* 128: 681 – 92.

Kiselev K.V., Kusaykin M.I., Dubrovina A.S., Bezverbny D.A., Zvyagintseva T.N., Bulgakov V.P. (2006): The *rolC* gene induces expression of a pathogenesis–related β –1,3–glucanase in transformed ginseng cells. *Phytochemistry* 67: 2225 – 31.

Kliebenstein D.J., Monde R., Last R.L. (1998): Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118: 637 – 650.

Komari T. (1990): Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports* 9: 303 – 306.

Krolicka A., Staniszewska I., Bielawski K., Malinski E., Szafranek J., Lojkowska E. (2001): Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Science* 160 (2), 259 – 264.

Kruse M., Dtrandberg M., Strandberg B. (2000): Ecological Effects of Allelopathic Plants – A Review. National Environment Institute – NERI. Technical Report No. 315. Silkeborg, Denmark 16 – 34.

Kuiters, A.T. (1989): Effects of phenolic acid on germination and early growth of herbaceous woodland plant. *Journal of Chemical Ecology*. 15: 467 – 479.

Kumar V., Satyanarayana K.V., Sarala Itty S., Indu E.P., Giridhar P., Chandrashekar A., Ravishankar G.A. (2006): Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy–root phenotype. *Plant Cell Reports* 2006 25 (3): 214 –222.

Li Z.H., Wang Q., Ruan X., Pan C.D., Jiang D.A. (2010): Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15: 8933 – 8952.

Lodhi M.A.K., Bilal R., Malik K.A. (1987): Allelopathy in agroecosystems, wheat phytotoxicity and its possible roles in crop rotation. *Journal of Chemical Ecology* 13: 1881 – 1891.

Longstreth D.J., Borkhsenius O.N. (1999): Root cell ultrastructure in developing aerenchyma tissue of three wetland species. *Annals of Botany* 86 (3): 641 – 646.

Machačková I., Krekule J., Eder J., Seidlova F., Strnad M. (1993): Cytokinins in photoperiodic of flowering in *Chenopodium* species. *Physiologia Plantarum* 87: 160 – 166.

Mallol A., Cusido R.M., Palazon J., Bonfill M., Morales C., Pinol M.T. (2001): Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57: 365 – 71.

Marschner H. (1995): Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. London: Academic.

Menges M., Samland A.K., Planchais S., Murray J.A.H. (2006): The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 893 – 906.

Mersie W., Singh M. (1993): Phenolic acids affect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. *Journal of Chemical Ecology*. 19: 1293 – 1301.

Meyer A.D., Tempe J., Costantino P. (2000): Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In G Stacy, NT Keen, Ed, Plant Microbe Interactions. APS Press, St. Paul, MN, 93 – 139.

Michalski W.P. (1996): Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Journal of Chromatography* 684: 59 – 75.

Milošević S., Simonović A., Cingel A., Jevremović S., Todorović S., Filipović B., Subotić A. (2012): Response of antioxidative enzymes to long-term Tomato spotted wilt virus infection and virus elimination by meristem-tip culture in two *Impatiens* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 79 – 88.

Mirjalili H.M., Fakhr-Tabatabaei S.M., Bonfill M., Alizadeh H., Cusido R.M., Ghassempour A., Ghassempour A., Palazon J. (2009): Morphology and withanolide production of *Withania coagulans* hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences* 9: 197 – 204.

Mironov V., De Veylder L., Van M., Inze D. (1999): Cyclin dependent kinases and cell division in plants – the nexus. *Plant Cell* 11: 509 – 522.

Mitrović A., Živanović B., Čulafić Lj. (2003): Effect of darkness on growth and flowering of *Chenopodium rubrum* and *C. murale* plants *in vitro*. *Biologia Plantarum* 46 (3): 471 – 474.

Mitrović A., Živanović B., Čulafić Lj. (2000b): The effects of growth regulators on flowering of *Chenopodium murale* plants *in vitro*. *Biologia Plantarum* 43 (3): 451 – 454.

