

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana B. Tubić

**MORFOGENEZA I REGENERACIJA
BILJAKA ŠALOTA (*Allium ascalonicum*
L.) I VLAŠCA (*A. schoenoprasum* L.) *in*
*vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ljiljana B. Tubić

***In vitro* MORPHOGENESIS AND PLANT
REGENERATION IN SHALLOT (*Allium
ascalonicum* L.) AND CHIVE (*A.
schoenoprasum* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

dr Snežana Zdravković Korać, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

dr Jelena Savić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Član komisije:

dr Aneta Sabovljević, vandređni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Datum odbrane:

Za mog tatu

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru Projekta 173015 „Biotehnologija in vitro – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Želim da izrazim iskrenu zahvalnost dr Snežani Zdravković Korać na nesebično pruženom znanju, uloženom trudu, pravovremenim smernicama u radu, podršci, razumevanju, strpljenju i vremenu koje mi je posvetila tokom izrade ove disertacije.

Dr Jeleni Savić zahvaljujem na svemu što me je naučila o enzimima antioksidativnog sistema, kao i na korisnim savetima i stručnoj pomoći prilikom pisanja ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Aneti Sabovljević na stručnim savetima i sugestijama koji su doprineli kvalitetu ovog rada, kao i na značajnoj podršci i angažovanju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu tokom realizacije ove disertacije.

Dr Branki Vinterhalter, rukovodiocu projekta 173015, zahvaljujem na poverenju i ukazanoj mogućnosti da se bavim interesantnim istraživanjima.

Prof. dr Zlatku Gibi, uz čija zanimljiva predavanja sam otkrila čudesan svet fiziologije biljaka, zahvaljujem na poverenju i pruženoj šansi da postanem student doktorskih studija.

Zahvaljujem dr Snežani Budimir i prof. dr Dušici Janošević na realizaciji histoloških analiza, kao i na tumačenju dobijenih rezultata.

Dr Neveni Mitić zahvaljujem za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti regeneracije biljaka vlašca in vitro.

Zahvaljujem dr Jeleni Milojević na uspešnoj saradnji prilikom rešavanja svih zadataka koje smo zajedno dobijale od našeg mentora.

Dr Branki Uzelac zahvaljujem na nesebičnoj pomoći prilikom završnog uobličavanja rezimea ovog rada.

Prof. dr Ružici Igić i prof. dr Goranu Anačkovu sa Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu želim da zahvalim na ustupljenim semenima šalota.

Zahvaljujem Nabilu Ghalawenji na pomoći prilikom aklimatizacije biljaka.

Zahvaljujem svim kolegamicama i kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka na kolegijalnosti, brojnim savetima, podršci i prijatnoj radnoj atmosferi.

Hvala i kolegama sa Odeljenja za molekularnu biologiju Dr Mirjani Mihailović, dr Svetlani Dinić, dr Neveni Grdović, dr Aleksandri Uskoković, dr Jeleni Arambašić Jovanović i dr Meliti Vidaković uz čiju izuzetnu podršku i brojne korisne savete svaki problem postaje rešiv.

Kolegi Urošu Živkoviću zahvaljujem pre svega na iskrenom prijateljstvu, a zatim i na podršci, savetima i pomoći tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem svim prijateljima na podršci, razumevanju i širenju sjajne atmosfere.

Mojoj majci, sestri i zetu dugujem posebnu zahvalnost što su uvek bili uz mene na putu do cilja. Hvala mojim najdražim sestrićima Katarini i Nicolasu što su na jedan izuzetan način obeležili ovaj rad.

„Ne sanjamo svi jednako i to nikome ne smeta.

A zašto svima smetamo kad smo drugačije budni?“

Miroslav Mika Antić (1932-1986)

Morfogeneza i regeneracija biljaka šalota (*Allium ascalonicum* L.) i vlašca (*A. schoenoprasum* L.) *in vitro*

REZIME

Šalot (*Allium ascalonicum* L.) i vlašac (*A. schoenoprasum* L.) pripadaju lukovima roda *Allium*, koji predstavlja jedan od najbrojnijih rodova među monokotilama. Ove ekonomski značajne biljne vrste se koriste u kulinarstvu širom sveta, zbog svog specifičnog mirisa, ukusa i dokazane antioksidativne aktivnosti. U procesima unapređivanja nutritivnih vrednosti i poboljšanja prinosa korišćenjem savremenih biotehnoloških metoda neophodan preduslov je efikasan i pouzdan protokol za regeneraciju *in vitro*. Pošto takve procedure za regeneraciju *in vitro* kod šalota i vlašca nisu bile dostupne, osnovni cilj ove disertacije je bio razvijanje efikasnih protokola za indukciju regeneracije pupoljaka/somatskih embriona kod ovih biljnih vrsta.

Regeneracija pupoljaka/somatskih embriona je indukovana iz odsečaka korenova šalota i vlašca. Kod obe biljne vrste samo je apikalni deo korena imao regenerativni potencijal pod testiranim eksperimentalnim uslovima, ali se regeneracija odvijala različitim procesima: indirektnom kaulogenezom kod šalota i indirektnom somatskom embriogenezom kod vlašca. Snažan uticaj genotipa na regenerativni potencijal je uočen kod obe biljne vrste. Regenerativni potencijal je testiran na 30 nasumično izabranih linija šalota. Liniju su činili regeneranti dobijeni iz apikalnih odsečaka korenova biljke koja se razvila iz jednog klijanca. Među testiranim linijama je uočena visoka varijabilnost učestalosti regeneracije (0,93-100%) i prosečnog broja pupoljaka po eksplantatu (0,01-20,67). Linija 6 je pokazala najveći kaulogeni i rizogeni potencijal, kao i najbrži regenerativni odgovor. Koristeći apikalne odsečke korenova regenerisanih biljaka linije 6 kao izvor eksplantata, izvršena je optimizacija uslova za indukciju regeneracije. Svetlost, odnos 2,4-dihlorfenoksisirćetne kiseline (2,4-D) i 6-benziladenina (BA) u podlozi i trajanje faze indukcije kalusa su statistički značajno uticali na kaulogeni potencijal ove linije. Optimalna procedura za regeneraciju pupoljaka iz apikalnih odsečaka korenova šalota se sastojala iz pet nedelja kultivacije eksplantata na podlozi za indukciju kalusa sa 5 μ M 2,4-D i 5 μ M BA, zatim osam nedelja na podlozi za indukciju regeneracije sa 5 μ M BA u prisustvu svetlosti i pri

gustini fluksa od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom obe faze. Primenom ovog protokola kod linije 6 za 13 nedelja je postignuta učestalost regeneracije od 100%, sa prosečno 18,4 pupoljaka po eksplantatu. Protokol optimizovan za liniju 6 je zatim primenjen na odsečke korenova osam linija sa različitim regenerativnim potencijalom, da bi se utvrdilo da li se njihov regenerativni potencijal može poboljšati. Primena ovog optimizovanog protokola dovela je do značajnog povećanja regenerativnog potencijala jedinki linija sa niskim regenerativnim potencijalom, ali je on i dalje ostao statistički značajno niži nego kod jedinki linije 6, što potvrđuje snažan uticaj genotipa na proces kaulogeneze.

Kod vlašca, linija 3 se izdvojila po superiornom regenerativnom potencijalu, pa su odsečki korenova *in vitro* regenerisanih biljaka ove linije korišćeni kao izvor eksplantata. Za indukciju embriogenog kalusa iz apikalnih odsečaka korenova vlašca neophodno je bilo prisustvo 2,4-D i citokinina. Najveći embriogeni potencijal ovih eksplantata je postignut kada je kalus indukovano na podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D i $10 \mu\text{M}$ BA ili tidiazuronom (TDZ). Dobijeni somatski embrioni su se umnožili i razvili apikalni pupoljak na podlozi sa kinetinom (Kin), ali im je za razviće korenovog sistema bila neophodna kultivacija na podlozi bez regulatora rasteanja. Uprkos tome što je proces indukcije somatske embriogeneze i razviće somatskih embriona vlašca bio relativno efikasan, proces regeneracije iz apikalnih odsečaka korenova vlašca je bio suviše dugotrajan proces (24 nedelje), pa je razvijena efikasna procedura za indukciju direktne kaulogeneze iz bazalnih odsečaka linije 3. Od šest testiranih citokinina (BA, Kin, zeatina, *meta*-topolina, N-(2-hloro-4-piridil)-N'-feniluree i TDZ), predstavnika svih strukturnih grupa, $10 \mu\text{M}$ TDZ je bio najefikasniji u indukciji kaulogeneze, ali su regenerisane biljke imale inferiorne morfološke karakteristike. Kako su eksplantati gajeni na podlozi sa $5 \mu\text{M}$ Kin pokazali najbolje morfološke parametre, ovaj tretman je bio uključen u proceduru regeneracije. Stoga, optimizovana procedura podrazumevala je kultivaciju bazalnih odsečaka debljine 5 mm na podlozi sa $10 \mu\text{M}$ TDZ tokom četiri nedelje, a zatim na podlozi sa $5 \mu\text{M}$ Kin tokom još četiri nedelje. Koristeći optimizovani protokol, postignuta je učestalost regeneracije od 100% sa prosečno 16,9 pupoljaka po eksplantatu. Dobijene biljke sa dobro razvijenim korenovim sistemom su već posle osam nedelja bile spremne za aklimatizaciju.

Histološkom studijom je utvrđeno da su adventivni pupoljci regenerisali iz bazalnih delova listova i iz meristemoida formiranih iz površinskih slojeva bazalne ploče vlašca. Baš u ovom regionu eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM TDZ detektovano je prisustvo H_2O_2 . Pored toga, detektovane su brže promene i viši nivo aktivnosti antioksidativnih enzima (peroksidaza, katalaza i superoksid-dismutaza) u eksplantatima gajenim na podlozi sa 10 μM TDZ u odnosu na eksplantate gajene na podlozi sa 1 μM Kin, koji su imali najniži regenerativni potencijal u ovom eksperimentu. Specifična izoforma peroksidaze je uočena samo u eksplantatima izloženim dejstvu 10 μM TDZ posle trećeg dana od početka tretmana i njena pojava je koincidirala sa povećanjem aktivnosti ukupnih peroksidaza u ovim eksplantatima. Rezultati ukazuju na značajnu ulogu oksidativnog stresa u pokretanju procesa morfogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca.

Ključne reči: adventivni pupoljci, *Allium ascalonicum*, *A. schoenoprasum*, antioksidativni enzimi, apikalni odsecci korenova, bazalna ploča, citokinini, kaulogeneza, regulatori rasteња, somatska embriogeneza

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj: 581.4:[635.263+635.265](043.3)

***In vitro* morphogenesis and plant regeneration in shallot (*Allium ascalonicum* L.) and chive (*A. schoenoprasum* L.)**

ABSTRACT

Shallot (*Allium ascalonicum* L.) and chive (*A. schoenoprasum* L.) belong to the genus *Allium*, which represents one of the largest genera of the monocotyledonous plants. These economically important plant species have been used worldwide as culinary herbs due to their specific odor, taste and proven potent antioxidative capacity. Crop improvement using modern biotechnological approaches requires an efficient and reliable protocol for *in vitro* plant regeneration. Since no such protocols for *in vitro* regeneration of shallot and chive had been available, the main objective of this dissertation was to develop efficient protocols for the induction of bud/somatic embryo regeneration in these plant species.

Regeneration of shoots/somatic embryos was induced from root sections of shallot and chive. In both species, only the root-tip sections had the regeneration capacity under the experimental conditions tested, but the regeneration proceeded via different pathways: indirect caulogenesis in shallot and indirect somatic embryogenesis in chive. The strong influence of genotype on regeneration capacity was observed in both species. The regeneration capacity was tested in 30 randomly chosen lines of shallot. A line constitutes the root-tip-derived regenerants originating from a single seed-derived plant. High variability in the frequency of regeneration (0.93-100%) and the mean bud number per explant (0.01-20.67) was observed among these lines. Among them, line 6 exhibited both the highest caulogenic and rizogenic capacity, and the fastest regeneration response. Using the root-tip-derived *in vitro* regenerated plants of line 6 as an explant source, the regeneration procedure was further optimized. Light intensity, the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)/6-benzyladenine (BA) ratio in callus induction medium and the duration of the callus induction phase significantly affected the caulogenic capacity of this line. Thus, the optimized protocol included a 5-week-long cultivation of the explants on callus induction medium supplemented with 5 μM 2,4-D and 5 μM BA followed by an 8-week-long cultivation on regeneration induction medium containing 5 μM BA, under light with a photosynthetic photon flux density of 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ during both phases. Using this protocol, a 100% frequency of

regeneration and 18.4 buds per explant were attained in line 6 after 13 weeks of treatment. The protocol optimized for line 6 was applied to the root-tips of eight lines selected for their variable regeneration responses, to see if their regeneration capacities could be increased. The application of the optimized protocol enhanced the regeneration capacity in lines with the inferior tissue culture response, but their regeneration capacities were still considerably lower compared to line 6, thus confirming the strong influence of genotype on caulogenesis.

In chive, line 3 exhibited the superior regeneration capacity, so the root-tip-derived *in vitro* regenerated plants of this line were used as an explant source. 2,4-D and cytokinin were indispensable for the induction of embryogenic callus from the apical root sections of chive. The highest embryogenic capacity of the explants was achieved when the calli were induced on medium containing 5 μ M 2,4-D and 10 μ M BA or thidiazuron (TDZ). Obtained somatic embryos multiplied and developed the shoot apex on medium supplemented with kinetin (Kin), but for development of the root system cultivation on plant growth regulator-free medium was necessary. Despite somatic embryos induction and their subsequent development were quite efficient, the process of regeneration from chive apical root section was too time-consuming (lasting for 24 weeks), hence a more efficient protocol for induction of direct caulogenesis from the basal sections of line 3 plants was developed. Of six tested cytokinins (BA, Kin, zeatin, *meta*-topoline, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea and TDZ), representatives of all cytokinin structural groups, 10 μ M TDZ was the most efficient for the induction of caulogenesis, but the morphological parameters of the regenerated plants were inferior. As the explants cultivated on 5 μ M Kin-supplemented medium showed the best morphological performances, this treatment was included in the regeneration procedure. Therefore, an optimized procedure involved a 4-week cultivation of 5 mm-thick basal sections on 10 μ M TDZ-supplemented medium followed by cultivation on 5 μ M Kin-supplemented medium for additional 4 weeks. Using the optimized procedure, the frequency of regeneration of 100% and a mean number of 16.9 buds per explant were obtained. The obtained plants with well-developed root system were capable of acclimatization in only 8 weeks.

Histological analyses revealed that adventitious buds regenerated from the leaf sheath bases and meristemoids formed on the surface of the basal plate of chive plants. In this exact region of the 10 μ M TDZ-treated explants the presence of accumulated H_2O_2 was detected. In addition, the activity of antioxidative enzymes (peroxidases, catalases and superoxide dismutases) in 10 μ M TDZ-treated explants was higher and was changing more rapidly than in 1 μ M Kin-treated explants that showed the lowest regeneration capacity. A unique peroxidase isoform was observed only in TDZ-treated explants on the 3rd day of the treatment and its appearance has coincided with an increase in the activity of total peroxidases in these explants. The results suggest an important role of oxidative stress in induction of morphogenesis from the basal sections of chive plants.

Keywords: adventive buds, *Allium ascalonicum*, *A. schoenoprasum*, antioxidative enzyme, apical root sections, basal plate, cytokinins, caulogenesis, growth regulators, somatic embryogenesis

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 581.4:[635.263+635.265](043.3)

SADRŽAJ

SKRAĆENICE

1. UVOD	1
1.1. Morfogeneza <i>in vitro</i>	1
1.1.1. Organogeneza	2
1.1.1.1. Mehanizam indukcije organogeneze	3
1.1.1.2. Formiranje apikalnog meristema izdanka	5
1.1.1.3. Polarni transport i uspostavljanje gradijenta auksina	6
1.1.1.4. Molekularni mehanizam indukcije SAM	8
1.1.2. Somatska embriogeneza	12
1.1.2.1. Geni uključeni u sticanje embriogenog potencijala i proces somatske embriogeneze	14
1.1.2.2. Proteini kao markeri somatske embriogeneze	15
1.1.2.3. Mehanizam indukcije somatske embriogeneze	16
1.2. Citokinini	18
1.3. Oksidativni stres	21
1.3.1. Odbrambeni mehanizmi biljaka	23
1.3.2. Uticaj ROS na rastenje i razviće biljnih organizama	25
1.3.3. Uticaj ROS na indukciju morfogeneze u uslovima <i>in vitro</i>	27
1.4. Rod <i>Allium</i> L.	30
1.4.1. Biotehnologija u službi unapređenja vrsta roda <i>Allium</i>	32
1.4.2. Morfogeneza vrsta roda <i>Allium in vitro</i>	34
1.4.2.1. Faktori koji utiču na <i>in vitro</i> morfogenezu vrsta roda <i>Allium</i>	41
2. CILJEVI RADA	50
3. MATERIJAL I METODE	51
3.1. Indukcija kaulogeneze iz odsečaka korenova <i>A. ascalonicum</i>	51

3.1.1.	Osnovna podloga	51
3.1.2.	Biljni materijal	51
3.1.3.	Indukcija kalusa i regeneracija pupoljaka	52
3.1.4.	Uslovi kultivacije	52
3.1.5.	Regenerativni potencijal pojedinačnih linija	53
3.1.6.	Optimizacija protokola za regeneraciju	53
3.1.7.	Ožiljavanje i aklimatizacija biljaka	54
3.2.	Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova <i>A. schoenoprasum</i>	55
3.2.1.	Osnovna podloga	55
3.2.2.	Biljni materijal	55
3.2.3.	Indukcija kalusa iz odsečaka korenova i regeneracija somatskih embriona	56
3.2.4.	Uslovi kultivacije	57
3.2.5.	Aklimatizacija biljaka	57
3.3.	Indukcija kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka <i>A. schoenoprasum</i>	57
3.3.1.	Biljni materijal	57
3.3.2.	Uslovi kultivacije	57
3.3.3.	Indukcija kaulogeneze	58
3.3.4.	Optimizacija procedure za regeneraciju	58
3.3.5.	Skenirajuća elektronska mikroskopija	58
3.3.6.	Histološka analiza	59
3.4.	Statistička obrada podataka koji se odnose na morfogenezu <i>in vitro</i>	59
3.5.	Analiza aktivnosti enzima antioksidativnog sistema tokom regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka <i>A. schoenoprasum</i>	60
3.5.1.	Izolacija proteina	60
3.5.2.	Denaturišuća elektroforeza (SDS-PAGE) i imunodetekcija proteina	61
3.5.3.	Nativna elektroforeza (Native PAGE)	63

3.5.4.	Diferencijalno bojenje POD i CAT	64
3.5.5.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti POD, CAT i SOD	65
3.5.6.	<i>In vivo</i> detekcija H ₂ O ₂ u biljnom tkivu	67
3.5.7.	Statistička obrada podataka koji se odnose na aktivnost enzima antioksidativnog sistema	67
4.	REZULTATI	68
4.1.	Indukcija kaulogeneze iz odsečaka korenova <i>A. ascalonicum</i>	68
4.1.1.	Indukcija kalusa, regeneracija pupoljaka i umnožavanje izdanaka	68
4.1.2.	Regenerativni potencijal pojedinačnih linija	69
4.1.3.	Uticaj inteziteta svetlosti	72
4.1.4.	Uticaj odnosa 2,4-D/BA	74
4.1.5.	Trajanje faze indukcije kalusa	74
4.1.6.	Primena optimizovanog protokola na linije sa različitim regenerativnim potencijalom	77
4.1.7.	Ožiljavanje i aklimatizacija biljaka	77
4.2.	Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova <i>A. schoenoprasum</i>	80
4.2.1.	Indukcija kalusa	80
4.2.2.	Indukcija somatske embriogeneze	81
4.2.3.	Razviće i umnožavanje somatskih embriona	85
4.2.4.	Aklimatizacija biljaka	87
4.3.	Indukcija kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka <i>A. schoenoprasum</i>	89
4.3.1.	Uticaj tipa citokinina na rastenje biljaka	95
4.3.2.	Optimizacija protokola za regeneraciju	98
4.4.	Aktivnost enzima antioksidativnog sistema tokom regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka <i>A. schoenoprasum</i>	104
4.4.1.	Diferencijalno bojenje POD i CAT	110
4.4.2.	<i>In vivo</i> detekcija H ₂ O ₂ u biljnom tkivu	111