Mitrović A., Živanović B., Čulafić Lj. (2000a): The effects of photoperiod, glucose and gibberellic acid on growth *in vitro* and flowering of *Chenopodium murale*. *Biologia Plantarum* 43 (2): 173 – 177.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004): The reactive oxygen gene network in plants. *Trends in Plant Science* 9: 490 – 498.

Moller I.M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561 – 591.

Moyano E., Fornale J., Palazon J., Cusido R.M., Bonfill M., Morales C., Pinol M.T. (1999): Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants: *Phytochemistry* 52: 1287 – 92.

Momčilović I., Grubišić D., M., Nešković M. (2001): Transgenic *Gentiana* species (Gentian) In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.): *Biotechnology in agriculture and forestry. Transgenic crops III*, Vol. 48, Springer-Verlag, 123 – 138.

Momčilović I., Grubišić D., Kojić M.O., Nesković M. (1997): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and plant regeneration of four *Gentiana* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50 (1): 1– 6.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473 – 497.

Murray H.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321 – 4325.

Neumann G., Romheld V. (1999): Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211: 121 – 30.

Newman T., de Bruijn F., Green P., Keegstra K., Kende H., McIntosh L., Ohlrogge J., Raikhel N., Somerville S., Thomashow M., Retzel E., Somerville C. (1994): Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiology* 106: 1241 – 1255.

Ni W., Trelease R.N., Eising R. (1990): Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. *Biochemical Journal* 269: 233 – 238.

Niemeyer H. M., Perez F. J. (1995): Potential of hydroxamic acids in the control of cereal pests, diseases and weeds. Allelopathy. Organisms, Processes and Applications, ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington. Eds. Inderjit K. M., Dakshini M., Einhellig F. A. 260 – 270.

Nikolić R., Mitić N., Ninković S., Miljuš-Đukić J., Nešković M. (2003/2004): Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. and growth of transformed plants in field. *Biologia Plantarum* 47 (1): 137 – 140.

Nilsen E., Orcutt D.M. (1996): The physiology of plants under stress – abiotic factors. John Wiley and Sons, Inc, New York, 689.

Nilsson O., Olsson O. (1997): Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum* 100: 463 – 473.

Nilsson O., Little C.H.A., Sandberg G., Olsson O. (1996b): Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy. *Plant Molecular Biology* 31: 887 – 895.

Nilsson O., Moritz T., Sundberg B., Sandberg G., Olsson O. (1996a): Expression of the *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiology* 112: 493 – 502.

Nishida N., Tamotsu S., Nagata N., Saito C., Sakai A. (2005): Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1187 – 1203.

Noctor G., Foyer C. (1998): Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 623 – 647.

Ono N.N., Tian L. (2011): The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Science* 180: 439 – 446.

Oracz K., Bailly C., Gniazdowska A., Come D., Corbineau F., Bogatek R. (2007): Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology* 33: 251– 264.

Ota Y., Ario T., Hayashi K., Nakagawa T., Hattori T., Maeshima M., Asahi T. (1992): Tissue-specific isoforms of catalase subunits in castor bean seedlings. *Plant Cell Physiology* 33: 225 – 232.

Otter T., Polle A. (1994): The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiology* 35: 1231 – 1238.

Palazon J., Cusido R.M., Roig C., Pinol M.T. (1997): Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 155 – 62.

Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (2002): Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplast. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 549 – 559.

Park S.U., Facchini P.J. (2000): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany* 51 (347): 1005 – 1016.

Park S.H., Pinson S.R.M., Smith R.H. (1996): T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Molecular Biology* 32: 1135 – 1198.

Parvez M.M., Tomita–Yokatani K., Fujii Y., Konishi T., Iwashina T. (2004): Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 631 – 635.

Pawlak S, Firych A, Rymer K, Deckert J. (2009): Cu, Zn–superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 741 – 747.

Pennachio M., Jefferson L.V., Havens K. (2005): *Arabidopsis thaliana*: a new test species for phytotoxic bioassays. *Journal of Chemical Ecology* 31 (8): 1877 – 1885.