5. DISKUSIJA	112
5.1. Regeneracija <i>A. ascalonicum</i>	112
5.1.1. Izbor eksplantata i parametara za kvantifikaciju regenerativnog potencijala	112
5.1.2. Regenerativni potencijal pojedinačnih linija	114
5.1.3. Uticaj inteziteta svetlosti	117
5.1.4. Uticaj odnosa 2,4-D/BA u podlozi	118
5.1.5. Trajanje faze indukcije kalusa	120
5.1.6. Primena optimizovanog protokola na linije sa različitim regenerativnim potencijalom	121
5.1.7. Ožiljavanje i aklimatizacija biljaka	122
5.2. Regeneracija <i>A. schoenoprasum</i>	123
5.2.1. Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova	123
5.2.1.1. Indukcija kalusa	123
5.2.1.2. Indukcija somatske embriogeneze	126
5.2.1.3. Razviće i umnožavanje somatskih embriona i aklimatizacija biljaka	127
5.2.2. Indukcija kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka <i>A. schoenoprasum</i>	128
5.2.2.1. Uticaj tipa citokinina na rastenje biljaka	132
5.2.2.2. Optimizacija protokola za regeneraciju	132
5.3. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema tokom regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka <i>A. schoenoprasum</i>	134
6. ZAKLJUČCI	139
7. LITERATURA	143
BIOGRAFIJA AUTORA	189
Prilog 1 - Izjava o autorstvu	
Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	
Prilog 3 - Izjava o korišćenju	

SKRAĆENICE

ABA	abscisinska kiselina
ACS	1-aminociklopropan-1-karboksilat sintaza
<i>AGL15</i>	eng. <i>Agamous like 15</i>
AHK4	eng. <i>ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE4</i>
AKT	aktin
APX	askorbat peroksidaza
ARF	eng. <i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>
<i>ARR</i>	eng. <i>ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR</i>
Aux/IAA	eng. <i>AUXIN/INDOLE 3-ACETIC ACID INDUCIBLE</i>
AUX1/LAX	eng. <i>AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1</i>
BA	6-benziladenin
<i>BBM</i>	eng. <i>Babyboom</i>
BSA	eng. <i>Bovine Serum Albumin</i>
BPB	brom-fenol-plavo
CAT	katalaze
CaM	kalmodulin
CDC2a	eng. <i>Cell Division Cycle2</i>
CKI1	eng. <i>CYTOKININ INDEPENDENT KINASE1</i>
<i>CLV</i>	<i>CLAVATA</i>
<i>CUC</i>	eng. <i>CUP-SHAPED COTYLEDON</i>
CPPU	N-(2-hloro-4-piridil)-N'-fenilurea
CYCA2	eng. <i>Cyclin-A2</i>
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza
DTT	ditiotreititol
ECL	eng. <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECP	eng. <i>embryogenic cell protein</i>
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EP	embriogeni potencijal
GA	giberelini
<i>GH3</i>	eng. <i>Gretcher Hagen 3</i>
GFP	eng. <i>green fluorescent protein</i>

GPX	glutation peroksidaza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
GR	glutation reduktaza
GST	eng. <i>Glutathione S-transferase</i>
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
<i>KNOX</i>	eng. <i>KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN</i>
KP	kaulogeni potencijal
<i>LBD</i>	eng. <i>lateral organ boundaries domain</i>
<i>LEC</i>	eng. <i>leafy cotyledon</i>
LRRRK	eng. <i>Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase</i>
LSD	eng. <i>Least Significant Difference</i>
MAPK	eng. <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MDHAR	monodehidroaskorbat reduktaza
miRNK	mikro ribonukleinska kiselina
<i>mT</i>	<i>meta-topolin</i>
NBT	eng. <i>nitroblue tetrazolium</i>
NFDM	eng. <i>Non fat dry milk</i>
PBS	eng. <i>Phosphate - Buffered Saline</i>
PDS	eng. <i>Protein Destaining Solution</i>
PGP	P-GLYPROTEIN
PIN	PINFORMED
<i>PKL</i>	eng. <i>pickle</i>
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
POD	peroksidaze
PPFD	eng. <i>photosynthetic photon flux density</i>
PVDF	eng. <i>polyvinylidene difluoride</i>
PVP	polivilnilpolipirolidon
RAM	eng. <i>root apical meristem</i>
RR	regulator rastenja
ROS	eng. <i>reactive oxygen species</i>

RPK1	eng. <i>RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1</i>
SAM	eng. <i>shoot apical meristem</i>
SAUR	eng. <i>small auxin-up RNA</i>
SB	eng. <i>Sample Buffer</i>
SEM	eng. <i>scanning electron microscopy</i>
SERK	eng. <i>somatic embryogenesis receptor kinase</i>
SDS	Na-dodecil-sulfat
SDS-PAGE	eng. <i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SOD	superoksid dismutaze
SPL	eng. <i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE</i>
STM	eng. <i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
TB	eng. <i>Transfer Buffer</i>
TCL	eng. <i>thin cell layer</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TDZ	N-fenil-N'-1,2,3tiadiazol-5-urea; tidiazuron
TPP	trehaloza-6-fosfat fosfataza
tasiRNAs	eng. <i>trans-acting small interfering RNAs</i>
TIR1	eng. <i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1</i>
UPB1	UPBEAT1
QC	eng. <i>quiescent centre</i>
QTL	eng. <i>quantitative trait loci</i>
ZEA	<i>trans</i> -zeatin; 4-hidroksi-3-metil- <i>trans</i> -2-butenilaminopurin
ZLL	ZWILLE
YUC	YUCCA
WUS	WUSCHEL

1. UVOD

Biotehnologija biljaka primenom znanja iz različitih naučnih oblasti omogućava napredak u poljoprivredi, proizvodnji hrane, hortikulturi, hemijskoj i farmaceutskoj industriji (Flavell, 1995). Istraživanja u okviru biotehnologije biljaka su omogućila povećanje prinosa useva, poboljšanje hranljivih vrednosti biljaka, povećanje otpornosti biljaka na abiotičke i biotičke stresne uslove i očuvanje biodiverziteta (Seki i sar., 2001; Beyer i sar., 2002; Cheng i sar., 2002). Nakon primene različitih biotehnoloških metoda uspešno su dobijene biljke otporne na različite bolesti i patogene (Baisakh i sar., 2001; Pray i sar., 2001), što takođe pozitivno utiče na ukupni prinos. Genetički modifikovane biljke se koriste za biosintezu bioaktivnih peptida, antitela i enzima za farmaceutsku industriju (Tacket i sar., 1998; Murphy 2007). Osnovni principi na koje se oslanjaju istraživanja u okviru biotehnologije biljaka su: totipotetnost biljne ćelije i genetička transformacija (Vasil, 2008).

1.1. Morfogeneza *in vitro*

Biljni organi, tkiva i ćelije su sposobni da tokom procesa morfogeneze regenerišu pojedinačne organe ili čak i celu biljku (Murashige, 1974; Phillips, 2004). To je jedna od značajnih osobina biljaka po kojoj se razlikuju od životinja. Mikropropagacija, organogeneza, somatska embriogeneza, androgenesa, ginogeneza i somatska hibridizacija predstavljaju različite procese morfogeneze *in vitro*. Mikropropagacija obuhvata umnožavanje izolovanih pupoljaka u kulturi *in vitro*, dok se pod organogenezom podrazumeva *de novo* formiranje pupoljaka i korenova (Skoog i Miller, 1957). Razviće embriona iz somatskih ćelija predstavlja somatsku embriogenezu (Steward i sar., 1958; Reinert, 1958). Pod posebnim uslovima haploidne ćelije mogu bez oplodjenja da formiraju novu biljku. Razviće haploidnih biljaka iz muškog gametofita je označeno kao androgenesa (Tulecke, 1953; Guha i Maheswari, 1964), a iz ženskog kao ginogeneza (Bohanec i sar., 1995). U suspenziji ćelija može doći do spajanja protoplasta izolovanih iz iste biljke (homokarion), različitih jedinki iste vrste (intraspecijska hibridizacija) ili jedinki različitih vrsta (interspecijska hibridizacija), koji su posle izvesnog vremena sposobni da regenerišu kalus ili celu biljku (George i sar., 2008). Ovaj proces je označen kao somatska hibridizacija.

Najznačajnija osobina biljne ćelije bez koje ne bi ni mogao da se odigra proces morfogeneze *in vitro* je totipotencija - sposobnost ćelije da se dediferencira, deli i regeneriše organe i celu biljku (De Klerk i sar., 1997). Haberlandt (1902) je prvi uočio ovu osobinu kod biljaka, smatrajući da se odnosi na sve biljne ćelije. Ipak, nakon brojnih istraživanja koja su sprovele različite istraživačke grupe ustanovljeno je da tu osobinu poseduje samo mali broj ćelija, kao što su ćelije pericikla korena bliskih ksilemu, ćelije zatvaračice stoma i bazalne ćelije trihoma (Gordon i sar., 2007; Atta i sar., 2009; Sugimoto i sar., 2010). Pretpostavlja se da u eksplantatima postoje određene ćelije koje su sposobne da se dele, da formiraju kalus i nove organe, i da je to posledica njihovog fiziološkog stanja i porekla, jer verovatno potiču od meristemoida.

1.1.1. Organogeneza

Biljke su u svakom trenutku izložene veoma raznolikim uticajima u svom okruženju. Neki od njih mogu delovati štetno na biljni organizam. Izuzetna sposobnost adaptacije pomaže biljkama u rešavanju ovog problema. Ova osobina biljaka je povezana sa mogućnošću formiranja novih organa tokom postembrionalnog razvića. Primordije organa se formiraju tokom procesa koordinisane deobe i diferencijacije ćelija iz proliferativnog tkiva (Benková i sar., 2003; Sena i Birnbaum, 2010). To su grupe matičnih ćelija, tj. meristemi koji se nalaze na krajevima apikalno-bazalne ose embriona. Označavaju se kao apikalni meristem izdanka (eng. *shoot apical meristem* - SAM) i apikalni meristem korena (eng. *root apical meristem* - RAM). Neke od novoformiranih primordija se razvijaju u determinisane organe sa određenim brojem ćelija, dok se druge razvijaju u izdanke i korenove sa sekundarnim meristemima na vrhovima (Benková i sar., 2003).

De novo organogeneza obuhvata formiranje pupoljaka (kaulogeneza) i korenova (rizogeneza) na eksplantatima gajenim u uslovima *in vitro*. Tokom 50-tih godina XX veka je pokazan značaj odnosa auksina i citokinina za organogenezu *in vitro*. Visok nivo citokinina u odnosu na nivo auksina indukuje kaulogenezu, dok obrnuta situacija dovodi do rizogeneze (Skoog i Miller, 1957). U približnoj koncentraciji auksini i citokinini indukuju pojavu kalusnog tkiva (kalogenezu).

De novo organogeneza obuhvata tri faze: dediferencijaciju ćelija, indukciju i diferencijaciju (morfogenezu) organa (Murashige, 1974). Tokom prve faze ćelije eksplantata se dediferenciraju i stiču sposobnost da odgovore na stimulus za indukciju organa. U drugoj fazi dediferencirane ćelije postaju determinisane da formiraju organe kao odgovor na određene regulatore rastenja (RR), dok se u trećoj fazi formiraju organi nezavisno od egzogeno primenjenih RR (Murashige, 1974; Christianson i Warnick, 1983; Sugiyama, 1999).

Dediferencirane ćelije se dele i formiraju kalus. Ranije se smatralo da formiranje kalusa predstavlja proces reprogramiranja ekspresije gena i vraćanja do nediferenciranog stanja. Međutim, novija istraživanja su pokazala da se ćelije ne dediferenciraju do bazalnog embrionalnog stadijuma i da je kalus sličan meristemu korena, čak i kada potiče od nadzemnih organa biljke (Atta i sar., 2009; Sugimoto i sar., 2010). Za indukciju kalusa odlučujuću ulogu ima distribucija auksina (Gordon i sar., 2007). Tokom tog procesa ćelije stiču kompetenciju, odnosno sposobnost da odgovore na citokinine, koji su neophodni za indukciju organogeneze (Cheng i sar., 2013). Važno je napomenuti da se ovakav redosled događaja tokom organogeneze ne može primeniti za sve biljne vrste i sve tipove eksplantata. Organogeneza *in vitro* može biti direktna, kada su eksplantati sposobni da odgovore na stimulus za indukciju organa bez faze dediferencijacije ćelija, ili indirektna, kada se dešavaju sve tri gore opisane faze organogeneze (Murashige, 1974).

1.1.1.1. Mehanizam indukcije organogeneze

Indirektna regeneracija pupoljaka iz odsečaka korenova *Arabidopsis thaliana* do sada je najbolje proučen primer organogeneze i koristi se kao model sistem za dalje otkrivanje molekularnog mehanizma *de novo* organogeneze (Cary i sar., 2002). Ovaj sistem omogućava paralelno proučavanje procesa kalogeneze, kaulogeneze i rizogeneze na istom objektu (Cary i sar., 2002; Che i sar., 2002, 2006, 2007). Prema ovom protokolu, eksplantati se najpre gaje na podlozi za indukciju kalusa, koja sadrži povišenu količinu auksina na kojoj eksplantati stiču sposobnost da odgovore na citokinine. Izdanci se uočavaju nakon subkultivacije na podlogu za indukciju izdanaka, koja sadrži veću količinu citokinina (Cary i sar., 2002).

Na osnovu rezultata kojim se potvrđuje da su ćelije pericikla korena *A. thaliana* pluripotentne, tj. sposobne da regenerišu i korenove i pupoljke, došlo se do zapažanja da su oba procesa pod istom genetičkom kontrolom i da je mehanizam formiranja kalusa isti bez obzira na tip eksplantata (Atta i sar., 2009). Primordije lateralnih korenova na ranom stadijumu razvića mogu da se razviju u pupoljke i bez prethodnog izlaganja podlozi za indukciju kalusa (Atta i sar., 2009). Međutim, do regeneracije pupoljaka dolazi samo tokom kratkog vremenskog perioda, kada su ćelije pericikla već započele proces formiranja meristema lateralnih korenova, ali pre njihove potpune diferencijacije u ćelije korena. Ćelije pericikla su sposobne da ponovo uđu u ćelijski ciklus bez dediferenciranja, zahvaljujući ekspresiji gena značajnih za pokretanje ćelijskog ciklusa: *CDC2a* (eng. *Cell Division Cycle2*; Hemerly i sar., 1993) i *CYCA2* (eng. *Cyclin-A2*; Burssens i sar., 2000).

Formiranje primordija započinje antiklinim deobama ćelija pericikla (Dubrovsky i sar., 2001). Na pravilno pozicioniranje ravni ćelijske deobe značajno utiču auksini (Dhonukshe i sar., 2005). Nakon inicijacije ćelijske deobe, da bi se nastavio proces *de novo* organogeneze neophodna je postepena promena smera protoka auksina prema apeksu buduće primordije (Sauer i sar., 2006). U slučaju indirektno kaulogeneze, gradijent auksina se uspostavlja u specifičnim regionima kalusa (Su i sar., 2009). To se dešava zahvaljujući lokalizaciji sekundarnih transportera PINFORMED (PIN), koji imaju ulogu u efluksu auksina (Gao i sar., 2008). Uklanjanjem auksina iz hranljive podloge uspostavlja se gradijent auksina na ivicama kalusa, što koincidira sa polarnom distribucijom PIN1 (Su i sar., 2009).

Ekstremni maksimum auksina, uz prisustvo citokinina, reguliše ekspresiju gena potrebnih za sticanje kompetencije ćelija za *de novo* formiranje pupoljaka. Zatim dolazi do značajne ekspresije gena koji kodiraju komponente signalnih puteva hormona i transkripcionih faktora (Che i sar., 2002, 2006, 2007; Gordon i sar., 2007). U prisustvu citokinina kompetentne ćelije stiču identitet za formiranje pupoljaka. Zbog toga je važan odgovarajući redosled primene RR tokom indukcije *de novo* organogeneze.

1.1.1.2. Formiranje apikalnog meristema izdanka

De novo organogeneza pupoljaka započinje formiranjem meristema. Mehanizam formiranja SAM je isti kod zigotskih i somatskih embriona, kao i kod *de novo* formiranih pupoljaka. Svi navedeni procesi su pod kontrolom istih gena (Benková i sar., 2003; Gaj i sar., 2005; Malik i sar., 2007; Atta i sar., 2009; Su i sar., 2009; Elhiti i sar., 2010; Elhiti i Stasolla, 2012).

SAM se održava tokom celog životnog veka biljnog organizma i predstavlja izvor meristemskih ćelija za formiranje vegetativnih organa (listova, aksilarnih pupoljaka, cvasti i cvetnih organa). Praktično sav nadzemni deo biljke vodi poreklo od SAM zigotskog embriona. Formiranje i održavanje SAM tokom zigotske embriogeneze se dešava zahvaljujući koordinisanoj aktivnosti transkripcionih faktora, od kojih su najvažniji *WUSCHEL (WUS)*, *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, *ZWILLE (ZLL)* i *CLAVATA (CLV)*; Gordon i sar., 2007). Funkcionalnost i veličina SAM se održavaju zahvaljujući kompleksnoj interakciji ovih transkripcionih faktora pozitivnom i negativnom povratnom spregom. *WUS* određuje i održava identitet matičnih ćelija, a *CLV* i *STM* imaju antagonističke funkcije u kontroli veličine meristema (Clark i sar., 1996). *WUS* se eksprimira u centralnoj zoni SAM, koja se označava kao organizacioni centar ili niša matičnih ćelija, locirana neposredno ispod apikalnog sloja matičnih ćelija (Mayer i sar., 1998; Schoof i sar., 2000). *STM* suprimira diferencijaciju ćelija SAM i sprečava njihovu inkorporaciju u primordije lateralnih organa (Endrizzi i sar., 1996; Long i sar., 1996), dok *CLV* negativnom povratnom spregom inhibira ekspresiju *WUS* i promovise diferencijaciju ćelija (Dodsworth, 2009). *WUS* reguliše ekspresiju više od 100 gena uključenih u signalne puteve hormona, metabolizam i razviće biljnog organizma (Busch i sar., 2010). Kod *wus* mutanata SAM je značajno smanjen, zbog prevremene diferencijacije matičnih ćelija (Laux i sar., 1996).

STM pripada familiji *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN (KNOX)* gena, koji regulišu različite aspekte razvića biljke i imaju glavnu ulogu u održavanju pluripotentnosti ćelija SAM (Clark i sar., 1996; Laux i sar., 1996; Long i sar., 1996). *STM* je prisutan u vegetativnom i cvetnom meristemu. Neophodan je za razviće meristema embriona i njegovo održavanje tokom postembrionalnog razvića (Endrizzi i sar., 1996).

ZLL pripada familiji ARGONAUTE proteina i određuje pravilnu lokalizaciju *STM* (Lynn i sar., 1999). ZLL je neophodan za formiranje SAM u zigotskim embrionima, ali nije potreban za funkcionisanje meristema tokom postembrionalnog razvića (Moussian i sar., 1998; Lynn i sar., 1999).

CLV geni se eksprimiraju u ćelijama površinskog sloja centralne zone SAM (Fletcher i Meyerowitz, 2000). *CLV1/CLV2* je receptor-kinaza bogata leucinom (eng. *Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase – LRRRK*; Clark i sar., 1997), dok je *CLV3* mali glikopeptid koga izlučuju matične ćelije SAM (Fletcher i sar., 1999). *CLV3* je ligand *CLV1/CLV2* receptornog kompleksa, koji u aktiviranom stanju inhibira ekspresiju *WUS* (Ohyama i sar., 2009) i na taj način, negativnom povratnom spregom, kontroliše proliferaciju ćelija SAM. Sa druge strane, *WUS* direktno inhibira ekspresiju *CLV1* (Busch i sar., 2010). Kod *clv* mutanata SAM je uvećan zbog nedostatka inhibicije (Clark i sar., 1995).

Tokom zigotske embriogeneze, *WUS* se eksprimira pre razvića meristema, u četiri unutrašnje ćelije proembriona na stadijumu razvića od 16 ćelija (Mayer i sar., 1998; Weigel i Jürgens, 2002). *WUS* negativno utiče na biosintezu i percepciju auksina i verovatno na taj način održava balans auksina i citokinina neophodan za održavanje SAM (Busch i sar., 2010). Citokinini su neophodni za održanje ćelijskog ciklusa i aktivnost meristema (Riou-Khamlichi i sar., 1999; Werner i sar., 2003; Kurakawa i sar., 2007), dok akumulacija auksina izaziva diferencijaciju ćelija na periferiji SAM i formiranje lateralnih organa (Reinhardt i sar., 2003). *WUS* direktno inhibira transkripciju gena *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR5, ARR6, ARR7 i ARR15)*, negativnih regulatora signalnog puta citokinina (Leibfried i sar., 2005). Ektopična ekspresija *ARR7* u ćelijama SAM izaziva pojavu simptoma *wus* mutanata (Leibfried i sar., 2005). Za ektopično formiranje SAM neophodni su auksin i citokinin, koji deluju i antagonistički i sinergistički.

1.1.1.3. Polarni transport i uspostavljanje gradijenta auksina

Za *de novo* formiranje primordija potrebna je lokalna akumulacija auksina u ćelijama začetnicama, inicijacija ćelijske deobe i postepena promena smera protoka auksina prema apeksu buduće primordije (Sauer i sar., 2006). Uspostavljanje gradijenta

auksina, sa maksimumom u apeksu primordije, je opšti obrazac za formiranje svih biljnih organa (Benková i sar., 2003). Transport auksina je pod kontrolom influks simportera AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), efluks transportera PIN i ABCB/P-GLYPROTEIN (PGP; Petrášek i Friml, 2009). Polarnost ćelije određuju PIN proteini, čija distribucija zavisi od smera fluksa auksina (Friml i sar., 2003).

PIN su transmembranski proteini (Gälweiler i sar., 1998; Wiśniewska i sar., 2006), koji imaju sposobnost stalne mobilnosti između plazma membrane i endozoma (Geldner i sar., 2001, 2003), pa promene u polarnoj lokalizaciji PIN transportera utiču na promenu fluksa auksina i stvaranje lokalnog gradijenta auksina potrebnog za indukciju primordija i njihovo razviće (Benková i sar., 2003). U susednim ćelijama PIN transporteri imaju istu lokalizaciju, što ukazuje da transportuju auksin u istom smeru, kreirajući na taj način gradijent auksina u tkivu (Gälweiler i sar., 1998).

Auksin (egzogeni ili akumulirani tokom *de novo* organogeneze) je dovoljan signal da indukuje ekspresiju PIN i polarnost u kompetentnim tkivima. Osim što modulise tkivno-specifičnu transkripciju *PIN* gena (Schrader i sar., 2003; Vieten i sar., 2005), auksin utiče i na stabilnost PIN proteina (Abas i sar., 2006) i smanjuje nivo subcelularne reciklacije PIN povećavajući time nivo PIN u membrani (Paciorek i sar., 2005). Osim toga, povređivanje tkiva takođe može da indukuje ekspresiju PIN (Sauer i sar., 2006).

Najbolji primer uspostavljanja gradijenta auksina i njegovog uticaja na sudbinu ćelije je gradijent koji nastaje prvom deobom zigota. Pri asimetričnoj deobi zigota nastaje bazalna ćelija koja vrši transport auksina i apikalna ćelija koja odgovara na auksin (Friml i sar., 2003). Uspostavljeni apikalno-bazalni gradijent određuje buduću ulogu ćelija: apikalna ćelija će se razviti u embrion, a bazalna u suspensor (Liu i sar., 1993). PIN7 je lokalizovan apikalno na bazalnoj ćeliji. Kasnije tokom razvića, PIN1 obrazuje gradijent auksina na suprotnom polu, neophodnog za uspostavljanje identiteta RAM (Friml i sar., 2003).

Imunodetekcijom i fuzijom PIN-GFP (eng. *green fluorescent protein* - GFP) je potvrđeno da su PIN transporteri zaista usmereni ka primordijama mladih organa (Reinhardt i sar., 2003; Heisler i sar., 2005). Pretpostavljeno je da PIN transporteri

stvaraju maksimum gradijenta auksina na periferiji meristema i time indukuju formiranje lateralnih organa, koji zatim akumuliraju auksin ostavljajući niži nivo auksina u susednom tkivu i na taj način sprečavaju blisko formiranje drugih organa. Kada PIN1 nije funkcionalan u SAM, inhibirano je formiranje lateralnih organa, koje se može revertovati egzogenom primenom auksina. Sve ovo ukazuje da je za formiranje organa neophodan gradijent auksina i da je PIN1 neophodan za njegov nastanak (Reinhardt i sar., 2003; Heisler i sar., 2005; de Reuille i sar., 2006).

Modelovanjem i kompjuterskom simulacijom je potvrđena navedena hipoteza o ulozi PIN transportera u uspostavljanju gradijenta auksina (de Reuille i sar., 2006). Iako ni jedan model ne objašnjava sve eksperimentalne rezultate, većina modela je u saglasnosti sa najvećim brojem eksperimentalnih podataka (Traas i Monéger, 2010).

1.1.1.4. Molekularni mehanizam indukcije SAM

Tokom rane faze dediferencijacije i indukcije kalusa dolazi do epigenetskih promena koje uključuju remodelovanje hromatina i modulaciju ekspresije gena (Che i sar., 2006; Willmann i sar., 2011; Miguel i Marum, 2011; Neelakandan i Wang, 2012). Ove procese mogu indukovati različiti faktori stresa, uključujući i visoku dozu auksina. Za remodelovanje hromatina je neophodna aktivnost odgovarajućih enzima koji vrše modifikaciju histona (Williams i sar., 2003; Grafi i sar., 2007), dok do modulacije ekspresije gena dolazi metilacijom regulatornih sekvenci i utišavanjem gena na transkripcionom i posttranskripcionom nivou posredstvom mikro ribonukleinskih kiselina (miRNK).

Tokom *de novo* organogeneze, SAM se indukuje ektopično, pa je kontrola njegovog formiranja verovatno nešto drugačija u odnosu na zigotske embrione, mada je izvesno da u tom procesu učestvuju isti geni (Atta i sar., 2009; Sugimoto i sar., 2010). Ektopična ekspresija *WUS* je dovoljna za formiranje SAM (Gallois i sar., 2004), a za ekspresiju *WUS* je neophodan PIN1 (Gordon i sar., 2007). Drugim rečima, gradijent auksina uspostavljen delovanjem PIN, aktivira ekspresiju *WUS*, čime započinje kaulogeneza (Su i sar., 2009). Kod *pin* mutanata broj *de novo* formiranih pupoljaka je značajno manji u odnosu na divlji tip (Gordon i sar., 2007). Vremenski i prostorni gradijent auksina, uspostavljen koordinisanom lokalnom biosintezom i polarnim

transportom, reguliše prostorni citokininski odgovor tokom *de novo* regeneracije pupoljaka (Cheng i sar., 2013). Interakcija (eng. *cross talk*) auksina i citokinina je kritična za prostornu indukciju *WUS*, uspostavljanje SAM i zatim regeneraciju pupoljaka (Gordon i sar., 2009)

WUS, *STM* i *CLV3* se ne eksprimiraju u kalusu (Gordon i sar., 2007; Atta i sar., 2009), ali se eksprimiraju tokom faze indukcije pupoljaka (Cary i sar., 2002; Gordon i sar., 2007). Najpre se eksprimira *WUS*, pre pojave primordija pupoljaka, zatim *CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)* i *CUC2* u prisustvu auksina, takođe pre pojave pupoljaka, i na kraju *STM* i *CLV1* (Cary i sar., 2002; Gordon i sar., 2007; Motte i sar., 2011). *CUC1* i *CUC2* imaju istu (redundantnu) ulogu i potrebni su za ekspresiju *STM* i formiranje SAM (Aida i sar., 1999). Prostorna ekspresija *CUC2* i *WUS* se tokom regeneracije pupoljaka iz kalusa postepeno razdvaja na odvojene regione i taj proces regulišu RR (Gordon i sar., 2007). Auksini indukuju ekspresiju *CUC2*, dok citokinini indukuju ekspresiju *WUS* (Gordon i sar., 2007).

Uočeno je da povećana ekspresija *STM*, *ZLL1* i *ZLL2* promovise kaulogenezu, dok je povećana ekspresija *CLV1* inhibira (Elhiti i Stasolla, 2012), što potvrđuje da su regulatorni mehanizmi koji kontrolišu formiranje SAM zigotskih i somatskih embriona i *de novo* pupoljaka isti (Elhiti i sar., 2010; Elhiti i Stasolla, 2012). *ZLL1* i *ZLL2* indukuju kaulogenezu u odgovoru na auksin i ne utiču na signalni put citokinina, dok *STM* i *CLV1* odgovaraju na citokinin (Elhiti i Stasolla, 2012). *STM* indukuje ekspresiju gena za izopentenil fosfotransferazu *IPT7* (Jasinski i sar., 2005; Yanai i sar., 2005). Osim toga, ektopična ekspresija *STM* indukuje ekspresiju citokininskih receptora ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE4 (*AHK4*) i CYTOKININ INDEPENDENT KINASE1 (*CKI1*; Elhiti i Stasolla, 2012). *AHK4* je neophodan za regeneraciju pupoljaka (Inoue i sar., 2001; Buechel i sar., 2010), dok *CKI* promovise razviće pupoljaka i u odsustvu citokinina (Kakimoto, 1996; Hwang i Sheen, 2001). *AHK4* inicira snažan odgovor na citokinin koji promovise ekspresiju *WUS* dovoljnu da indukuje formiranje SAM (Gordon i sar., 2009). Egzogeni auksin povećava ekspresiju *AHK4* tokom faze indukcije kalusa, a egzogeni citokinin reguliše ekspresiju *PIN* i gena za biosintezu auksina *YUCCA (YUC)* u kalusu (Růžička i sar., 2009; Jones i sar., 2010).

Citokininski receptori zatim deluju na ARR, koji mogu biti pozitivni i negativni regulatori transkripcije (Hwang i Sheen, 2001). Po strukturi, ARR se dele na tip A i B. ARR regulatori tipa B su aktivatori transkripcije gena čiju ekspresiju indukuju citokinini, dok su ARR regulatori tipa A represori transdukcije citokininskog signala (Hwang i Sheen, 2001).

Ključni faktori koji vrše regulaciju ekspresije gena koji odgovaraju na auksin su AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) i AUXIN/INDOLE 3-ACETIC ACID INDUCIBLE (Aux/IAA; Guilfoyle, 2015). ARF su transkripcioni faktori, koji mogu biti aktivatori i represori. Aux/IAA su kratko-živeći proteini, lokalizovani u jedru, koji nemaju DNK-vezujući domen i funkcionišu kao represori transkripcije (Tiwari i sar., 2003). ARF i Aux/IAA interaguju u protein-protein interakciji formirajući sve tipove homo i heterooligomera (ARF-ARF, ARF-Aux/IAA i Aux/IAA-Aux/IAA; Kim i sar., 1997; Han i sar., 2014; Korasick i sar., 2014). Kada je koncentracija auksina u ćeliji niska, ARF interaguju sa Aux/IAA, pa ne dolazi do promene ekspresije gena koji odgovaraju na auksin (*IAA* geni; Tiwari i sar., 2003). Pri povišenoj koncentraciji auksina dolazi do ubikvitinizacije i degradacije Aux/IAA represora i oslobađanja *IAA* gena represije (Salehin i sar., 2015). Istim mehanizmom, preko TIR1-Aux/IAA-ARF signalnog puta, auksin indukuje transkripciju *PIN* gena (Schrader i sar., 2003; Vieten i sar., 2005; Sauer i sar., 2006). TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) je auksinski receptor (Dharmasiri i sar., 2005; Kepinski i Leyser, 2005).

U eksplantatima sa povećanom ekspresijom *STM* i u manjoj meri *ZLL1* i *ZLL2* je uočena povećana ekspresija većeg broja *IAA* gena (Elhiti i Stasolla, 2012). Očekivano, u eksplantatima sa povećanom ekspresijom *CLV1* nivo ekspresije *IAA* gena je niži.

KNOX proteini koordinišu ekspresiju gena u ćelijama SAM, koja vodi povećanju nivoa citokinina i smanjenju nivoa giberelina (GA; Jasinski i sar., 2005). Povećan nivo citokinina u SAM aktivira ćelijsku deobu stimulacijom ekspresije gena za ciklin D (Riou-Khamlichi i sar., 1999). KNOX proteini direktno reprimiraju ekspresiju gena koji kodiraju GA20-oksidadzu, ključnog enzima za održanje homeostaze GA (Sakamoto i sar., 2001). Fiziološki smisao inhibicije biosinteze GA u ćelijama SAM je sprečavanje njihovog izduživanja (Shibaoka, 1994).

Povećana ekspresija *KNOX* gena izaziva ektopičnu regeneraciju pupoljaka na listovima (Chuck i sar., 1996). U skladu sa tim, povećana ekspresija *IPT* gena indukuje ekspresiju *KNOX* gena i povećava potencijal tkiva za regeneraciju pupoljaka (Rupp i sar., 1999). S druge strane, visok nivo auksina reprimira ekspresiju *KNOX* gena (Shani i sar., 2006).

I pored intenzivnih istraživanja brojnih istraživačkih grupa u kojima su dobijeni usaglašeni rezultati, do danas nije predložen sveobuhvatan model za indukciju kaulogeneze (Cheng i sar., 2013). Osim toga, veliki broj biljnih vrsta se ne ponaša u skladu sa predloženim model-sistemom razvijenim na *A. thaliana*. U skladu sa tim je i pojava rekalcitrantnosti, odnosno nemogućnosti da se regularnim tehnikama kulture biljnih ćelija, tkiva i organa indukuje *de novo* regeneracija kod nekih biljnih vrsta (Motte i sar., 2014). Zbog toga se i dalje protokoli za regeneraciju iz različitih tipova eksplantata mnogobrojnih biljnih vrsta razvijaju empirijski.

Najnovija istraživanja ukazuju na izuzetno značajnu ulogu miRNK u regulaciji ekspresije transkripcionih faktora koji kontrolišu procese morfogeneze biljnog organizma (Axtell i Bowman, 2008). Neke od njih, npr. miR156 su uključene u regulaciju *de novo* organogeneze (Zhang i sar., 2015). Naime, odavno poznata činjenica da eksplantati izolovani sa starijih biljnih organizama imaju niži regenerativni potencijal i u manjoj meri reaguju na citokinine od onih izolovanih sa mladih biljnih organizama, može se objasniti različitim nivoom miR156 u starim i mladim biljnim organizmima. Povećan nivo miR156 prolongira juvenilnu fazu (Wu G i sar., 2009). miR156 interaguje sa transkripcionim faktorom SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), koji direktno inhibira transkripciju ARR tipa B. Sa starošću biljke opada nivo miR156, zbog čega opada represija SPL, pa organi starijih biljaka imaju manju sposobnost da odgovore na citokinin usled toga što miR156-SPL inhibira funkciju ARR tipa B, aktivatora transkripcije u signalnom putu citokinina (Zhang i sar., 2015). miR156 je konzervisana tokom evolucije (Axtell i Bowman, 2008) i osim što se smatra indikatorom starosti biljnog materijala, pretpostavlja se da određuje totipotenciju biljne ćelije (Zhang i sar., 2015). Takođe se smatra da bi se manipulacijom nivoom miR156 mogla indukovati regeneracija rekalcitrantnih biljnih vrsta, poput drvenastih vrsta (Zhang i sar., 2015).

Visoko konzervisane miRNK regulišu višestruke procese razvića, a u promotorima gena koji kodiraju ove miRNK su prisutni *cis* elementi koji odgovaraju na fitohormone i stres (Zhao i Li, 2013). Osim toga, neke miRNK mogu da indukuju pojavu malih RNK koje deluju *in trans* (eng. *trans-acting small interfering RNAs - tasiRNAs*), za koje se smatra da predstavljaju mobilni signal (Si-Ammour i sar., 2011). U skladu sa tim, miRNK su sjajni kandidati za integraciju signalnih puteva većeg broja fitohormona i koordinaciju višestrukih odgovora biljnog tkiva na hormone (Curaba i sar., 2014). Zauzvrat, fitohormoni povratnom spregom regulišu ekspresiju miRNK (Gutierrez i sar., 2009), npr. neke miRNK su uključene u koordinaciju antagonističkih funkcija auksinske i citokininske signalne mreže (Liu i sar., 2009).

1.1.2. Somatska embriogeneza

Somatska embriogeneza je proces bespolne reprodukcije. Pri posebnim uslovima tokom ovog procesa iz somatskih ćelija se formiraju embrioni, iz kojih će se formirati cela biljka (Zimmerman, 1993). Razviće somatskih embriona obuhvata ključne stadijume koji se javljaju i pri formiranju zigotskih embriona (Zimmerman, 1993), a somatski embrioni su kao bipolarne strukture sa svojim karakterističnim embrionalnim organima (radikula, hipokotil i kotiledoni) slični zigotskim embrionima (Von Arnold i sar., 2002). Iako je somatska embriogeneza moguća u prirodnim uslovima, ona se izuzetno retko dešava (Koltunow i Grossniklaus, 2003).

Zbog velike sličnosti u razviću embriona koji se razvijaju iz zigota i iz somatskih ćelija, somatska embriogeneza predstavlja značajan model sistem za izučavanje embriogeneze na nivou molekula, ćelija i tkiva (Dodeman i sar., 1997, Willemsen i Scheres, 2004). Podaci o sposobnosti biljne ćelije da ispolji embriogeni kapacitet su dobijeni primenom različitih savremenih eksperimentalnih metoda, analizom embriogeneze kod mutanata *A. thaliana* (Fehér i sar., 2003), kao i mogućnošću da se za kratko vreme dobije veliki broj embriona na istom stadijumu razvića (Elhiti i sar., 2013). Prednost *in vitro* eksperimentalnih sistema se ogleda u olakšanoj manipulaciji embriogenim ćelijama u odnosu na zigot, čije se razviće odvija u tkivu majke. Embriogeneza *in vitro* može da se primeni za masovnu propagaciju različitih biljnih vrsta (Dodeman i sar., 1997, Von Arnold i sar., 2002). Osim toga, dobro poznavanje procesa somatske embriogeneze i *de novo* organogeneze omogućava

razvijanje efikasnih protokola za regeneraciju *in vitro*, kao neophodnog preduslova za genetičku transformaciju i regeneraciju biljnog organizma iz transformisanih ćelija (Jiménez, 2001, Smertenko i Bozhkov, 2014).

Proces somatske embriogeneze je jedinstven za biljke i podeljen je u dve glavne faze: indukcija i ekspresija (Dodeman i sar., 1997; Jiménez, 2001). Tokom faze indukcije, diferencirane somatske ćelije stiču embriogeni potencijal i dele se kao embriogene ćelije. U fazi ekspresije, ćelije ispoljavaju stečeni embriogeni potencijal i diferenciraju se u somatske embrione (Jiménez, 2001). Ćelije eksplantata mogu biti indukovane tako da krenu putem direktne ili indirektno somatske embriogeneze. U direktnoj somatskoj embriogenezi embrioni se razvijaju direktno na površini diferenciranog tkiva - na listu, na segmentima stabla, zigotskim embrionima, mladim cvastima, iz protoplasta ili mikrospora. U indirektnoj somatskoj embriogenezi postoji još jedan korak pre pojave somatskih embriona - proces formiranja kalusa (Williams i Maheswaran, 1986).

Izrazite promene u okruženju ćelija i tkiva, kao što su nedovoljna količina hranljivih materija, prisustvo RR, joni teških metala, osmotski stres ili visoka temperatura mogu da izazovu stres. U zavisnosti od nivoa stresa i od fiziološkog stanja biljne ćelije, moguća su dva odgovora: ćelijska smrt ili indukcija adaptivnih mehanizama. Adaptacije obuhvataju reprogramiranje ekspresije gena i promene u metaboličkim i fiziološkim procesima (Lichtenthaler, 1998). Sve te promene mogu dovesti do dediferenciranja biljne ćelije, a zatim i do indukcije somatske embriogeneze (Fehér i sar., 2003), tako da somatska embriogeneza predstavlja jedan od adaptivnih mehanizama biljnih ćelija gajenih u uslovima *in vitro* (Kamada i sar., 1994; Patnaik i sar., 2005; Jin i sar., 2014).

Prvi uočljiv rezultat delovanja različitih stimulusa i aktivacije izmenjenog genetičkog programa je formiranje asimetrične polarne strukture (Dodeman i sar., 1997; Smertenko i Bozhkov, 2014). Pored asimetrične ćelijske deobe vrlo značajan mehanizam koji određuje sudbinu ćelije je njena pozicija. Utvrđeno je da oba mehanizma funkcionišu tokom procesa razvića embriona (Laux i Jurgens, 1997).

Mehanizam indukcije somatske embriogeneze je prilično složen i sličan je kod različitih biljnih vrsta (Elhiti i sar., 2013). Učestalost indukcije somatske embriogeneze zavisi od genotipa, tipa tkiva, fiziološkog stanja eksplanata i uslova kultivisanja (Carman, 1990), kao i od nivoa endogenih i egzogenih RR (Jiménez, 2001; Dudits i sar., 1991).