Penuelas J., Ribas–Carbo M., Giles L. (1996): Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 801 – 805.

Pines J. (1995): Cyclins and cyclin–dependent kinases: abiochemical view. *Biochemical Journal* 388: 697 – 711.

Politycka B., Kozłowska M., Mielcarz B. (2004): Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. *Allelopathy Journal* 13: 29 - 36.

Politycka I. (1996): Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids. *Acta Physiologiae Plantarum* 18: 365 – 70.

Porwal M.K., Gupta O.P. (1986): Allelopathic influence of winter weeds on germination and growth of wheat. *International Journal of Tropical Agricultural* 4: 276 – 279.

Prasad T.K. (1997): Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre–emergence maize seedlings. *Plant Physiology* 114: 1369 – 1376.

Qasem J.R. (1995): Allelopathic effect of *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium murale* on vegetable crops. *Allelopathy Journal* 2: 49 – 66.

Qasem J. R. (1993). Allelopathic effect of nettle leaved goosefoot (*Chenopodium murale*) on wheat and barley. *Dirasat* 20B (1): 80 – 94.

Qasem J.R. (1990): Aqueous extracts of nettle–leaved goosefoot (*Chenopodium murale* L.) on wheat and barley. *Research Journal of Aleppo University (Agricultural Science Series)* 14: 37 – 53.

Rama Devi S., Prasad M. N. V. (1992): Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. *Journal of Chemical Ecology* 18 (11): 1981 – 1990.

Rahnama H., Ebrahimzadeh H. (2006): Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Science, Islamic Republic of Iran* 17 (3): 225 – 230.

Rashid H., Chaudhry Z., Khan M.H. (2011): Effect of explant plant source and acetosyringone concentration on transformation efficiency of wheat cultivars. *African Journal of Biotechnology* 10 (44): 8737 – 8740.

Reichheld J.P., Vernoux T., Lardon F., Van Montagu M., Inze D. (1999): Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant Journal* 17: 647 – 655.

Renaudin J.P., Doonan J.H., Freeman D., Hashimoto J., Hirt H., Inzé D., Jacobs T., Kouchi H., Rouze P., Sauter M., Savouré A., Sorrell D.A., Sundaresan V., Murray J.A.H. (1996): Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organisation. *Plant Molecular Biology* 32: 1003 – 1018.

Rice E.L. (1984): Allelopathy. 2nd ed. Academic, New York.

Rigden D., Carneiro M. A. (1999): Structural model for the *rolA* protein and its interaction with DNA. *Proteins* 37: 697 – 708.

Robards K., Prenzer P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry* 66: 401 – 436.

Romero-Romero T., Sanchez-Nieto S., San Juan-Badillo A., Anaya A.L., Cruz-Ortega R. (2005): Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. (*Solanaceae*). *Plant Science* 168: 1059 – 66.

Roth K. A. (2002): In situ detection of apoptotic neurons, in: Apoptosis Techniques and Protocols, Vol. 37 (LeBlanc A. C., ed.), 205 – 224. Humana Press, Totowa, NJ.

Rymen B., Fiorani F., Kartal F., Vandepoele K., Inzé D., Beemster G.T.S. (2007): Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology* 143: 1429 – 1438.

Sairam R., Deshmukh P., Saxena D. C. (1998): Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum* 41: 387 – 394.

Salin M. L., Bridges S.M. (1981): Chemiluminescence in wounded root tissue. Evidence for peroxidase involvement. *Plant Physiology* 67: 43–46.

Sanchez–Moreiras A.M., De La Pena T.C., Reigosa M.J. (2008): The natural compound benzoxazolin–2(3H)–one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry* 69: 2172 – 2179.

Sasikumar K., Vijayalakshmi C., Parthiban K.T. (2002): Allelopathic effects of eucalyptus on blackgram (*Phaseolus mungo* L.). *Allelopathy Journal* 9: 205 – 214.

Savić–Pavićević D., Matić G. (2011): Molekularna biologija 1. NNK–International, Beograd.

Schlos P., Walter C., Mader M. (1987): Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotina tabacum* L. *Planta* 170: 225 – 229.

Schmidt J.F., Moore M.D., Pelcher L.E., Covello P.S. (2007): High efficiency *Agrobacterium rhizogenes*–mediated transformation of *Saponaria vaccaria* L. (*Caryophyllaceae*) using fluorescence selection. *Plant Cell Reports* 26: 1547 – 1554.

Schuppler U., He P.H., John P.C.L., Munns R. (1998). Effect of water stress on cell division and cell–division–cycle 2–like cell–cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* 117: 667 – 678.

Seckin B., Sekmen A.H., Turkan I. (2009): An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in root of wheat under salt stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 12 – 20.

Selote D.S., Khanna–Chopra R. (2010): Antioxidant response of wheat roots to drought acclimation. *Protoplasma* 245: 153 – 163.

Sgherri, C., Stevanović, B., Navari–Izzo, F. (2004): Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 122: 478 – 485.

Shen W.H., Petit A., Guern J., Tempé J. (1988): Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 85: 3417 – 3421.

Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2008): Individual and combined effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 118 – 25.

Sicker D., Schneider B., Hennig L., Knop M., Schulz M. (2001): Glycoside carbamates from benzoxazolin-2(3H)-one detoxification in extracts and exudates of corn roots. *Phytochemistry* 58: 819 – 25.

Simonović A. (2011): Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka. NNK–International, Beograd.

Singh H.P., Batish D.R., Kaur S., Arora K., Kohli R.K. (2006): α –Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany* 98: 1261 – 1269.

Sinkar V.P., Pythoud F., White F.F., Nester E.W., Gordon M.P. (1988): *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants. *Genes and Development* 2 (6): 688 – 697.

Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. (2008): Strategies for engineering stress tolerance. In: *Plant Biotechnology. The genetic manipulations of plants*. Oxford University Press, Oxford, UK, 212 – 236.

Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. (2004): *Plant Biotechnology. The Genetic Manipulation of Plants*. Oxford University Press, New York, 35 – 52.

Slightom, J.L., Durand–Tardif, M., Jouanin, L., Tepfer, D. (1986) Nucleotide sequence analysis of TL–DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open reading frames. *Journal of Biological Chemistry* 261: 108 – 121.

Soltys D., Rudzinska–Langwald A., kurek W., Gniazdowska A., Sliwinska E., Bogatek R. (2011): Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta* 234: 609 – 621.

Suzuki N., Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Mittler R. (2006): Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiology* 139: 1313 – 1322.

Spena A., Schmulling T., Koncz C., Schell J. (1987): Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO Journal* 6: 3891 – 3899.

Stals H., Casteels P., Van Montagu M., Inze D. (2000): Regulation of cyclin – dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 43: 583 – 593.

Takahama U., Hirotsu M., Oniki T. (1999): Age–dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tabaco leaves: mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant Cell Physiology* 40: 716–724.

Tanaka N., Yamakawa M., Yamashita I. (1998): Characterization of transcription of genes involved in hairy root induction on pRi1724 core–T–DNA in two *Ajuga reptans* hairy root lines. *Plant Science* 137: 95 – 105.

Taneja J., Jaggi M., Wankhede D.P., Sinha A.K. (2010): Effect of loss of T–DNA genes on MIA biosynthetic pathway gene regulation and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Reports* 29 (10): 1119 – 1129.

Tanveer A., Rehman A., Javaid M.M., Abbas R.N., Sibtain M., Ahmad A.U.I.H., Ibin–I–Zamir M.S., Chaudary K.M., Aziz A. (2010): Allelopathic potential of *Euphorbia helioscopia* L. against wheat (*Triticum aestivum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.). *The Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 34: 75 – 81.

Tepfer M., Casse–Delbart F. (1987): *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Science* 4: 24 – 28.

Tepfer D. (1983): The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In: Pühler, A. (Ed.) *Molecular genetics of the bacteria–plant interaction*. Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg, 248 – 258.