RR imaju značajnu ulogu u regulaciji promena u procesu razvića biljaka. Auksini i citokinini, kao glavni RR kod biljaka, su uključeni u regulaciju ćelijske deobe i diferencijaciju ćelija (Fehér i sar., 2003). Egzogeno primenjeni auksini utiču na indukciju somatske embriogeneze (Dudits i sar., 1991), dok su za razviće embriona odgovorni citokinini (Sagare i sar., 2000) i abscisinska kiselina (ABA; Nishiwaki i sar., 2000; Von Arnold i sar., 2002). Nivo endogenih RR se smatra jednim od glavnih faktora koji određuje specifičnost ćelijskog odgovora na efekte stresa (Fehér i sar., 2003). Sintetički RR, poput 2,4-dihlorfenoksisirćetne kiseline (2,4-D), najčešće izazivaju povećanje nivoa endogene indol-3-sirćetne kiseline (IAA; Pasternak i sar., 2002), što je povezano sa povećanjem embriogenog potencijala kod različitih biljnih vrsta (Michalczuk i Druart, 1999). Od svih auksina koji se koriste za indukciju somatske embriogeneze, 2,4-D je najefikasniji i zbog toga se najčešće koristi (Jiménez, 2001). 2,4-D u određenoj koncentraciji ima dvostruki efekat: kao auksin (direktno ili preko metabolizma IAA) ili kao faktor stresa (Fehér i sar., 2002). Za efikasnu indukciju somatskih embriona, koji će imati sposobnost da se pravilno razvijaju u zdravu biljku, izuzetno je važan redosled primene RR i trajanje tretmana. Prilikom dužeg gajenja kultura na podlozi za indukciju somatske embriogeneze može doći do smanjenja embriogenog potencijala, kao i do somaklonalnog variranja (Von Arnold i sar., 2002). Od uspešnosti protokola za indukciju somatskih embriona i njihovog daljeg razvića zavisi stopa preživljavanja i rastenja regenerisanih biljaka u uslovima *ex vitro*. Samo zreli embrioni sa normalnom morfologijom i akumuliranom dovoljnom količinom rezervnih materija mogu da se razvijaju u normalnu biljku (Von Arnold i sar., 2002).

1.1.2.1. Geni uključeni u sticanje embriogenog potencijala i proces somatske embriogeneze

Ćelije kompetentne za somatsku embriogenezu nemaju morfološku specifičnost, pa na osnovu morfoloških karakteristika nije moguće izvršiti njihovu identifikaciju

(Puigderrajols i sar., 2001; Somleva i sar., 2000). Međutim, procenu embriogenog potencijala tkiva je moguće utvrditi i pre nego što se uoče somatski embrioni zahvaljujući marker-genima čija je ekspresija specifična za somatsku embriogenezu (Mahdavi-Darvari i sar., 2015). Nakon niza molekularnih analiza identifikovan je veliki broj proteina funkcionalnih u ranom stadijumu somatske embriogeneze (Elhiti i sar., 2013). Ovi proteini su uključeni u transdukciju signala, remodeliranje hromatina, regulaciju ćelijskog ciklusa, metaboličke aktivnosti, regulaciju transkripcije, formiranje i održavanje meristema, apoptozu i organizaciju mikrotubula.

Od svih gena koji se specifično eksprimiraju tokom somatske embriogeneze, prvi je detektovan gen koji kodira receptornu kinazu označen kao *SERK* (eng. *somatic embryogenesis receptor kinase*; Schmidt i sar., 1997). Ekspresija ovog gena je detektovana tokom formiranja proembriogene mase ćelija i na globularnom stadijumu somatske embriogeneze (Schmidt i sar., 1997; Somleva i sar., 2000). Izučavanje *SERK* gena i proteina kod različitih biljnih vrsta pokazuje da se tokom evolucije očuvala visoka funkcionalnost ovog gena, sa posebnom ulogom u embriogenezi i procesima razvića somatskih embriona (Schmidt i sar., 1997; Sharma i sar., 2008). Međutim, kasnija istraživanja su pokazala da se ovaj gen eksprimira i u vegetativnim tkivima (Nolan i sar., 2003, 2009), kao i tokom procesa kaulogeneze (Thomas i sar., 2004) i odbrane od napada patogena (Hu i sar., 2005), što ukazuje da nije specifičan samo za proces somatske embriogeneze. Kasnije su klonirani i drugi geni koji se mogu koristiti kao markeri za somatsku embriogenezu. Proizvodi ovih gena imaju specifične funkcije u ranim fazama indukcije somatske embriogeneze, a njihova ektopična ekspresija indukuje pojavu somatskih embriona (Elhiti i sar., 2013). To su geni: *LEC1* i *LEC2* (eng. *leafy cotyledon*; Lotan i sar., 1998; Stone i sar., 2001), *WUS* (Zuo i sar., 2002), *BBM* (eng. *Babyboom*; Boutiler i sar., 2002), *PKL* (eng. *pickle*; Ogas i sar., 1999), *LBD29* (eng. *lateral organ boundaries domain*; Liu HI i sar., 2010), *AGL15* (eng. *Agamous like 15*; Harding i sar., 2003) itd.

1.1.2.2. Proteini kao markeri somatske embriogeneze

Analizom hranljive podloge na kojoj je gajeno embriogeno tkivo detektovani su arabinogalaktani i germin proteini (Van Hengel i sar., 2001; Rocha i Dorneles, 2013). Neki od njih imaju induktivnu, a neki inhibitornu ulogu u procesu somatske

embriogeneze. Arabinogalaktani su zastupljeni kod viših biljaka i imaju veliki broj uloga u rasteњу i razviću ćelija (Showalter, 2001), a tokom embriogeneze imaju signalnu ulogu (Thompson i Knox, 1998; Chapman i sar., 2000), mada molekularni mehanizam njihovog delovanja nije još uvek dovoljno objašnjen (Smertenko i Bozhkov, 2014). Germin proteini su identifikovani kod različitih biljnih vrsta i koriste se kao protein-markeri za indukciju somatske embriogeneze (Tchorbadjieva i sar., 2004).

1.1.2.3. Mehanizam indukcije somatske embriogeneze

Kao što je već pokazano za proces organogeneze, tokom dediferencijacije somatskih ćelija i inicijacije somatske embriogeneze dolazi do aktivacije epigenetskih mehanizama koji podešavaju reprogramiranje gena kroz proces modifikacije molekula DNK i histona (Nic-Can i sar., 2013; Smertenko i Bozhkov, 2014). RR i faktori stresa su glavni pokretači somatske embriogeneze (Pasternak i sar., 2002; Fehér i sar., 2003). Prva uočljiva promena tokom somatske embriogeneze je uspostavljanje asimetrične polarne strukture, koju čine embrion i suspensor. Suspensor igra važnu ulogu u uspostavljanju apikalno-bazalne ose embriona (Zimmerman, 1993). Da bi se somatska embriogeneza pravilno odvijala, proliferacija ćelija i formiranje embriona mora biti u ravnoteži sa diferencijacijom ćelija i programiranom ćelijskom smrću suspensora (Bozhkov i sar., 2005).

Od svih RR auksini imaju najznačajniju ulogu u indukciji somatske embriogeneze (Friml i sar., 2003). Grupe gena koje imaju važnu ulogu u omogućavanju ćelije da odgovori na prisustvo auksina su *Aux/IAA*, *ARF*, *GH3* (eng. *Gretcher Hagen 3*) i *SAUR* (eng. *small auxin-up RNA*; Woodward i Bartel, 2005; Teale i sar., 2006). Neki od SAUR proteina imaju sposobnost da se vežu za kalmodulin (CaM) i tako učestvuju u regulaciji somatske embriogeneze (Popescu i sar., 2007). Primena 2,4-D održava visok nivo ekspresije *SERK* gena i time ukazuje da regulacija ekspresije i ovog gena zavisi od auksina (Zhang i sar., 2011).

Kod nekih biljnih vrsta ABA može indukovati somatsku embriogenezu (Nishiwaki i sar., 2000; Stasolla i sar., 2002), verovatno povećanjem nivoa auksina (Rai i sar., 2011). ABA indukuje ekspresiju gena koji zatim regulišu ekspresiju *ECP* gena

(eng. *embryogenic cell protein*). ECP protein ima još uvek nerazjašnjenu ulogu u povećanju embriogenog potencijala ćelije (Shiota i sar., 1998; Shiota i Kamada, 2000).

Joni kalcijuma (Ca^{2+}) učestvuju u odgovoru biljne ćelije na različite stimulse (Batistič i Kudla, 2012). Istraživanja koja su sproveli Overvoorde i Grimes (1994) su pokazala da je kompleks Ca-CaM lokalizovan u regionu apikalnog meristema somatskih embriona i da je nivo CaM iRNK značajno veći u somatskim embrionima na različitim stadijumima razvika u odnosu na nediferencirani kalus.

Geni *LEC1* i *LEC2* su transkripcioni faktori koji regulišu rane stupnjeve razvika zigotskih embriona, određuju identitet ćelija suspenzora i kotiledona embriona i sprečavaju prerano klijanje embriona (Lotan i sar., 1998; Stone i sar., 2001, 2008). Ektopična ekspresija *LEC* gena izaziva regeneraciju somatskih embriona iz vegetativnih ćelija (Stone i sar., 2001; Chiappetta i sar., 2009; Guo i sar., 2013), čak i u odsustvu auksina (Stone i sar., 2001), pošto *LEC2* indukuje ekspresiju *YUC* gena koji kodiraju enzime za biosintezu auksina (Wójcikowska i sar., 2013; Wójcikowska i Gaj, 2015). Stoga se smatra da je *LEC2* gen glavni regulator embriogeneze.

Indukcija somatske embriogeneze se može razmatrati i kao stresan događaj za biljnu ćeliju s obzirom da je tokom ove faze zabeležena povišena akumulacija transkripata GST (eng. *Glutathione S-transferase*; Singla i sar., 2007).

Dosadašnja istraživanja su doprinela da se rasvetli većina glavnih događaja tokom somatske embriogeneze. Povećao se broj poznatih činjenica o molekularnim aspektima ovog procesa. Utvrđeni su specifični molekularni markeri, zatim su otkriveni mehanizmi regulacije somatske embriogeneze kroz integraciju različitih odgovora. Dalji nastavak istraživanja u ovom pravcu će omogućiti rasvetljavanje procesa reprogramiranja ekspresije gena tokom dediferenciranja somatske ćelije (Rocha i Dornelas, 2013). Korišćenje savremenih tehnika u istraživanju će omogućiti ranu identifikaciju embriogene kompetencije somatskih ćelija i poboljšanu propagaciju rekalcitrantnih biljnih vrsta (Mahdavi-Darvari i sar., 2015).

1.2. Citokinini

Citokinini su grupa RR neophodnih za pravilno rastenje i razviće biljaka (Mok i sar., 2000). Otkriveni su polovinom XX veka kao faktori koji stimulišu ćelijsku deobu u kulturi tkiva duvana (Miller i sar., 1955). Od tada je ustanovljeno da citokinini regulišu mnoštvo fizioloških procesa: *de novo* formiranje pupoljaka, oslobađanje pupoljaka od apikalne dominacije, odlaganje procesa starenja, klijanje semena, indukciju ćelijske deobe i formiranje hloroplasta (Mok, 1994; Van Staden i sar., 2008). Takođe, citokinini učestvuju i u regulaciji aktivnosti ključnih gena odgovornih za metabolizam biljaka (Mazid i sar., 2011).

Citokinini obuhvataju dve grupe jedinjenja koje se razlikuju po strukturi: derivati purinske baze adenina na čijem se atomu N⁶ nalazi izoprenoidni ili aromatični bočni lanac i derivati feniluree (Van Staden i sar., 2008). Iako postoje brojni citokinini koji su danas dostupni, potraga za novim jedinjenjima, koja će biti još efikasnija sa minimalnim neželjenim uticajima i sa što pristupačnijom cenom, još uvek traje (Aremu i sar., 2012b; Motte i sar., 2013; Amoo i sar., 2015; Plíhalová i sar., 2015).

Na osnovu porekla citokinini se dele u dve velike grupe: prirodni i sintetički. Od prirodnih citokinina najčešće se koriste: *trans*-zeatin (4-hidroksi-3-metil-*trans*-2-butenilaminopurin; ZEA), 2-iP (N⁶- Δ^2 izopenteniladenin) i dihidrozeatin (6-(4-hidroksi-3-metil-*trans*-2-butenilaminopurin). Zbog prisustva dvogube veze u bočnom lancu, molekul zeatina ima dve konformacije, *cis* i *trans*, ali se u prirodi češće javlja *trans* u odnosu na *cis* izomer. Zeatin-ribozid je izrazito aktivan prirodni citokinin (Van Staden i sar., 2008).

Citokinini se javljaju kao slobodni molekuli u biljkama, ali mogu biti vezani za molekule tRNK u citoplazmi i hloroplastu. Koren je glavno mesto biosinteze citokinina (Van Staden i Davey, 1979). Jedinjenja citokinina se iz korena putem ksilema lako transportuju do drugih biljnih organa i ćelija. Sinteza citokinina se odvija i u drugim delovima biljke koji se odlikuju visokom biosintetskom aktivnošću: meristemi izdanka i semena u razvoju (Letham, 1994). U tkivu izdanka se sintetiše značajno manje citokinina nego u vrhovima korenova i ta količina nije dovoljna da održi njihovo rastenje u kulturi *in vitro* (Van Staden i sar., 2008).

Iako se koriste u istraživanjima, prirodni citokinini ZEA i 2-iP se ne koriste u komercijalnim laboratorijama iz ekonomskih razloga (Van Staden i sar., 2008). Među komercijalno dostupnim citokininima, 6-benziladenin (BA) se najčešće koristi zbog niske cene i visoke efikasnosti u indukciji regeneracije *in vitro* kod brojnih biljnih vrsta (Van Staden i sar., 2008). Međutim, BA često može da prouzrokuje morfološke i fiziološke poremećaje kod biljaka, kao što je hiperhidriranost (Bairu i sar., 2007) ili da nepovoljno utiče na rizogenezu i kasniju aklimatizaciju biljaka dobijenih u procesu mikropropagacije (Werbrouck i sar., 1995; Valero-Aracama i sar., 2010).

Nedavno je potvrđeno da topolini po efikasnosti i ceni predstavljaju dobru alternativu BA (Aremu i sar., 2012a; 2012b, Amoo i sar., 2015; Plíhalová i sar., 2015). Metabolizam topolina se razlikuje od BA (Strnad i sar., 1997). Glavni derivati *meta*-topolina (*mT*) su O-glukozidi, koji se metabolizuju mnogo brže nego N-glukozidi (glavni derivati BA) i ravnomerno se distribuiraju kroz celu biljku, tako da su manje štetni za regenerisane biljke u odnosu na BA (Werbrouck i sar., 1996). Većina problema na koje se nailazi prilikom uspostavljanja protokola za mikropropagaciju su uspešno rešeni primenom *mT* (Amoo i sar., 2011, 2015; Aremu i sar., 2012c; Gentile i sar., 2014). Novosintetisani derivati topolina MemTTHP (*meta*-Metoksi topolin 9-tetrahidropiran-2-il) i *mTTHP* (*meta*-Topolin tetrahidropiran-2il) su vrlo efikasni za mikropropagaciju biljaka, stimulaciju *ex vitro* rizogeneze i kasniju aklimatizaciju biljaka (Aremu i sar., 2012c; Amoo i sar., 2015). *mT* pozitivno utiču na fotosintetske parametre, što takođe doprinosi boljoj aklimatizaciji dobijenih regeneranata (Aremu i sar., 2012d; Amoo i sar., 2015). Osim toga, problem hiperhidriranosti kod biljaka gajenih u uslovima *in vitro* može uspešno da se kontroliše uz upotrebu *mT* (Bairu i sar., 2007).

Derivati feniluree, N-(2-hloro-4-piridil)-N'-fenilurea (CPPU), a posebno N-fenil-N'-1,2,3tiadiazol-5-urea (tidiazuron, TDZ), imaju izraženu citokininsku aktivnost, iako njihova hemijska struktura nije slična prirodnim citokininima u čijoj osnovi se nalazi adenin (Murthy i sar., 1998; Van Staden i sar., 2008). TDZ je registrovan 1976. godine kao defolijant (Arndt i sar., 1976), a njegova citokininska aktivnost je zapažena 1982. godine. TDZ deluje pri nižim koncentracijama i brže u odnosu na derivate adenina, tako da efikasno indukuje morfogenezu pupoljaka i/ili somatskih embriona kod velikog broja

biljnih vrsta, uključujući i rekalcitrantne vrste, poput žitarica (Murthy i sar., 1998; Schulze, 2007). TDZ može da indukuje širok spektar fizioloških odgovora kod biljaka, tako da predstavlja efikasnu supstituciju zajedničkog delovanja auksina i citokinina (Visser i sar., 1992). Kao i BA, TDZ takođe može da uzrokuje izduživanje izdanaka, ali i da inhibira proces rizogeneze, verovatno usled dugotrajnog zadržavanja u biljnom tkivu (Makara i sar., 2010). Iz istog razloga, delovanje TDZ je produženo i posle subkultivisanja na podlogu bez RR, na kojoj regeneranti nastavljaju da se umnožavaju (Makara i sar., 2010).

Murch i sar. (1999) su ustanovili da TDZ efikasno stimuliše različite biohemijske puteve u kojima nastaju specifični metaboliti neophodni za proces somatske embriogeneze. Ova istraživačka grupa smatra da su tokom ovog regenerativnog procesa odgovor na indukovani fiziološki stres i odgovarajuće promene u metaboličkim procesima zajedno uključeni u jednu komponentu. Istraživanja koje su sproveli Jones i sar. (2007) su doprinela dobijanju novih informacija o metaboličkim procesima tokom regeneracije indukovane TDZ-om, koji uključuju početne signalne događaje, akumulaciju i transport signalnih molekula kao što su auksin i melatonin, sistem sekundarnih glasnika i istovremeni odgovor na stresne uslove.

Zhang i sar. (2006) su ustanovili da TDZ indukuje ekspresiju gena koji kodiraju trehaloza-6-fosfat fosfatazu (TPP), 1-aminociklopropan-1-karboksilat sintazu (ACS) i prolin dehidrogenazu, a koji se ekspimiraju pri stresnim uslovima. Aktivnost ovih gena pokreće niz reakcija koje dovode do morfogenetских promena. Murthy i sar. (1998) su pretpostavili da TDZ u kulturi tkiva indukuje stres.

Na osnovu brojnih istraživanja zaključeno je da biljne vrste različito odgovaraju na prisustvo citokinina. Kao posledica toga, potrebno je za svaku biljnu vrstu pronaći optimalan tip i koncentraciju citokinina koji će dovesti do efikasne regeneracije i omogućiti kasniju uspešnu aklimatizaciju regenerisanih biljaka. Usvajanje, transport i metabolizam primenjenih citokinina se razlikuju kod sorti iste biljne vrste, kao i kod različitih eksplantata, zbog interakcije sa endogenim citokininima u eksplantatima (Strnad i sar., 1997; Van Staden i sar., 2008; Magyar-Tábori i sar., 2010).

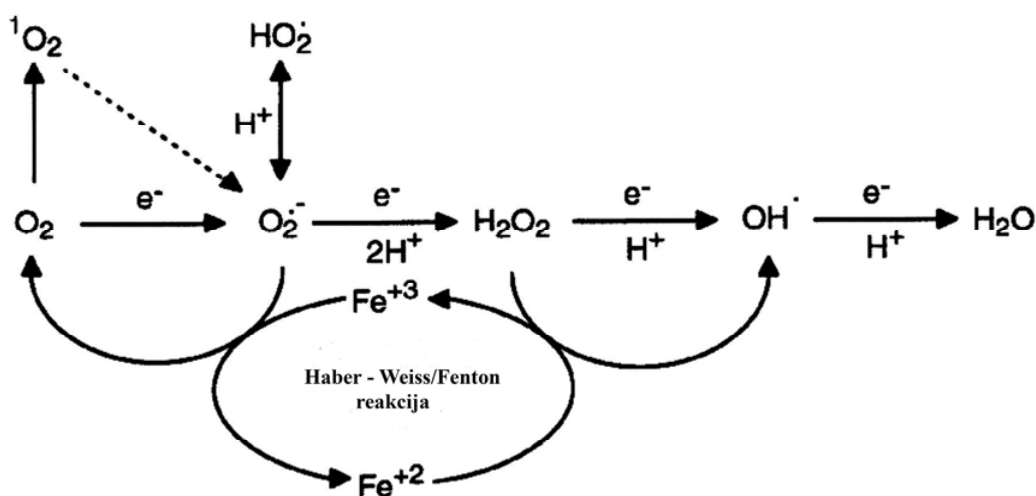
Citokinini posreduju u odgovoru na brojne spoljne faktore, kao što su svetlosni uslovi, dostupnost hranljivih materija i vode u korenu. Osim toga imaju i važnu ulogu u odgovoru biljaka na abiotički i biotički stres. Regulacija svih ovih aktivnosti doprinosi finom podešavanju regulacije rastenja i razvića biljaka (Werner i Schmölling, 2009).

Citokinini deluju preko specifičnog receptora, histidin kinaze koja je homologa bakterijskoj dvokomponentnoj senzornoj kinazi. Nakon percepcije signala započinje kaskada događaja čiji je rezultat fosforilacija AHP proteina (*A. thaliana* histidin fosfotransfer protein). Ovako aktivirani AHP protein se prebacuje iz citoplazme u jedro i pritom aktivira ARR proteine B tipa, što dovodi do deaktivacije ciljnih gena uključenih u regulaciju ćelijske deobe, formiranje izdanaka i odlaganje procesa starenja (Werner i Schmölling, 2009). Za održavanje homeostaze citokinina odgovorna je citokinin oksidaza/dekarboksilaza (Motyka i Kamínek, 1990; Kamínek i sar., 1997; Werner i sar., 2010).

1.3. Oksidativni stres

Za sve životne procese biljkama je potrebna energija koja se efikasno formira uz prisustvo kiseonika (Vranová i sar., 2002). Međutim, tokom redukcije O_2 do H_2O nastaju reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive oxygen species*, ROS; Sl. 1) kao sporedni proizvodi mnogih reakcija metabolizma, kao što su fotosinteza i disanje (Ahmad i sar., 2010). ROS obuhvataju slobodne radikale: superoksid radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal (OH \cdot) i perhidroksi radikal (HO_2^{\cdot}), kao i molekulske forme: singlet kiseonik (1O_2) i vodonik peroksid (H_2O_2 ; Gill i Tuteja, 2010). Singlet kiseonik (1O_2) predstavlja izuzetno reaktivan molekul koji je sposoban da energiju ekscitacije prenese na druge biološke molekule. 1O_2 koji nastane tokom procesa fotosinteze može da ošteti fotosistem I i II i da pritom negativno utiče na ceo proces (Gill i Tuteja, 2010). Superoksid radikal ($O_2^{\cdot-}$) je umereno reaktivan kratkoživeći ROS koji nema sposobnost prolaska kroz biološke membrane. Od svih ROS najčešće prvi nastaje upravo $O_2^{\cdot-}$ (Gill i Tuteja, 2010). Ovaj radikal može da preda elektron jonu gvožđa Fe^{3+} , pri čemu nastaje redukovana forma Fe^{2+} koja omogućava odigravanje prvih koraka u Haber-Weiss/Fentonovoj reakciji (Gill i Tuteja, 2010). Vodonik peroksid (H_2O_2) je umereno reaktivan, relativno dugoživeći molekul (sa poluživotom 1 ms), koji difuzijom može da pređe određena rastojanja od mesta nastanka. Najreaktivniji od svih ROS je hidroksil

radikal (OH^\cdot) koji se formira iz H_2O_2 tokom Fentonove reakcije (Sl. 1; Vranová i sar., 2002; Gill i Tuteja, 2010). OH^\cdot može da reaguje sa većinom bioloških molekula i pošto ćelije nemaju mehanizme da uklone ovaj ROS, njegova prekomerna produkcija dovodi do ćelijske smrti (Vranová i sar., 2002).



Slika 1. Interkonverzija ROS koji su nastali redukcijom O_2 do H_2O (preuzeto i modifikovano iz Vranová i sar., 2002).

Izrazite promene faktora spoljašnje sredine izazivaju stres kod biljaka i dovode do promena u razviću, fiziološkim i biohemijskim procesima (Jaleel i sar., 2008; Tuteja i sar., 2009). Abiotički i biotički stres, kao što su povišen salinitet, UV radijacija, suša, prisustvo teških metala, ekstremna temperatura, primena herbicida i prisustvo patogena, izazivaju prekomernu produkciju ROS, koji zatim vrše oksidaciju proteina, peroksidaciju lipida i oštećenje molekula DNK (Mittler, 2002; Gill i Tuteja, 2010). Oksidativni stres se javlja u trenutku uspostavljanja disbalansa između nastanka ROS i aktivnosti antioksidativnog sistema zaštite (Ahmad i sar., 2010). U uslovima stresa koncentracija ROS se izrazito povećava u hloroplastima, mitohondrijama i peroksisomima u poređenju sa njihovim nastankom tokom normalnih uslova rastenja i razvića (Ahmad i sar., 2010; Gill i Tuteja., 2010). ROS mogu da izmene molekul DNK izazivanjem direktne oksidacije ili indirektnom modifikacijom ovog molekula (Ahmad i sar., 2010). Ustanovljeno je da ROS utiču na ekspresiju određenog broja gena i da na taj način kontrolišu rastenje, ćelijski ciklus, razviće i proces programirane ćelijske smrti

(Gill i Tuteja, 2010). Mitohondrijalna DNK je osetljivija na oksidativna oštećenja u odnosu na jedarnu DNK, i to pre svega zbog odsustva hromatinske organizacije i smanjene sposobnosti reparacije molekula DNK u mitohondrijama (Yakes i Van Houten, 1997).

1.3.1. Odbrambeni mehanizmi biljaka

Biljke su razvile efikasne sisteme odbrane od ROS, uključujući mehanizme kojima se ograničava formiranje ROS, kao i mehanizme kojima ih uspešno uklanjaju (Alscher i sar., 2002). Sistemi za neutralizaciju efekta oksidativnog stresa obuhvataju enzimsku i neenzimsku komponentu (Ahmad i sar., 2010). Najznačajniji enzimski antioksidansi su superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (POD) i glutation reduktaza (GR), ali u uklanjanju ROS učestvuju i monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), glutation S-transferaza (GST) i glutation peroksidaza (GPX). Neenzimski antioksidansi su askorbinska kiselina (vitamin C), glutation (GSH), α -tokoferol (vitamin E), karotenoidi i flavonoidi (Mittler i sar., 2004; Gill i Tuteja, 2010). Uobičajeno je da svaki deo ćelije sadrži više od jedne enzimske komponente (Ahmad i sar., 2010).

SOD je metaloenzim prisutan u svim aerobnim organizmima i predstavlja najefikasniji enzimski antioksidans. Uključen je u prvu liniju odbrane od povećane koncentracije ROS. SOD katalizuje sledeću reakciju: $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ kojom se uspešno uklanja $O_2^{\cdot -}$ (McCord i Fridovich, 1969). SOD su na osnovu jona metala koji se nalazi u aktivnom centru klasifikovani u tri grupe: bakar/cink (Cu/Zn-SOD), mangan (Mn-SOD) i gvožđe (Fe-SOD; Scandalios, 1993). Cu/Zn-SOD je lociran u citosolu i hloroplastu, dok je Mn-SOD lociran u matriksu mitohondrija i peroksizomima. U genomu *A. thaliana* identifikovana su tri gena koja kodiraju Cu/Zn-SOD, tri za Fe-SOD i jedan za Mn-SOD (Kliebenstein i sar., 1998)

CAT je tetramerni enzim, pri čemu svaka subjedinica sadrži molekul hema. Ovaj enzim učestvuje u reakciji u kojoj se H_2O_2 direktno prevodi u H_2O i O_2 i na taj način se uklanja H_2O_2 koji je nastao u peroksizomima (Halliwell, 1974). CAT se dele u tri klase: CAT klase I se nalaze u fotosintetičkom tkivu i uključene su u uklanjanje H_2O_2 koji je nastao tokom fotorespiracije; klasa II ima važnu ulogu u lignifikaciji i nalaze se u

vaskularnom tkivu; klasa III je najzastupljenija u semenima i mladim biljkama i njihova aktivnost je povezana sa uklanjanjem prekomerne koncentracije H_2O_2 koji nastaje tokom degradacije masnih kiselina (Willekens i sar., 1994). Kod svih do nedavno ispitivanih skrivenosemenica prisutna su tri gena za CAT (Mhamdi i sar., 2010). Ekspresija CAT gena je prostorno i vremenski regulisana, tkivno specifično, zavisno od stadijuma razvića i uticaja faktora stresa iz okruženja (Scandalios, 1987).

POD pripada grupi izoenzima otkrivenih kod svih biljaka. To su glikoproteinski enzimi koji sadrže hem. U opštem slučaju POD učestvuje u uklanjanju H_2O_2 i katalizuje sledeću reakciju oksidacije supstrata: $H_2O_2 + 2RH \rightarrow 2H_2O + 2R^{\cdot}$ (Nakano i Asada, 1980). POD su grupisane u tri klase na osnovu razlika u primarnoj strukturi. Klasa I obuhvata superfamiliju POD biljaka, gljiva i bakterija, među kojima se izdvaja askorbat peroksidaza (APX) i citohrom c POD. Klasa II obuhvata ekstracelularne POD gljiva, kao što je lignin POD dok klasu III čine osnovne biljne POD (Welinder, 1992). Svaka biljna vrsta ima različit broj izoenzima POD, koji se razlikuju po specifičnosti prema supstratu i lokalizaciji unutar biljne ćelije (Conroy i sar., 1982). Kod *A. thaliana* čak 73 gena kodiraju različite izoforme POD (Tognolli i sar., 2002). Prisustvo izoenzimskih formi je tkivno-specifično i menja se pod uticajem faktora stresa (Lagrimini i Rothstein, 1987). Neke POD imaju vrlo specifičnu ulogu, npr. u diferenciranju trahearnih elemenata, pa se smatraju markerom ovog procesa (López-Serrano i sar., 2004; Sato i sar., 2006). Kisele POD učestvuju u polimerizaciji lignina, polisaharida i proteina u ćelijskom zidu, kao i u procesima diferencijacije (Epstein i Lamport, 1984). Povećana aktivnost POD je detektovana u zoni intezivnih deoba ćelija lista kukuruza (De Souza i MacAdam, 1998). Same POD mogu indukovati produkciju ROS (Kagan i sar., 1990), jer katalizuju nastanak aromatičnih oksil radikala iz nekih aromatičnih jedinjenja u apoplastu (Takahama i Yoshitama, 1998)

Među POD koje učestvuju u redukciji H_2O_2 do vode, razlikuje se više tipova enzima u zavisnosti od tipa molekula koji u ovoj reakciji donira elektrone. APX ima veoma važnu ulogu u uklanjanju ROS i zaštiti ćelije kod većine organizama. Ovaj enzim koristi askorbat kao donor elektrona (Asada, 1999), a u okviru ove grupe enzima ubraja se pet različitih izoformi koje su locirane u različitim delovima ćelije (Noctor i Foyer, 1998). APX ima veći afinitet prema H_2O_2 nego CAT i zbog toga ima značajnu

ulogu u regulaciji prisustva ROS u uslovima stresa (Chen i Asada, 1989; Yoshimura i sar., 1998). Slično, GPX pripada velikoj grupi izoenzima koji koriste glutation za redukciju H_2O_2 i na taj način smanjuju nivo oksidativnog stresa u biljnim ćelijama (Noctor i sar., 2002).

GR je flavoproteinska oksidoreduktaza koja ima važnu ulogu u odbrambenom sistemu ćelija od ROS. Prvenstveno se ovaj enzim nalazi u hloroplastima, ali je delom lociran i u citosolu i mitohondrijama (Edwards i sar., 1990). GR katalizuje redukciju glutation disulfida (GSSG) do GSH koristeći NADPH kao donor elektrona (Chalapathi Rao i Reddy, 2008).

1.3.2. Uticaj ROS na rastenje i razviće biljnih organizama

Pored svih do sada nabrojanih reakcija u biljnoj ćeliji u kojima učestvuju, ROS imaju i vrlo značajnu ulogu u prenosu signala i održavanju homeostaze. Lumbreras i sar. (2010) su ustanovili da povećanje koncentracije ROS povećava aktivnost određenih protein kinaza koje se aktiviraju mitogenom (eng. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK), a koje su značajne za pravilan odgovor biljke na stres. Uspostavljanje veze između sekundarnih glasnika (prvenstveno se odnosi na ROS), RR i MAPK omogućava opstanak i prilagođavanje biljaka na različite uslove stresa (Barba-Espín i sar., 2011; Smékalová i sar., 2014).

Pokazano je da H_2O_2 , kao najčešći medijator odgovora na stres, dovodi do aktivacije MAPK, koje zatim utiču na ekspresiju odgovarajućih gena i dalje prenošenje ćelijskog odgovora (Desikan i sar., 1999). Nakon identifikacije mnogobrojnih gena na čiju ekspresiju utiče H_2O_2 ustanovljeno je da nisu svi ti geni direktno uključeni u odbranu od oksidativnog stresa, već da se aktivnost nekih od njih može objasniti povezanošću oksidativnog stresa i procesa razvića (Desikan i sar., 2001).

Interakcija između signalnih puteva ROS i različitih faktora iz okruženja biljke uključuje i vrlo kompleksnu interakciju signalnih puteva biljnih hormona (Xia i sar., 2015). Mnogi fiziološki procesi u biljci (koja nije izložena stresu) koji su regulisani RR, se odvijaju i zahvaljujući kontrolisanoj i koordinisanoj produkciji ROS. ROS imaju esencijalnu funkciju u formiranju korenskih dlaka (Foreman i sar., 2003), grananju izdanaka (Sagi i sar., 2004), remodelovanju ćelijskog zida (Schopfer, 2001),

gravitropskoj reakciji (Joo i sar., 2001), održanju RAM (Jiang i sar., 2003; Heyman i sar., 2013), regulaciji ćelijskog ciklusa (Vernoux i sar., 2000), pravilnom rasteњу korenova (Gapper i Dolan, 2006; Tsukagoshi i sar., 2010). U ovim procesima važnu ulogu imaju ROS koje nastaju u reakciji koju katalizuju NADPH oksidaze (Gapper i Dolan, 2006). Na primer, OH^\cdot reguliše rasteње biljne ćelije tako što dovodi do razmicanja polimera ksilogluktana i na taj način omogućava širenje ćelijskog zida (Fry, 1998). Osim toga, prostorna regulacija nastanka ROS je važna za determinaciju oblika organa (Gapper i Dolan, 2006).

ROS interaguje sa signalnim putevima svih biljnih hormona, ali je za normalno funkcionisanje fizioloških procesa u biljci i adaptaciju biljaka na preživljavanje u odgovarajućem ambijentu posebno važna interakcija ROS sa auksinima (Pasternak i sar., 2005; Xia i sar., 2015). ROS i auksini kontrolišu remodelovanje ćelijskog zida (Schopfer, 2001), gravitropsku reakciju (Joo i sar., 2001) i održanje RAM (Jiang i sar., 2003; Heyman i sar., 2013). Maksimum auksina povećava nivo oksidativnog statusa u matičnim ćelijama RAM (eng. *quiescent centre* - QC), i time omogućava održanje RAM (Jiang i sar., 2003; Heyman i sar., 2013). Smatra se da se deoba QC ćelija aktivira promenom redoks gradijenta u odnosu na okolno tkivo (Heyman i sar., 2013). Ćelijski redoks status reguliše ćelijski ciklus (Vernoux i sar., 2000). ROS određuju i lokalizaciju tranzicione zone u meristemu korena gde prestaju deobe i počinje izduživanje ćelija. Ovaj proces kontroliše odnos O_2^- , koji se akumulira u zoni deoba ćelija korena, i H_2O_2 , koji se akumulira u zoni izduživanja korena. Oba molekula formiraju suprotne gradijente distribucije, koji određuju lokalizaciju tranzicione zone (Dunand i sar., 2007; Tsukagoshi i sar., 2010). O_2^- je neophodan za održavanje proliferacije ćelija, dok je za pokretanje diferencijacije ćelija neophodan povišen nivo H_2O_2 (Tsukagoshi i sar., 2010).

Kad su biljke izložene uslovima stresa, ROS utiču na smanjenje nivoa auksina, oksidativnom inaktivacijom ili degradacijom auksina ili smanjenjem ekspresije gena uključenih u polarni transport i signalni put auksina, što omogućava biljci da se prilagodi uslovima u okruženju (Potters i sar., 2007; Blomster i sar., 2011; Peer i sar., 2013). Dodatno, POD su uključene i u katabolizam auksina, jer vrše oksidativnu dekarboksilaciju IAA (Hinman i Lang, 1965). Barba-Espín i sar. (2010, 2011) su

pokazali da interakcija H_2O_2 i RR ima značajnu ulogu tokom razvića klijanaca graška i u tom procesu H_2O_2 posreduje u smanjenju koncentracije ABA i zeatin ribozida.

ROS kao sekundarni glasnici posreduju u transdukciji ABA signala (Neill i sar., 2008; Wang i Song, 2008). Na nivou cele biljke ABA poboljšava otpornost biljke na sušne uslove tako što povećava aktivnost antioksidativnih enzima (Zhang i sar., 2009). ABA i H_2O_2 imaju antagonističko dejstvo na klijanje semena. ABA inhibira klijanje, dok H_2O_2 prekida dormanciju semena kod nekoliko biljnih vrsta (Wang i sar., 1998; Liu Y i sar., 2010). H_2O_2 smanjuje dormanciju semena ječma regulacijom ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA (Bahin i sar., 2011).

Kod transgenih biljaka duvana sa visokim sadržajem endogenih citokinina (transformisanih genom za izopentenil transferazu - *ipt*) uočena je povećana aktivnost antioksidativnih enzima (CAT, POD i GR) u odnosu na kontrolne biljke (Synková i sar., 2004). Autori su pokazali da je povišen sadržaj citokinina uzrokovao stres i stimulisao odbrambeni sistem ovih biljaka (Synková i sar., 2004). Ove rezultate su kasnije potvrdili Schnablová i sar. (2006), koji su pored povećane aktivnosti POD detektovali i povećan sadržaj fenolnih jedinjenja. Citokinini povećavaju aktivnost antioksidativnih enzima i redukuju nivo H_2O_2 u tkivu listova pšenice tokom odlaganja procesa starenja (Zavaleta-Mancera i sar., 2007). Značaj citokinina za održavanje bezbednog nivoa H_2O_2 u biljnoj ćeliji i njihov uticaj na antioksidativnu aktivnost biljnog tkiva su potvrdili i drugi istraživači (Cueno i sar., 2012; Amoo i sar., 2014).

1.3.3. Uticaj ROS na indukciju morfogeneze u uslovima *in vitro*

Pre više od dve decenije Siminis i sar. (1994) su testirali hipotezu da oksidativni stres može biti odgovoran za pojavu rekalcitrantnosti protoplasta pojedinih biljnih vrsta. Kasnije je potvrđeno da je ukupna aktivnost antioksidativnih enzima povećana u protoplastima koji imaju sposobnost regeneracije, za razliku od protoplasta koji nemaju tu sposobnost (de Marco i Roubelakis-Angelakis, 1996). Regenerativni kapacitet protoplasta je u korelaciji sa visokom aktivnošću NADH-peroksidaze, koja dovodi do akumulacije H_2O_2 u ćelijama, čiji nivo značajno utiče na regenerativni kapacitet protoplasta (de Marco i Roubelakis-Angelakis, 1996; Papadakis i Roubelakis-Angelakis, 1999). Smanjenje totipotencije protoplasta je u korelaciji sa smanjenjem

aktivnosti antioksidativnog sistema (Papadakis i sar., 2001; Xu i sar., 2013). Papadakis i Roubelakis-Angelakis (2002) su ustanovili korelaciju između oksidativnog stresa, ROS i rekonstitucije ćelijskog zida, dediferencijacije ćelije, progresije ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti. Smanjenje aktivnosti antioksidativnih sistema i promena stanja homeostaze određuje sudbinu protoplasta (ponovni ulazak u ćelijski ciklus ili ćelijsku smrt). Na ekspresiju totipotentnosti protoplasta utiče i nivo unutarćelijskih poliamina, koji su uključeni u različite procese rastanja i razvića kod viših biljaka, kao i u procese adaptacije na stresne uslove (Papadakis i sar., 2005).

Do pojave rekalcitrantnosti kultivisanih tkiva može doći i usled povišenog sadržaja ROS. Primećeno je da njihov nivo varira tokom održavanja kultura (Benson, 2000). Važno je napomenuti da se tokom dediferencijacije ćelije povećava produkcija ROS. Do oksidativnog stresa može doći ako je iz nekog razloga ugrožen ćelijski sistem antioksidativne zaštite, nakon toga ROS započinje reakciju sa DNK, enzimima i proteinima što dovodi do niza promena, pa tako i do pojave rekalcitrantnosti eksplantata (Benson, 2000; Cassells i Curry, 2001).