Thimmaraju R., Venkatachalam L., Bhagyalakshmi N. (2008): Morphometric and biochemical characterization of red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots obtained after single and double transformations. *Plant Cell Reports* 27: 1039 – 1052.

Tian M., Gu Q., Zhu M. (2003): The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Science* 165 (4): 701 – 707.

Tiwari R.K., Trivedi M., Guang Z.C., Guo G.Q., Zheng G.C. (2008): *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots. *Biologia Plantarum* 52: 26 – 35.

Tiwari R.K., Trivedi M., Guang Z.C., Guo G.Q., Zheng G.C. (2007): Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports* 26: 199 – 210.

Tolbert N. E. (1980): *The biochemistry of plants*; Tolbert N. E. (ed.) Academic press: New York 1: 359 – 388.

Torres A., Olivia R.M., castellano D., Cross P. (1996): Proceedings of the First World Congress on Allelopathy: A Science of the Future (SAI) university cadiz Spring cadiz, 278.

Triplett B.A., Moss S.C., Bland J.M., Dowd M.K. (2008): Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 44: 508 – 517.

Trovato M., Maras B., Linhares F., Costantino P. (2001): The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 13449 – 13453.

Umeda M., Shimotohno A., Yamaguchi M. (2005): Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant Cell Physiology* 46: 1437 – 1442.

Uren N.C. (2000): Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. In *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Interface*, Ed. R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri, 19 – 40. New York: Marcel

Van Leene J., Hollunder J., Eeckhout D., Persiau G., Van De Slijke E., Stals H., Van Isterdael G., Verkest A., Neiryneck S., Buffel Y., De Bodt S., Maere S., Laukens K., Pharazyn A., Ferreira P.C., Eloy N., Renne C., Meyer C., Faure J.D., Steinbrenner J., Beynon J., Larkin J.C., Van de Peer Y., Hilson P., Kuiper M., De Veylder L., Van Onckelen H., Inze D., Witters E., De Jaeger G. (2010): Targeted interactomics reveals a

complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 6 (397): 1 – 10.

Van Leeuwen W., Ruttink T., Borst–Vrenssen A.W.M., van der Plas L.H.W., van der Krol, A.R. (2001): Characterization of position–induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany* 52 (358): 949 – 959.

Veena V., Taylor C.G. (2007): *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43: 383 – 403.

Veljović–Jovanović, S., Kukavica, B., Stevanović, B., Navari–Izzo, F. (2006): Senescence– and drought–related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany* 57 (8): 1759 – 1768.

Vervliet G., Holsters M., Teuchy H., van Montagu M., Schell J. (1975): Characterization of different plaque–forming and defective temperature phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology* 26: 33 – 48.

Vinterhalter B., Orbović V., Vinterhalter D. (1999): Transgenic root cultures of *Gentiana punctata* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68 (4): 275 – 280.

Vranova E., Inze D., Van Breusegem F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227 – 1236.

Wang H., Zhou Y., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L.C. (2000): Expression of the plant cyclin – dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant Journal* 24: 613 – 623.

Wang H., Fowke L.C., Crosby W.L. (1997): A plant cyclin – dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 386: 451– 452.

Watson B., Currier T.C., Gordo, M.D., Chilton M.D., Nester E.W. (1975): Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of Bacteriology* 123: 255 – 264.

Webb K.J., Jones S., Robbins M.P., Minchin F.R. (1990): Characterisation of transgenic root cultures of *Trifolium repens*, *Trifolium pretense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus comiculatus*. *Plant Science* 70: 243–254.

Weir T.L., Park S.W., Vivanco J.M. (2004): Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 472 – 479.

Welinder K.G., Gajhede M. (1992): Structure and evolution of peroxidases. In: *Plant peroxidases. Biochemistry and physiology*. Eds. Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, C., Greppin, H., Rochat–Baumann, Inprimerie Nationale, Geneva, 35 – 42.