Nakon pregleda dostupne literature i rezultata različitih istraživačkih grupa objavljenih u poslednjih 15 godina može se zaključiti da ROS kod različitih biljnih vrsta utiču na indukciju organogeneze (Abbasi i sar., 2011; Bonfill i sar., 2003; Dutta Gupta i Datta, 2003/4; Filipović i sar., 2015; Mitrović i sar., 2012; Subhashini Devi i sar., 2013; Tian i sar., 2003; Vatankhah i sar., 2010), somatske embriogeneze (Blazquez i sar., 2009; Dutta Gupta i Datta, 2003/4; Filipović i sar., 2015; Kairong i sar., 1999; Luo i sar., 2001), androgenoze (Žur i sar., 2014), kao i na proces umnožavanja izdanaka (Díaz-Vivancos i sar., 2011; Faisal i Anis, 2009), a zatim i na procese ožiljavanja (Molassiotis i sar., 2004) i aklimatizacije (Bařková i sar., 2008).

I pored vrlo obimnih istraživanja i značajnih saznanja koja su tokom tih istraživanja stečena, nema jasne slike o ulozi različitih komponenti antioksidativnog sistema u procesima morfogeneze. Naprotiv, rezultati ovih istraživanja su često kontradiktorni. Iako je korelacija između promene nivoa ROS i indukcije morfogenetskih procesa nedvosmisleno demonstrirana, kao između nivoa OH^\cdot i indukcije somatske embriogeneze kod lana (Obert i sar., 2005) ili nivoa H_2O_2 i somatske embriogeneze kod *Lycium barbarum* ili kaulogeneze kod jagode (Kairong i

sar., 1999; Tian i sar., 2003), detektovan je različit trend promene aktivnosti antioksidativnih enzima tokom ovih procesa. Kod *L. barbarum* je pokazano da je za indukciju somatske embriogeneze vrlo značajno unutarćelijsko prisustvo H₂O₂ (Kairong i sar., 1999). U skladu s tim, kod *Astragalus adsurgens* dodatak salicilne kiseline, koji je izazvao značajno povećanje nivoa endogenog H₂O₂, je značajno povećao embriogeni potencijal kalusa (Luo i sar., 2001). U kalusima jagode sa različitim regenerativnim kapacitetom ustanovljeno je da nastanak H₂O₂ koincidira sa pojavom meristemoida i formiranjem pupoljaka, ali da egzogeno dodat H₂O₂ neznatno poboljšava efikasnost regeneracije (Tian i sar., 2003).

Aktivnost SOD je rasla tokom rane faze kaulogeneze kod jagode (Tian i sar., 2003), *Brassica rapa* var. *turnip* (Abbasi i sar., 2011) i *Sterculia urens* (Subhashini Devi i sar., 2013), kao i ranih stadijuma diferencijacije somatskih embriona *L. barbarum* (Kairong i sar., 1999) i *Crocus sativus* (Blazques i sar., 2009). Aktivnost POD je neprestano rasla u kalusima *S. urens* tokom procesa kaulogeneze (Subhashini Devi i sar., 2013), dok je u kaulogenim kalusima jagode počinjala da raste tek nakon pet dana indukcionog tretmana (Tian i sar., 2003). Kod *L. barbarum* aktivnost POD je bila visoka u embriogenom kalusu, da bi već u prvim danima diferencijacije somatskih embriona naglo opadala (Kairong i sar., 1999). Tokom procesa kaulogeneze aktivnost CAT je bila povećana kod *B. rapa* (Abbasi i sar., 2011) i *S. urens* (Subhashini Devi i sar., 2013), dok je kod jagode konstantno opadala (Tian i sar., 2003), kao i tokom somatske embriogeneze *L. barbarum* (Kairong i sar., 1999). Nasuprot procesu somatske embriogeneze kod *C. sativus*, tokom procesa kaulogeneze kod ove biljne vrste je detektovana smanjena aktivnost SOD, dok je aktivnost CAT bila povećana, kao i tokom somatske embriogeneze (Vatankhah i sar., 2010). Aktivnost POD je takođe bila povećana (Vatankhah i sar., 2010). Ovakav trend aktivnosti antioksidativnih enzima uočen je i tokom direktne kaulogeneze kod *Tacitus bellus* (Mitrović i sar., 2012) i indirektno kaulogeneze kod *Anethum graveolens* (Jana i Shekhawat, 2012).

Tokom morfogeneze *in vitro* iz lukovica vrste *Fritillaria meleagris* L. najveća aktivnost SOD i CAT je detektovana na samom početku procesa morfogeneze, dok je najveća aktivnost POD zabeležena u eksplantatima neposredno nakon izolacije (Petrić i sar., 2014). Osim toga, detektovana je povećana aktivnost SOD, CAT i POD sa

snižavanjem temperature tokom prekida dormancije lukovica ove vrste (Petrić i sar., 2013).

Promena aktivnosti enzima antioksidativnog sistema je uočena i u drugim fizioloških procesima. Kod vrste *A. sativum* zabeležena je najveća aktivnost POD na početku procesa formiranja lukovica u uslovima *in vitro* (Goleniowski i sar., 2001). Molassiotis i sar. (2004) su ustanovili promenu u aktivnosti POD i CAT tokom ožiljavanja kod *Prunus amygdalus* x *P. persica* u uslovima *in vitro*. Tokom aklimatizacije su takođe uočene promene aktivnosti antioksidativnih enzima. Na taj način se objašnjava sposobnost biljaka da uz pomoć antioksidativnog sistema uspešno prebrode još jedno izlaganje stresnim uslovima (Baťková i sar., 2008; Faisal i Anis, 2009).

Pojava hiperhidriranosti biljnih tkiva je takođe povezana sa oksidativnim stresom. To je fiziološki poremećaj koji se često javlja u kulturi ćelija, tkiva i organa *in vitro* (Cassells i Curry, 2001; Wu Z i sar., 2009) i negativno utiče na opšte stanje regeneranata, a zatim i na njihovu aklimatizaciju. Ustanovljeno je da aktivnost antioksidativnih enzima značajno veća u hiperhidriranom tkivu regeneranata u poređenju sa normalnim tkivom listova *A. sativum* (Wu Z i sar., 2009), *Dianthus caryophyllus* (Saher i sar., 2004), *Malus sp.* (Chakrabarty i sar., 2006) i *Narcissus fazetta* (Chen i Ziv, 2001). Svi ovi rezultati su ukazali na blisku vezu hiperhidriranosti i prisustva ROS (Wu Z i sar., 2009)

1.4. Rod *Allium* L.

Rod *Allium* L. obuhvata oko 750 vrsta (Friesen i sar., 2006), što ga čini jednim od najvećih rodova monokotiledonih biljaka. Taksonomska pozicija ovog roda i njemu srodnih rodova dugo vremena je bila predmet diskusija. U ranijoj klasifikaciji rod *Allium* je pripadao porodici *Liliaceae*, da bi zatim bio uključen u porodicu *Amarylidaceae*. Na osnovu brojnih taksonomskih podataka o monokotilama, rod *Allium* i njegovi bliski srodnici su grupisani u porodicu *Alliaceae* (Fritsch i Friesen, 2002).

Rod *Allium* je široko rasprostranjen duž holarktičkog regiona, od sušnih suptropskih oblasti do borealne zone (Fritsch i Friesen, 2002). Jedina do sada poznata vrsta na južnoj hemisferi je *A. dregeanum* Kth. (de Sarker i sar., 1997). Biljke su

prilagođene umerenim klimatskim uslovima sa malom ili promenljivom količinom dostupne vode (Song i sar., 2007).

Vrste ovog roda su višegodišnje ili dvogodišnje zeljaste biljke sa podzemnim organima za magacioniranje (lukovice ili rizomi; Kamenetsky i Rabinowitch, 2006). Tokom prve godine razvića većina lukova formira lukovicu, a tek sledeće godine cvetaju. Ovaj rod obuhvata ekonomski značajne, gajene vrste, kao i samonikle biljne vrste. Jestive biljke ovog roda se koriste kao sveže povrće ili osušene, kao začinske biljke (Song i sar., 2007). Ekonomski značajne vrste roda *Allium* su *A. cepa*, *A. sativum*, *A. fistulosum*, *A. ameloprasum*, *A. schoenoprasum* i *A. tuberosum* (Kamenetsky i Rabinowitch, 2006).

Vrste roda *Allium* se od davnina koriste za prevenciju i lečenje različitih bolesti (Griffiths i sar., 2002; Mnayer i sar., 2014; Song i sar., 2007; Rivlin, 2001). Najveći značaj se pridaje njihovim antimikrobnim svojstvima (Benkeblia, 2004; Harris i sar., 2001). Brojna istraživanja su potvrdila lekovita svojstva i značaj *A. sativum* za prevenciju malignih oboljenja, smanjenje faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti i zaštitu jetre (Butt i sar., 2009; Iciek i sar., 2009; Pittler i Ernst, 2007). Vrste ovog roda sadrže vrlo značajnu količinu organskih jedinjenja sumpora. Ova jedinjenja, uključujući i alicin, predstavljaju glavne aktivne komponente u lukovicama (Tattelman, 2005). Novija istraživanja roda *Allium* ukazuju na vrlo značajna lekovita svojstva još jedne grupe jedinjenja-saponina (Lanzotti i sar., 2014; Sobolewska i sar., 2014).

A. schoenoprasum L. (vlašac) je višegodišnja zeljasta biljka, koja može da izraste od 20 do 50 cm visine. Listovi su cilindrični i šuplji (prečnika 2-3 mm). Od vremena sadnje do cvetanja potrebno je oko 60 dana (Pinzón i sar., 2013). Ova vrsta se uzgaja ili raste samoniklo širom Evrope, Azije i Severne Amerike. Biljke vlašca se upotrebljavaju u kulinarstvu, jer kao začinska biljka ima blaži ukus nego crni luk. Zahvaljujući privlačnim cvetovima ljubičaste boje, vlašac se gaji i kao ukrasna biljka. Biljke vlašca pored značajne hranljive vrednosti sadrže i jedinjenja sa izraženim antioksidativnim svojstvima (Štajner i sar., 2004). Etarska ulja izolovana iz biljaka ove vrste imaju antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost (Mnayer i sar., 2014), a ekstrakt listova inhibira rast tumora kod miša (Shirshova i sar., 2013).

A. ascalonicum L. (šalot) se od davnina koristi u ishrani i u narodnoj medicini. Potiče iz Azije, sa područja današnje Palestine. Kao i većina vrsta roda *Allium* i ekstrakt ove vrste poseduje jaku antioksidativnu aktivnost (Leelarungrayub i sar., 2006) i antimikrobno dejstvo (Adeniyi i Anyiam, 2004; Mahmoudabadi i Nasery, 2009).

1.4.1. Biotehnologija u službi unapređenja vrsta roda *Allium*

Klasično oplemenjivanje vrsta roda *Allium* je značajno otežano zbog toga što su to dvogodišnje biljne vrste, pa je za dobijanje čistih linija najčešće potrebno 8-10 godina. Međutim, taj problem dodatno otežava i činjenica da posle nekoliko ciklusa samooprašivanja kod lukova najčešće dolazi do genetičke depresije, usled nagomilavanja letalnih gena (Bohanec, 2002; Murovec i Bohanec, 2012). Osim toga, neke vrste lukova su sterilne, kao beli luk, pa se mogu propagirati samo vegetativno. Mnogi od ovih problema se mogu eliminisati ili ublažiti modernim metodama kulture biljnih tkiva, molekularne biologije i genetičkog inženjerstva, koje omogućavaju uvođenje poželjnih svojstava u već izabrane elitne genotipove. S obzirom na veliki ekonomski i farmakološki značaj, vrste roda *Allium* su takođe bile predmet ovih istraživanja tokom dugog niza godina. Međutim, kod ovih vrsta je izuzetno teško uspostaviti efikasan protokol za genetičku transformaciju i ovaj problem ni do danas nije prevaziđen (Song i sar., 2007; Eady i sar., 2008; Kenel i sar., 2010). Efikasnost genetičke transformacije se najčešće kreće u opsegu 0,05-4% (Zheng i sar., 2001; Park i sar., 2002; Eady i sar., 2008; Kenel i sar., 2010). Da bi se kompenzovala niska efikasnost procesa genetičke transformacije, jasno je da protokol za regeneraciju mora biti što efikasniji.

I pored problema, u dosadašnjim istraživanjima su postignuti značajni rezultati. Neprijatan efekat suzenja očiju prilikom sečenja crnog luka eliminisan je posttranskripcionim utišavanjem gena za sintazu lakrimatornog faktora, koja katalizuje proces biosinteze iritantnih jedinjenja odgovornih za ovaj efekat (Eady i sar., 2008). Zanimljivo, nedostatak ovog enzima je izazvao poremećaj metabolizma sumpornih jedinjenja u transformisanim biljkama, usled čega su one sintetisale izomer alicina (koji je tipičan za beli luk, dok se u crnom luku prirodno ne sintetiše), što je povećalo lekovitu i hranljivu vrednost transformisanih biljaka (Thomson i sar., 2013).

Genetičkom transformacijom su dobijene biljke belog luka tolerantne prema herbicidima fosfinitricinu (Ahn i sar., 2013) i sulfonilurei (Park i sar., 2002) i biljke sa povišenim nivoom otpornosti prema insektima (Zheng i sar., 2004) i gljivama (Lagunes-Fortiz i sar., 2013), kao i biljke crnog luka tolerantne prema herbicidima fosfinitricinu i glifosatu (Eady i sar., 2003).

Primenom biotehnoških postupaka moguće je u potpunosti eliminisati viruse često prisutne u gajenim vrstama biljaka. To je posebno važno za sterilne biljne vrste poput *A. sativum* koji se razmnožava vegetativno sa niskim koeficijentom multiplikacije i sa velikom verovatnoćom prenosa virusnih oboljenja (Novak, 1990). Zahvaljujući tehnikama kulture biljnih tkiva uspešno su eliminisani virusi i dobijen je bezvirusni sadni materijal belog luka (Ma i sar., 1994; Ayabe i Sumi, 1998; Robert i sar., 1998; Ramírez-Malagón i sar., 2006).

Interspecijska hibridizacija je vrlo zastupljena između jedinki različitih vrsta roda *Allium*. To je vrlo značajan i efikasan proces, jer se za kratko vreme dobijaju hibridi, koji mogu imati poboljšane karakteristike (Peffley i Hou, 2000; Yanagino i sar., 2003). Međutim, hibridni embrioni u većini slučajeva nisu sposobni da se normalno razvijaju usled postfertilizacione barijere u ovuli majke biljke. Između vrsta roda *Allium* postoji seksualna barijera, npr. 16 dana posle oprašivanja *A. cepa* polenom *A. sphaerocephalon* dolazi do degeneracije ovula (Bino i sar., 1989). Međutim, izolovanjem ovarijuma sedam dana posle oprašivanja i njihovim gajenjem *in vitro* uspešno su formirana semena. Ova tehnika, koja se označava kao spašavanje embriona (eng. *embryo rescue*), se pokazala kao uspešna za spašavanje embriona nastalih interspecijskom hibridizacijom (Doležel i sar., 1980; Gonzalez i Ford-Lloyd, 1987). Ženski genotip ima sposobnost da se razvija do zrelosti u uslovima *in vitro* (Musial i sar., 2005), a zatim se dobijeni hibridi mogu umnožiti tehnikama kulture biljnih tkiva (Keller i sar., 1996; Umehara i sar., 2006a). Korišćenjem ove tehnike do sada su postignuti značajni rezultati. Interspecijski hibridi između vrsta *A. fistulosum* i *A. schoenoprasum* su pokazivali brži i bolji rast i značajno veći sadržaj karotena u odnosu na izvorne vrste (Umehara i sar., 2006b). Hibridizacija šalota i crnog luka je izvršena sa idejom da se dobiju hibridne biljke koje bi bile tolerantne na tropsku klimu (kao šalot) i imale veće lukovice (kao crni luk; Sulistyaningsih i sar., 2002). Ukrštanja sa divljim

srodnicima se često vrše s ciljem prenošenja gena za otpornost prema patogenim organizmima u gajene biljne vrste. *A. roylei* je izvor gena koji omogućavaju povišenu otpornost prema patogenima, npr. prema gljivama *Peronospora destructor* i *Botrytis squamosa*. S obzirom da je prenos ovih osobina na kultivisane srodnike ograničen zbog seksualnih barijera i da se ukrštanjem crnog luka i *A. roylei* dobija potomstvo koje je delimično fertilno (Van der Meer i de Vries, 1990; De Vries i sar., 1992), ginogenezom i dihaploidizacijom tih biljaka su dobijene čiste linije crnog luka sa genima za otpornost prema ovim patogenima (Alan i sar., 2003). Ove čiste linije se zatim mogu koristiti za dobijanje hibrida (Hyde i sar., 2012; Murovec i Bohanec, 2012). Hibridni kultivari vrste *A. cepa* su superiorniji u odnosu na sorte dobijene slobodnim oprašivanjem usled njihove veće uniformnosti i izraženog heterozisa (Bohanec, 2002). Zbog toga dihaploidi imaju poseban značaj za oplemenjivanje lukova, jer predstavljaju homozigotne linije dobijene u dva koraka diploidizacijom haploida (Murovec i Bohanec, 2012). Utvrđeno je da uspešno održavaju genetički integritet i da proizvode fertilna semena (Bohanec, 2002). Iako postoje određena ograničenja, dihaploidi se već uveliko koriste u procesima ukrštanja i dobijanju hibrida vrste *A. cepa*. Takođe se koriste kao model sistem za izučavanje biohemijskih i molekularnih markera (Bohanec, 2002).

1.4.2. Morfogeneza vrsta roda *Allium in vitro*

Brojne istraživačke grupe su godinama razvijale i usavršavale protokole za različite procese morfogeneze *in vitro* značajnih vrsta roda *Allium*. Kao što je i očekivano, zbog svog velikog značaja i primene širom sveta najviše pažnje u tim istraživanjima je posvećeno vrstama *A. sativum* i *A. cepa*.

A. sativum i *A. cepa* su regenerisani procesima direktne (Tab. 1) i indirektne kaulogeneze (Tab. 2), kao i direktne (Tab. 3) i indirektne somatske embriogeneze (Tab. 4). Značajno mesto u istraživanju regeneracije kod vrste *A. cepa* zauzimaju kulture embriogene suspenzije ćelija. Pokazalo se da su ove kulture pogodnije u odnosu na kulture gajene na čvrstoj podlozi i da pod odgovarajućim uslovima predstavljaju pouzdan regenerativni sistem (Tab. 2). Najčešće se iz embriogene suspenzije ćelija vrste *A. cepa* izoluju protoplasti koji poseduju sposobnost regeneracije (Buiteveld i Creemers-Molenaar, 1994).

Kod šalota regeneracija *in vitro* je postignuta direktnom (Tab. 1) i indirektnom kaulogenezom (Tab. 2).

Od ostalih ekonomski značajnih vrsta, *A. ampeloprasum* var. *porrum* je regenerisan procesima direktne (Tab. 1) i indirektno kaulogeneze (Tab. 2) i indirektno somatske embriogeneze (Tab. 4).

Ostalim vrstama lukova je posvećena manja pažnja. Regeneracija *in vitro* je postignuta kod *A. tuberosum*, *A. chinense*, *A. fistulosum*, hibrida *A. fistulosum* x *A. cepa*, *A. aflatunense*, *A. giganteum*, *A. karataviense*, *A. neapolitanum*, *A. wallichii*, *A. senescens*, *A. wakegi* i *A. carinatum* (Tab. 1, 2, 4).

Ginogeneza je uspešno indukovana iz izolovanih ovula, ovarijuma ili neoprašenih, nezrelih cvetova nekih vrsta lukova, prvenstveno *A. cepa*, šalota i hibrida *A. cepa* x *A. roylei*, *A. cepa* x *A. galanthum* (Tab. 5). Za razliku od ginogeneze, mnogobrojni pokušaji indukcije androgeneze kod lukova su bili potpuno neuspešni (Campion i sar., 1984; Keller, 1990b).

Starost biljnog materijala, koji se koristi kao eksplantat za indukciju regeneracije takođe značajno utiče na regenerativni potencijal (Haque i sar., 1997). U skladu s tim, Zheng i sar. (1999) su ustanovili da visok regenerativni potencijal poseduju samo mlade kulture kalusa i da se vremenom sposobnost regeneracije smanjuje. Regenerativni potencijal cvetnih drški *A. ampeloprasum* je takođe opadao sa starošću biljke (Silvertand i sar., 1995).

Tabela 1. Morfogeneza *in vitro* procesom direktne kaulogeneze kod vrsta roda *Allium*.

Biljna vrsta	Eksplantat	Regeneracija pupoljaka	Referenca
<i>A. aflatanense</i>	CD, ML	NAA + BA	Kozak i Stelmasczuk, 2013
<i>A. ampeloprasum</i>	BP	1. BA ili 2. bez RR	Mohamed-Yasseen i sar., 1995
<i>A. ampeloprasum</i>	BP	1. BA ili 2. NAA+BA	Mohamed-Yasseen i Costanza, 1996
<i>A. ampeloprasum</i>	CD	NAA + BA	Silvertand i sar., 1995
<i>A. ampeloprasum</i>	CD	NAA + BA	Ziv i Lilien-Kipins, 2000
<i>A. ascalonicum</i>	BP	1. NAA + BA ili 2. TDZ	Mohamed-Yasseen i sar., 1994
<i>A. cepa</i>	BP	BA ili Kin	Kahane i sar., 1992
<i>A. cepa</i>	CV, OVA	2,4-D + BA	Luthar i Bohanec, 1999
<i>A. chinense</i>	BP	NAA + BA	Xu i sar., 2008
<i>A. chinense</i>	OVA	2,4-D + BA	Bah i sar., 2012
<i>A. fistulosum</i>	AP	NAA + Kin	Fujieda i sar., 1977
<i>A. giganteum</i>	CV	2,4-D + BA	Šušek i sar., 2002
<i>A. karataviense</i>	CD, ML	NAA + BA	Kozak i Stelmasczuk, 2013
<i>A. neapolitanum</i>	BP	NAA + BA	Stelmasczuk i Kozak, 2013
<i>A. porrum</i>	BP	BA	Hong i Debergh, 1995
<i>A. porrum</i>	CD	BA	Novák i Havel, 1981
<i>A. sativum</i>	AK	NAA + BA	Haque i sar., 1997
<i>A. sativum</i>	AP	IAA + BA	Nagakubo i sar., 1993
<i>A. sativum</i>	BP	bez RR	Ayabe i Sumi, 1998
<i>A. sativum</i>	BP	JA + 2iP	Ravnikar i sar., 1993
<i>A. sativum</i>	BP	1. NAA + BA ili 2. TDZ	Mohamed-Yasseen i sar., 1994
<i>A. tuberosum</i>	K	IBA + BA	Alizadeh i sar., 2013
<i>A. tuberosum</i>	BP	1. BA ili 2. NAA+2iP	Pandey i sar., 1992
<i>A. wallichii</i>	I	ZEA + IBA	Wawrosch i sar., 2001

U tabeli su predstavljene samo optimalne kombinacije RR. AK - apeks korena (2-10 mm); AP - apikalni pupoljak (> 1mm); BP - bazalna ploča; K - koleoptil; CD - cvetna drška; CV - cvet; I - izdanak; ML - mladi list; OVA - ovarijum.

Tabela 2. Morfogeneza *in vitro* procesom indirektno kaulogeneze kod vrste roda *Allium*.

Biljna vrsta	Eksplantat	Indukcija kalusa	Regeneracija pupoljaka	Referenca
<i>A. ampeloprasum</i>	ZZE	2,4-D	Kin	Silvertrand i sar., 1996
<i>A. ampeloprasum</i>	BP	2,4-D + Kin	BA	Mohamed-Yasseen i sar., 1995
<i>A. ampeloprasum</i>	BP	2,4-D + Kin	BA	Mohamed-Yasseen i Costanza , 1996
<i>A. carinatum</i>	OK, B, AP	2,4-D + IAA + Kin	—	Havel i Novák, 1988
<i>A. carinatum</i>	C	NAA+BA	—	Havel i Novák, 1988
<i>A. cepa</i>	S	2,4-D + Kin	—	Mukhopadhyay i sar., 2005
<i>A. cepa</i>	S	2,4-D + BA	BA	Zhang i sar., 2004
<i>A. cepa</i>	ZZE	2,4-D	bez RR	Zheng i sar., 1998
<i>A. cepa</i>	S	2,4-D	bez RR, citokinini	Zheng i sar., 1999
<i>A. cepa v. aggregatum</i>	ZZE	2,4-D	bez RR	Zheng i sar., 1998
<i>A. cepa v. aggregatum</i>	S	2,4-D	bez RR, citokinini	Zheng i sar., 1999
<i>A. cepa v. aggregatum</i>	BP	2,4-D	NAA + BA	Haitlekidan i sar., 2013
<i>A. chinense</i>	BP, AK, ML	2,4-D + BA	NAA + BA	Yan i sar., 2009
<i>A. fistulosum</i>	S	2,4-D + ABA	Pikloram + BA	Song i Peffley, 1994
<i>A. fistulosum</i> x <i>A. cepa</i>	S	2,4-D + ABA	Pikloram + BA	Song i Peffley, 1994
<i>A. sativum</i>	ML	Pikloram	Kin	Kenel i sar., 2010
<i>A. sativum</i>	AK, AP	2,4-D + 2iP	1.BA ili 2.Kin + IAA	Barandiaran i sar., 1999a
<i>A. sativum</i>	P	NAA + BA	NAA + BA	Hasegawa i sar., 2002
<i>A. sativum</i>	MI	NAA + Kin	NAA + Kin	Ma i sar., 1994
<i>A. sativum</i>	S	2,4-D + Kin	2,4-D + Kin	Mukhopadhyay i sar., 2005
<i>A. sativum</i>	OK	2,4-D	Pikloram + BA	Myers i Simon, 1998
<i>A. sativum</i>	OK	2,4-D	Pikloram + BA	Myers i Simon, 1998

U tabeli su predstavljene samo optimalne kombinacije RR. AK - apeks korena (2-10 mm); AP - apikalni pupoljak (> 1mm); B - bulbus; BP - bazalna ploča; C - cvasti; OK - odsečak korena (apikalni i neapikalni); MI - meristem izdanka (0,3-1 mm); ML - mladi list; P - protoplast; S - suspenzija ćelija; ZZE - zreli zigotski embrion.

Tabela 2. - nastavak Morfogeneza *in vitro* procesom indirektno kaulogeneze kod vrsta roda *Allium*.

Biljna vrsta	Eksplantat	Indukcija kalusa	Regeneracija pupoljaka	Referenca
<i>A. sativum</i>	MI	2,4-D	Pikloram + BA	Myers i Simon, 1998
<i>A. sativum</i>	MI, ML	2,4-D	BA	Nagasawa i Finer, 1988a
<i>A. sativum</i>	S	NAA + BA	NAA + BA	Nagasawa i Finer, 1988b
<i>A. sativum</i>	AK	2,4-D + Kin	2,4-D + Kin	Robledo-Paz i sar., 2000
<i>A. sativum</i>	OK	2,4-D + 2iP	NAA + BA ili Kin	Scotton i sar., 2013
<i>A. sativum</i>	OK	1.Pikloram 2,2,4-D + 2iP	Kin	Zheng i sar., 2003
<i>A. senescens</i>	CP	1,2,4-D +BA 2.NAA + BA	2,4-D + BA	Nair i Seo, 1993
<i>A. tuberosum</i>	AK	NAA	bez RR	Shuto i sar., 1993
<i>A. wakegi</i>	BP	2,4-D + NAA + Kin	Kin	Seo i Kim., 1988

U tabeli su predstavljene samo optimalne kombinacije RR. AK - apeks korena (2-10 mm); BP - bazalna ploča; CP - cvetni pupoljak; OK - odsečak korena (apikalni i neapikalni); MI - meristem izdanka (0,3-1 mm); ML - mladi list; S - suspenzija ćelija.

Tabela 3. Morfogeneza *in vitro* procesom direktno somatske embriogeneze kod vrsta roda *Allium*.

Biljna vrsta	Eksplantat	Indukcija kalusa	Klijanje somatskih embriona	Referenca
<i>A. cepa</i>	NZE	Pikloram	Kin	Eady i sar., 1998
<i>A. sativum</i>	BP	2,4-D + Kin	2,4-D + Kin	Sata i sar., 2001

U tabeli su predstavljene samo optimalne kombinacije RR. BP - bazalna ploča; NZE - nezreli zigotski embrion.

Tabela 4. Morfogeneza *in vitro* procesom indirektno somatske embriogeneze kod vrsta roda *Allium*.

Biljna vrsta	Eksplantat	Indukcija kalusa	Regeneracija somatskih embriona	Referenca
<i>A. ampeloprasum</i>	ZZE	2,4-D	Kin	Silvertand i sar., 1996
<i>A. ampeloprasum</i>	ZZE	2,4-D	2,4-D	Schavemaker i sar., 1995
<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	ZZE	2,4-D	Kin	Buiteveld i sar., 1993
<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>	BP	2,4-D	2iP	Hong i Debergh, 1995
<i>A. carinatum</i>	OK, B, AP	2,4-D + IAA + Kin	—	Havel i Novák, 1988
<i>A. carinatum</i>	C	NAA+BA	—	Havel i Novák, 1988
<i>A. cepa</i>	P	Pikloram + BA	Pikloram + BA	Hansen i sar., 1995
<i>A. cepa</i>	AP	2,4-D	BA	Ramakrishnan i sar., 2013
<i>A. cepa</i>	ZZE	2,4-D	Kin	Saker, 1997/1998
<i>A. cepa</i>	ZZE	2,4-D	Kin + ABA	Van der Valk i sar., 1992
<i>A. fistulosum</i>	S	2,4-D	BA	Kim i Soh, 1996
<i>A. fistulosum</i>	ZZE	2,4-D	Kin + ABA	Van der Valk i sar., 1992
<i>A. fistulosum</i> x <i>A. cepa</i>	ZZE	2,4-D	Kin + ABA	Van der Valk i sar., 1992
<i>A. sativum</i>	AK	2,4-D	Kin	Haque i sar., 1998
<i>A. sativum</i>	AK, ML	2,4-D + Kin	BA	Fereol i sar., 2002
<i>A. sativum</i>	BP, MI, OK, C	2,4-D + BA	—	Luciani i sar., 2006
<i>A. tuberosum</i>	MI	2,4-D	—	Matsuda i Adachi, 1996

U tabeli su predstavljene samo optimalne kombinacije RR. AK - apeks korena (2-10 mm); AP - apikalni pupoljak (> 1 mm); B - bulbus; BP - bazalna ploča; C - cvast; OK - odsečak korena (apikalni i neapikalni); MI - meristem izdanka (0,3-1 mm); ML - mladi list; P - protoplast; S - suspenzija ćelija; ZZE - zreli zigotski embrion.

Tabela 5. Morfogeneza *in vitro* procesom ginogeneze kod vrsta roda *Allium*.

Biljna vrsta	Eksplantat	Indukcija embriona	Ploidnost	Referenca
<i>A. cepa</i>	OVA	2,4-D + BA	H	Muren, 1989
<i>A. cepa</i>	OV, OVA, CV	2,4-D + BA	H	Keller, 1990a
<i>A. cepa</i>	OV, CV	NAA + 2iP	H	Campion i Alloni, 1990
<i>A. cepa</i>	OV, OVA	2,4-D + BA	H, DH, MP	Bohanec i sar., 1995
<i>A. cepa</i>	CV	2,4-D + BA	H, DH	Bohanec i Jakše, 1999
<i>A. cepa</i>	CV	2,4-D + BA + PT+ SP	H	Ebrahimi i Zamani, 2009
<i>A. cepa</i> x <i>A. roylei</i>	CV	2,4-D + BA	H, TP, MP	Alan i sar., 2003
<i>A. cepa</i> x <i>A. galanthum</i>	CV	2,4-D + BA	H, DH	Sulistyaningsih i sar., 2002
<i>A. cepa</i> v. <i>aggregatum</i>	CV	2,4-D + BA	H, DH, MP	Sulistyaningsih i sar., 2006

U tabeli su predstavljene samo optimalne kombinacije RR. OV - ovula; OVA - ovarijum; CV - cvet; H - haploid; DH - dihaploid; MP - miksploid; TP - tetraploid; PT - putrescin; SP - spermidin.

1.4.2.1. Faktori koji utiču na *in vitro* morfogenezu vrsta roda *Allium*

Na proces regeneracije *in vitro* uticaj mogu imati genotip, tip eksplantata, fiziološko stanje i stupanj razvića donor biljaka, kao i RR, mineralni rastvor i razne supstance koje se dodaju u hranljivu podlogu, poput vitamina, aminokiselina i drugo, kao i fizički faktori, prisustvo svetlosti, trajanje i intezitet osvetljenja.

Genotip

Uticaj genotipa na regenerativni potencijal vrsta roda *Allium* je izuzetno značajan. U mnogobrojnim studijama je uočeno da različiti klonovi (Myers i Simon, 1998, 1999), kultivari (Buiteveld i sar., 1993; Eady i sar., 1998; Robledo-Paz i sar., 2000; Zheng i sar., 2003; Zhang i sar., 2004; Scotton i sar., 2013) i linije u okviru kolekcija (Buiteveld i sar., 1993; Barandiaran i sar., 1999a; Martín-Urdíroz i sar., 2004) imaju izuzetno varijabilan regenerativni potencijal. Međutim, individualnoj varijabilnosti, koja se odnosi na jedinke koje vode poreklo od pojedinačnog semena, je posvećeno vrlo malo pažnje (Silvertand i sar., 1995, 1996; Javornik i sar., 1998; Zheng i sar., 1998). Zheng i sar. (1998) su uočili veliku varijabilnost u regenerativnom potencijalu linija kalusa indukovanih iz pojedinačnih nezrelih zigotskih embriona crnog luka i šalota, dok su Silvertand i sar. (1995) uočili visoku varijabilnost u kaulogenom potencijalu odsečaka cvetnih drški *A. ampeloprasum*, a Bohanec i Jakše (1999) varijabilnost regenerativnog potencijala jedinki u okviru kolekcija crnog luka. Međutim, rezultati Javornik i sar. (1998) u još većoj meri potenciraju značaj genetičkog faktora. Ovi autori su pokazali izuzetno visoku varijabilnost u učestalosti ginogeneze potomstva dobijenog samooprašivanjem tri dihaploidne linije crnog luka.

Tip eksplantata

Do sada je opisan veliki broj protokola za regeneraciju komercijalno značajnih vrsta roda *Allium* u kojima su za indukciju regeneracije korišćeni različiti eksplantati. U ranim studijama su kao eksplantati najčešće korišćeni vrhovi izdanaka (Bhojwani, 1980; Nagakubo i sar., 1993; Mohamed-Yasseen i sar., 1994). Međutim, proces regeneracije iz ovih eksplantata je bio neefikasan, kao i regeneracija iz diskova lista i odsečaka stabla (Abo El-Nil, 1977; Rauber i Grunewaldt, 1988). Kasnije se pokazalo da samo bazalni deo skraćenog stabla, označen kao bazalna ploča, ima morfogenetski potencijal

(Ravnikar i sar., 1993; Koch i sar., 1995; Hong i Debergh, 1995; Ayabe i Sumi, 1998; Sata i sar., 2001; Xu i sar., 2008; Hailekidan i sar., 2013). Dobri rezultati su dobijeni kad su kao eksplantati korišćeni mladi listovi (Nagasawa i Finer, 1988a; Kahane i sar., 1992; Fereol i sar., 2002; Kenel i sar., 2010) ili meristemi izdanka (Ma i sar., 1994; Matsuda i Adachi, 1996). Odsečci korenova su se takođe pokazali kao vrlo pogodni eksplantati za indukciju regeneracije (Shuto i sar., 1993; Haque i sar., 1997, 1998; Myers i Simon, 1998; Barandiaran i sar., 1999b; Robledo-Paz i sar., 2000; Zheng i sar., 2003; Martín-Urdíroz i sar., 2004; Scotton i sar., 2013). Pokazano je i da odsečci cvetne drške imaju dobar morfogenetski potencijal (Silvertand i sar., 1995), kao i reproduktivni biljni organi - cvet, plodnik i ovule (Bohanec i sar., 1995; Javornik i sar., 1998; Bohanec i Jakše, 1999; Luthar i Bohanec, 1999). Zigotski embrioni, posebno nezreli, su sjajan biljni materijal za indukciju morfogeneze (Van der Valk i sar., 1992; Buiteveld i sar., 1993; Schavemaker i Jacobsen, 1995; Saker, 1997/1998; Eady i sar., 1998, 2000, 2003, 2005, 2008; Zheng i sar., 1998), mada se ne mogu koristiti za klonalno propagiranje zbog stranog oplodjenja. Pokazalo se da i stadijum razvića zigotskih embriona značajno utiče na proces somatske embriogeneze (Eady i sar., 1998). Dragocene informacije su dale uporedne studije u kojima je testiran regenerativni potencijal više različitih eksplantata. Luciani i sar. (2006) su testirajući regenerativni potencijal meristema, bazalne ploče, nezrelih cvasti i vrhova korenova belog luka utvrdili da meristem i bazalna ploča imaju najveći regenerativni potencijal. Yan i sar. (2009) su takođe potvrdili da su eksplantati bazalne ploče superiorniji od mladih listova i odsečaka korenova, dok su u studiji Fereol i sar. (2002) mladi listovi imali veći regenerativni potencijal od korenova. I u drugim studijama su se meristemi izdanka pokazali kao odlični eksplantati (Ramakrishnan i sar., 2013), mada njihova izolacija zahteva dosta vremena i spretnosti. Za razliku od većine biljnih vrsta, embrionalni organi su ređe korišćeni za indukciju regeneracije lukova (Mohamed-Yasseen i sar., 1995; Wawrosch i sar., 2001; Alizadeh i sar., 2013).

Na efikasnost regeneracije značajno utiče veličina i subfragment eksplantata. Meristemi izdanka belog luka manji od 0,3 mm nemaju regenerativni potencijal, već samo formiraju kalus (Ma i sar., 1994). Odsečci korenova nekih linija i pod nekim eksperimentalnim uslovima imaju regenerativni potencijal celom dužinom (Myers i Simon, 1998), dok u drugim slučajevima regeneriše samo apikalni region korena

(Haque i sar., 1997, 1998; Barandiaran i sar., 1999a; Robledo-Paz i sar., 2000; Fereol i sar., 2002). Tome slično, bazalni fragmenti cvetnih drški *A. ampeloprasum* su imali najveći regenerativni potencijal (Silvertand i sar., 1995).

Regulatori rastenja

Pored izbora odgovarajućeg eksplantata, sledeći važan korak koji utiče na uspešnost regeneracije i multiplikacije *in vitro* je utvrđivanje optimalne kombinacije RR (Gantait i sar., 2010). Treba naglasiti da se do optimalne kombinacije RR dolazi empirijski i da su one delotvorne samo za neke tipove eksplantata i jedinke neke sorte ili linije date vrste. Protokol razvijen za jedinke jedne sorte može biti potpuno neefikasan za regeneraciju iz istih eksplantata jedinki druge sorte iste biljne vrste (Martín-Urdíroz i sar., 2004).

Kao što je već naglašeno, eksplantati bazalne ploče imaju izuzetno visok regenerativni potencijal, pa je u nekim slučajevima zapažena efikasna organogeneza pupoljaka iz tih eksplantata gajenih na podlozi bez RR, kao kod *A. ampeloprasum* (Mohamed-Yasseen i sar., 1995) i *A. sativum* (Ayabe i Sumi, 1998), dok je kod drugih biljnih vrsta bio dovoljan citokinin (najčešće BA) za indukciju kaulogeneze iz bazalne ploče, kao kod *A. ampeloprasum* (Mohamed-Yasseen i sar., 1995; Mohamed-Yasseen i Costanza, 1996), *A. cepa* (Kahane i sar., 1992) i *A. porrum* (Hong i Debergh, 1995). BA je bio dovoljan da indukuje kaulogenezu i iz eksplantata cvetne drške *A. porrum* (Novák i Havel, 1981).

Bhojwani (1980) je među prvima testirao kombinaciju auksina i citokinina za indukciju organogeneze kod *A. sativum*. Umnožavanje izdanaka je postignuto upotrebom niskog nivoa auksina i relativno visokog nivoa citokinina, što su kasnije potvrdili i drugi autori (Haque i sar., 1997; Barandiaran i sar., 1999b). U najvećem broju slučajeva za direktnu kaulogenezu iz odsečaka cvetnih drški, mladih listova, bazalne ploče, apikalnih pupoljaka, apeksa korena i baze izdanka najefikasnija je bila kombinacija auksina (najčešće naftil-sirćetna kiselina, NAA) i citokinina (najčešće BA; Fujieda i sar., 1977; Mohamed-Yasseen i sar., 1994; Silvertand i sar., 1995; Haque i sar., 1997; Ziv i Lilien-Kipins, 2000; Xu i sar., 2008; Kozak i Stelmaszczuk, 2013; Stelmaszczuk i Kozak, 2013). Interesantno je da je jasmonska kiselina u kombinaciji sa

2iP takođe bila efikasna u indukciji direktne kaulogeneze iz bazalne ploče *A. sativum* (Ravnikar i sar., 1993).