West G., Inze D., Beemster G.T.S. (2004): Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiology* 135: 1050 – 1058.

White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. (1985): Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 164: 33 – 44.

Wiame I., Remy S., Swennen R., Sagi L. (2000): Irreversible heat inactivation of DNaseI without RNA degradation. *BioTechniques* 29: 252 – 256.

Williamson J.D., Scandalios J.G. (1993): Response of the maize catalases and superoxide dismutases to cercosporin-containing fungal extracts: the pattern of catalase response in scutella is stage specific. *Physiologia Plantarum* 88: 159–166.

Williamson G.B. (1990): Allelopathy, Koch's postulates and neck riddles. In *Perspectives in Plant Competition*, Ed. J.B. Grace, D. Tilman, 143–62. London: Academic.

Willekens H., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995): Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207 – 228.

Barondeau D.P., Kassmann C.J., Bruns C.K., Tainer J.A., Getzoff E.D. (2004): Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* 43 (25): 8038 – 8047.

Wu L., Guo X. (1997): Effects on root and shoot growth of *Poa annua* L. seedlings of phenolic acid detected in water extracts of *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Englem. Clippings. (1997): *International Turfgrass Society Research Journal* 8: 1075 – 1085.

Yazaki K., Tanaka S., Matsuoka H., Sato F. (1998): Stable transformation of *Lithospermum erythrorhizon* with *Agrobacterium rhizogenes* and shikonin production of the transformants. *Plant Cell Reports* 18: 214 – 219.

Yu J.Q., Ye S.F., Zhang M.F., Hu W.H. (2003): Effects of root exudates, aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical and Systematics Ecology* 32: 129 – 139.

Zdravković–Korać S., Muhovski Y., Druart P., Čalić D.D., Radojević L.R. (2004): *Agrobacterium rhizogenes*–mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum* L. and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Reports* 22 (9): 698 – 704.

Zhang Y., Gu M., Shi K., Zhou Y.H., Jing Quan Yu J.Q. (2010): Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle–related genes in cucumber radicles. *Plant Soil* 327: 455 – 463.

Zhao J., Davis L., Verpoorte R. (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283 – 333.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Slavica S. Dmitrović (rođ. Milivojević) rođena je 22. 8. 1975. godine u Somboru. Osnovnu školu završila je u Bačkom Monoštoru, a gimnaziju u Somboru. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1994. godine na studijskoj grupi Biologija. Diplomirala je u januaru 2000. godine i stekla zvanje diplomiranog biologa. Magistar bioloških nauka je postala u decembru 2003. godine uspešno odbranivši magistarsku tezu pod naslovom „Morfogeneza kratkodnevne biljke *Chenopodium rubrum* L. i dugodnevne biljke *Chenopodium murale* L. *in vitro*“ pod mentorstvom profesorke dr Ljubinke Čulafić, i pod neposrednim rukovodstvom u laboratoriji od strane mr Aleksandre Mitrović i dr Branke Živanović.

Mr Slavica Dmitrović je zaposlena od maja 2000. godine kao asistent–pripravnik na Katedri za fiziologiju biljaka, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. U maju 2003. godine postaje istraživač– pripravnik na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, a od 2004. godine radi kao istraživač–saradnik na istom mestu.

Trenutno je mr Slavica Dmitrović angažovana na nacionalnom projektu „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“ (ON173024) i na međunarodnom projektu „Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds“ (Grant Agreement No. 227448) FP7. U prethodnom periodu mr Slavica Dmitrović je bila angažovana na još dva nacionalna projekta: "Vegetativno i generativno razmnožavanje *in vitro*, ugroženih biljnih vrsta, u cilju *ex situ* zaštite i produkcije sekundarnih metabolita" (2002–2005), kao i "Svetlosna i hormonalna kontrola rastenja i razvića biljaka, razmnožavanje *in vitro* i *ex situ* zaštita retkih i ugroženih vrsta" (2006–2010).

Mr Slavica Dmitrović je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Srpskog biološkog društva i The Federation of European Societies of Plant Biology.