Vrlo je zanimljiv slučaj paralelne indukcije direktne i indirektno regeneracije pupoljaka iz somatskog tkiva ovarijuma *A. cepa* (Luthar i Bohanec, 1999), *A. chinense* (Bah i sar., 2012) i *A. giganteum* (Šušek i sar., 2002) pod uticajem 2,4-D i BA. Treba naglasiti da se ova kombinacija RR koristi i za indukciju ginogeneze iz cvetova, ovarijuma ili izolovanih ovula *A. cepa* (Muren, 1989; Keller, 1990a; Champion i Alloni, 1990; Bohanec i sar., 1995; Bohanec i Jakše, 1999; Ebrahimi i Zamani, 2009) ili šalota (Sulistyaningsih i sar., 2006), kao i hibrida *A. cepa* i *A. roylei* (Alan i sar., 2003) ili *A. galanthum* (Sulistyaningsih i sar., 2002). Pokretanje različitih puteva morfogeneze iz istih eksplantata istom kombinacijom RR autori su protumačili različitim trajanjem tretmana i prisustvom različitih mineralnih rastvora i vitamina u podlozi.

Za indukciju indirektno regeneracije, koja podrazumeva fazu indukcije kalusa i fazu indukcije regeneracije, najčešće je potrebno gajiti eksplantate na više podloga. To se posebno odnosi na kaulogenezu, dok je u slučaju indirektno somatske embriogeneze najčešće dovoljno subkultivisati eksplantate sa podloge za indukciju kalusa na podlogu bez RR. Za indukciju organogenog kalusa iz svih pobrojanih eksplantata dominantno je korišćen 2,4-D i samo retko NAA, 4-amino-3,5,6-trihlorpikolinska kiselina (pikloram) ili IAA. Za indukciju organogenog kalusa iz meristema izdanka i mladih listova belog luka nejefikasniji je bio 2,4-D, zatim 2,4,5-trihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4,5-T) i pikloram, dok kalus indukovan na podlozi sa NAA nije bio organogen (Nagasawa i Finer, 1988a). Što je auksin efikasniji, to je potrebno primeniti nižu koncentraciju za indukciju organogenog kalusa. Međutim, produženo gajenje kalusa na podlozi sa 2,4-D kod lukova izaziva pojavu hromozomskih aberacija (Novák, 1980; Mukhopadhyay i sar., 2005). Zbog toga se često pribegava indukciji kalusa na podlozi sa 2,4-D, da bi bila što efikasnija, i zatim zameni 2,4-D nekim drugim auksinom, najčešće pikloramom (Myers i Simon, 1998) ili NAA (Yan i sar., 2009; Hailekidan i sar., 2013), za efikasnu proliferaciju kalusa i smanjenje učestalosti aberacija. Myers i Simon (1998) su demonstrirali da je u prisustvu 2,4-D učestalost formiranja kalusa iz odsečaka korenova bila deset puta veća nego u prisustvu piklorama i 2-iP, ali da je ta kombinacija piklorama i 2iP bila podjednako efikasna kao 2,4-D za održavanje kalusa, dok je za

regeneraciju pupoljaka iz ovih kalusa najefikasnija bila kombinacija NAA i BA. Auksin je u nekim slučajevima bio dovoljan za indukciju i proliferaciju organogenog kalusa, npr. iz mladih izdanaka i listova (Nagasawa i Finer, 1988a), apikalnih odsečaka korenova (Shuto i sar., 1993), zrelih zigotskih embriona (Silvertand i sar., 1996; Zheng i sar., 1998) ili suspenzije ćelija (Zheng i sar., 1999). Tada je za indukciju regeneracije dovoljno subkultivirati organogeni kalus na podlogu bez RR ili sa citokininom (najčešće BA i Kin). Međutim, u nekim slučajevima je u podlogu za indukciju kalusa pored auksina dodavana i ABA da bi se dobio kalus određenog kvaliteta, posebno ako je taj kalus korišćen za uspostavljenje suspenzije ćelija (Song i Peffley, 1994). Ipak, organogeni kalus je iz najvećeg broja eksplantata indukovao kombinacijom auksina i citokinina (BA, Kin, iP), a zatim se regeneracija pupoljaka odvijala na podlozi koja je sadržala iste RR (Ma i sar., 1994; Nagasawa i Finer, 1988b; Robledo-Paz i sar., 2000; Hasegawa i sar., 2002; Mukhopadhyay i sar., 2005) ili različitu kombinaciju auksina i citokinina (Myers i Simon, 1998; Yan i sar., 2009; Scotton i sar., 2013; Hailekidan i sar., 2013). U nekim slučajevima je za održavanje proliferacije tkiva preporučena zamena auksina koji je korišćen za indukciju kalusa, npr. NAA umesto IAA (Nagakubo i sar., 1993). Za proliferaciju pupoljaka je često neophodno izostavljanje auksina iz podloge i gajenje eksplantata na podlozi sa citokininom (Haque i sar., 1997). Ožiljavanje individualnih biljaka je najčešće najefikasnije na podlozi bez RR (Haque i sar., 1997).

Direktna somatska embriogeneza je retko detektovana kod lukova, npr. iz nezrelih zigotskih embriona *A. cepa* (Eady i sar., 1998) ili iz bazalne ploče *A. sativum* (Sata i sar., 2001). U prvom slučaju je za indukciju embriogenog kalusa korišćen pikloram, a za indukciju razvića somatskih embriona Kin (Eady i sar., 1998), dok je u drugom slučaju za obe faze korišćena podloga koja je sadržala 2,4-D i Kin. Pokazano je ne samo da je prisustvo auksina neophodno za inicijaciju somatske embriogeneze već i da je od dva testirana auksina, 2,4-D i NAA, samo 2,4-D indukovao somatsku embriogenezu (Sata i sar., 2001).

Indirektna somatska embriogeneza je mnogo češća pojava kod lukova. U najvećem broju slučajeva embriogeni kalus je indukovao iz zrelih zigotskih embriona pod uticajem 2,4-D. To je slučaj sa *A. ampeloprasum* (Buiteveld i sar., 1993;

Schavemaker i sar., 1995; Hong i Debergh, 1995; Silvertand i sar., 1996), *A. cepa* (Van der Valk i sar., 1992; Saker, 1997/1998), *A. fistulosum* (Van der Valk i sar., 1992) i *A. fistulosum* x *A. cepa* (Van der Valk i sar., 1992). Regeneracija somatskih embriona je zatim indukovana na podlozi sa citokininom, najčešće Kin, BA ili 2iP. Međutim, za indukciju indirektno somatske embriogeneze iz drugih eksplantata skoro uvek je korišćena kombinacija auksina i citokinina (Havel i Novák, 1988; Hansen i sar., 1995; Fereol i sar., 2002; Luciani i sar., 2006). Izuzetak su mladi izdanci *A. cepa* (Matsuda i Adachi, 1996) i *A. tuberosum* (Ramakrishnan i sar., 2013), kod kojih je 2,4-D bio dovoljan za indukciju kalusa, ali da bi kalus bio embriogen i za razviće somatskih embriona u biljke bio je potreban i BA (Ramakrishnan i sar., 2013).

Za indukciju ginogeneze iz cvetova, ovarijuma ili ovula *A. cepa* ili njegovih hibrida sa drugim vrstama roda *Allium* je skoro isključivo korišćena kombinacija 2,4-D i BA (Muren, 1989; Keller, 1990a; Bohanec i sar., 1995; Bohanec i Jakše, 1999; Sulistyaningsih i sar., 2002; Alan i sar., 2003; Ebrahimi i Zamani, 2009; Sulistyaningsih i sar., 2006), a uočen je i pozitivan efekat poliamina na ovaj proces (Ebrahimi i Zamani, 2009).

RR koji pripadaju drugim grupama biljnih hormona su samo retko korišćeni za indukciju regeneracije lukova *in vitro*. Učestalost formiranja somatskih embriona i izdanaka je povećana dodatkom ABA u podlogu za regeneraciju, koja je već sadržala Kin (Van der Valk i sar., 1992).

Koncentracija RR takođe značajno utiče na efikasnost regeneracije. Za indukciju direktne somatske embriogeneze iz bazalne ploče belog luka optimalna je bila kombinacija 1 mg L^{-1} 2,4-D i $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ Kin, dok je koncentracija oba RR preko 2 mg L^{-1} inhibirala proces somatske embriogeneze (Sata i sar., 2001). Za indukciju direktne kaulogeneze iz apikalnih odsečaka korenova belog luka optimalna koncentracija RR je bila $1 \text{ }\mu\text{M}$ NAA + $10 \text{ }\mu\text{M}$ BA, dok je koncentracija 2,4-D veća od $5 \text{ }\mu\text{M}$ ili NAA veća od $10 \text{ }\mu\text{M}$ bila inhibitorna (Haque i sar., 1997).

Somatski embrioni *A. fistulosum* i *A. tuberosum* su klijali u biljčice spontano, na podlozi bez RR (Kim i Soh, 1996; Matsuda i Adachi, 1996), dok je za klijanje

somatskih embriona *A. sativum* bilo potrebno prisustvo 5 μM Kin u podlozi (Haque i sar., 1998).

Mineralni rastvor

Za pravilno rastenje i razviće viših biljaka neophodno je prisustvo neorganskog azota. Za većinu viših biljaka glavni izvor neorganskog azota su nitrati (NO_3^-), koji često imaju i ulogu primarnog signalnog molekula u biljnom organizmu (Takei i sar., 2002). U mnogim ekosistemima, uključujući i agroekosisteme, amonijum jon (NH_4^+) je glavni izvor azota (Pearson i Stewart, 1993), mada je NH_4^+ u većoj količini toksičan za biljke. Simptomi se različito manifestuju, jer postoje osetljive grupe, kao i grupe biljaka tolerantne prema NH_4^+ . Predstavnici porodice *Alliaceae* se svrstavaju u grupu tolerantnih biljaka (Britto i Kronzucker, 2002).

Istraživanja su potvrdila postojanje direktnog uticaja mineralnih komponenti na proces morfogeneze. Najčešće se optimalna kombinacija minerala za svaku biljnu vrstu određuje empirijski i često se dešava da je jedan tip mineralnog rastvora optimalan samo tokom određene faze rasteња i razvića (Ramage i Williams, 2002).

Još pre četiri decenije Dunstan i Short (1977) su regulisanjem odnosa komponenti u hranljivoj podlozi uspeli da poboljšaju proliferaciju kalusa vrste *A. cepa*. Upoređujući nivo makroelemenata u MS (Murashige i Skoog, 1962) i B5 (Gamborg i sar., 1968) mineralnim rastvorima sa nivoom koji je neophodan za pravilno razviće ove vrste u prirodnom okruženju modifikovali su odnos NO_3^- i NH_4^+ i formulisali novi BDS mineralni rastvor (Dunstan i Short, 1977). BDS je u stvari modifikovani B5 mineralni rastvor sa povećanom količinom NO_3^- , NH_4^+ i fosfata. MS takođe sadrži veću količinu NO_3^- , NH_4^+ i fosfata od B5, ali i od BDS mineralnog rastvora. U kasnijim istraživanjima, Luciani i sar. (2001) su demonstrirali efikasnije umnožavanje izdanaka *A. sativum* na podlozi sa BLM mineralnim rastvorom u poređenju sa podlogama koje su sadržale MS ili BDS mineralni rastvor. BLM je modifikovani BDS mineralni rastvor sa povećanim nivoom NO_3^- , dok je nivo NH_4^+ ostao isti.

Kao što je već naglašeno, biljke imaju različite potrebe za mineralnim materijama tokom različitih fizioloških procesa i tokom različitih faza razvića. Za indukciju somatske embriogeneze kod belog luka White mineralni rastvor (White,

1943), koji sadrži manju količinu nitrata, je bio efikasniji od MS mineralnog rastvora (Sata i sar., 2001). Suprotno tome, veći odnos NO_3^- prema NH_4^+ je stimulisao kaulogenezu i uticao na smanjenje hiperhidratacije izdanaka belog luka (Nagakubo i sar., 1993). S druge strane, mineralni rastvor ($\frac{1}{2}$ MS, MS, B5 ili N6) nije značajno uticao na indukciju pupoljaka iz apikalnog regiona korena belog luka (Haque i sar., 1997), dok je proliferacija pupoljaka belog luka bila efikasnija na podlozi sa B5 nego sa MS mineralnim rastvorom (Bhojwani, 1980; Haque i sar., 1997), ali su izdanci bili duži na MS podlozi (Haque i sar., 1997). Značajno veći broj korenova su imale biljke ožiljene na podlozi koja je sadržala B5 ili $\frac{1}{2}$ MS mineralni rastvor u odnosu na MS ili N6 (Nitsch, 1969), dok su biljke gajene na podlozi sa B5 ili MS mineralnim rastvorom formirale najduži koren (Haque i sar., 1997). Najveća produkcija biomase biljaka na MS podlozi je verovatno izazvana većom koncentracijom nitrata i fosfata u MS nego u B5 podlozi, a najmanja na N6 je verovatno zbog supraoptimalne koncentracije fosfata (Haque i sar., 1997). MS je bio pogodniji od BDS za regeneraciju crnog luka i šalota iz zrelih zigotskih embriona (Zheng i sar., 1998), ali nije bilo značajne razlike između MS i BDS u efikasnosti indukcije direktne kaulogeneze iz meristema izdanaka belog luka (Ma i sar., 1994). Za indukciju kalusa iz bazalnih odsečaka *A. chinensis* najveća frekvencija kalusiranja je postignuta na podlozi sa B5 mineralnim rastvorom, neznajno manja na podlozi sa MS mineralnim rastvorom i upola manja na podlozi sa LS mineralnim rastvorom (Yan i sar., 2009). U novijim istraživanjima je pokazano da modifikacija sadržaja NH_4NO_3 u podlozi za indukciju somatske embriogeneze kod monokotila može dovesti do povećanja broja somatskih embriona (Greer i sar., 2009).

Svetlost

Uobičajena procedura je da se faza indukcije kalusa dešava u mraku, dok se faza regeneracije odigrava u prisustvu svetlosti (Robledo-Paz i sar., 2000; Fereol i sar., 2002; Zheng i sar., 2003; Zhang i sar., 2004; Luciani i sar., 2006; Ramakrishnan i sar., 2013). U ovim studijama gustina svetlostnog fluksa (eng. *photosynthetic photon flux density*, PPF) je varirala od $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Zhang i sar., 2004) do $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Zheng i sar., 2003). Kulture su najčešće bile izložene fotoperiodu od 16 h svetlosti/ 8 h mraka (Robledo-Paz i sar., 2000; Zheng i sar., 2003; Luciani i sar., 2006; Ramakrishnan i sar., 2013).

Međutim, Martín-Urdíroz i sar. (2004) su utvrdili da se efikasnost regeneracije značajno povećava ako su eksplantati od samog početka izloženi svetlosti. Značajno je napomenuti da prisustvo svetlosti od samog početka eksperimenta nije uticalo na učestalost kalusiranja i kvalitet dobijenog kalusa (Martín-Urdíroz i sar., 2004). Hong i Debergh (1995) su pokazali da je kvantitet i kvalitet embriogenog kalusa opadao sa dužinom gajenja eksplantata u mraku. Zhang i sar. (2004) su selekcionisali visoko regenerativne linije ćelijskih agregata crnog luka gajenih u suspenziji kratkim gajenjem suspenzija u mraku, zatim na svetlosti i selekcionisanjem zelenih agregata. Posle tri ciklusa selekcije dobili su linije sa izuzetno visokim regenerativnim potencijalom.

Pregledom literature je ustanovljeno da rezultati dobijeni u okviru istraživanja morfogeneze *in vitro* jedne biljne vrste ne mogu se primeniti na druge vrste, pa čak i na vrste u okviru istog roda. Svi ti rezultati ukazuju da je za svaku vrstu neophodno razviti efikasan protokol, koji obuhvata određivanje pogodnog tipa eksplantata, dužinu tretmana i odgovarajuću kombinaciju RR.

2. CILJEVI RADA

Primenom različitih biotehnoloških metoda moguće je značajno povećati prinos biljaka, zatim poboljšati njihovu hranljivu vrednost i otpornost na stresne uslove. Za sve to je prvo potrebno razviti efikasan protokol za regeneraciju *in vitro*. Za vrste *A. ascalonicum* i *A. schoenoprasum* do sada nije uspostavljen efikasan sistem za regeneraciju *in vitro*, stoga je cilj ove disertacije uspostavljanje pouzdanog i efikasnog protokola za regeneraciju *in vitro* ovih vrsta i proučavanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema tokom procesa regeneracije. Realizacija ovog cilja obuhvatala je izvršenje nekoliko zadataka:

- ✓ testiranje individualne varijabilnosti morfogenetskog potencijala *in vitro* i izbor linija sa visokim kaulogenim/embriogenim potencijalom;
- ✓ optimizaciju uslova (izbor tipa eksplantata, kombinacije regulatora rastjenja, trajanje tretmana i uslova osvetljenja) za indukciju regeneracije kod izabranih linija sa visokim regenerativnim potencijalom;
- ✓ primenu optimizovanog protokola na linije sa nižim regenerativnim potencijalom;
- ✓ histološku analizu, *in vivo* detekciju H_2O_2 i studiranje promena aktivnosti enzima antioksidativnog sistema (POD, CAT i SOD) tokom procesa regeneracije na izabranom najefikasnijem sistemu za regeneraciju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Indukcija kaulogeneze iz odsečaka korenova *A. ascalonicum*

3.1.1. Osnovna podloga

Osnovna hranljiva podloga za gajenje šalota *in vitro* je sadržala MS (Murashige i Skoog, 1962) mineralne soli (Lachner, Brno, Republika Češka, Tab. 6), 20 g L⁻¹ saharoze, 100 mg L⁻¹ mio-inozitola, 2 mg L⁻¹ tiamina, 2 mg L⁻¹ piridoksina, 5 mg L⁻¹ nikotinske kiseline, 2 mg L⁻¹ adenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 7 g L⁻¹ agara (Institut "Torlak", Beograd, Srbija). pH hranljive podloge je podešen na 5,6 upotrebom pH-metra, a zatim je hranljiva podloga sterilisana u autoklavu tokom 25 min na 114 °C (80 kPa).

Tabela 6. Sastav MS (Murashige i Skoog, 1962) mineralnog rastvora.

Makro elementi	mg L ⁻¹	Mikro elementi	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ x H ₂ O	16,9
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	KJ	0,83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
Kompleks gvožđa	mg L ⁻¹	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,2	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8		

3.1.2. Biljni materijal

Semena šalota su sakupljena u avgustu 2011. godine sa biljaka koje su rasle u selu Stenje, u blizini Prespanskog jezera, na jugoistočnim padinama planine Galičica u Republici Makedoniji. Determinaciju vrste su izvršili prof. dr Goran Anačkov i prof. dr Ružica Igić, Departman za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Vaučer broj 2-1698 je deponovan u Herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Površinska sterilizacija semena je započeta ispiranjem tekućom vodom uz dodatak nekoliko kapi deterdženta (Fairy, Procter & Gamble Co). Zatim su semena sterilisana 30% rastvorom komercijalnog izbeljivača (4% NaClO, "Snežnik", Panonija, Pančevo) u trajanju od 30 min, i još 15 min 15% rastvorom istog izbeljivača. Na kraju su semena isprana tri puta sterilnom destilovanom vodom i ocedena na sterilnom filter papiru. Sterilisana semena su pod aseptičnim uslovima postavljena u Petri kutije prečnika 90 mm (Spektar, Čačak, Srbija) (20 semena po Petri kutiji) na čvrstu MS podlogu bez RR. Posle 7-14 dana, nekontaminirani klijanci su izdvojeni i prebačeni u nove Petri kutije (tri klijanca po kutiji) na istu hranljivu podlogu, i tu su rasli još nekoliko nedelja omogućavajući korenovom sistemu da se dobro razvije.

Kao izvor materijala za eksperimente su korišćeni korenovi izolovani sa biljaka koje su se razvile iz klijanaca. Apikalni pupoljci klijanaca su takođe izolovani i postavljeni u epruvete (jedan izdanak po epruveti) sa 20 mL MS podloge bez RR. Izdanak i odsecci korenova istog klijanca su označeni istim brojem, i održavani su kao pojedinačna linija.

3.1.3. Indukcija kalusa i regeneracija pupoljaka

Apikalni odsecci korenova (1 cm) klijanaca i biljaka koje su se razvile iz njihovih apikalnih pupoljaka su pažljivo izolovani i postavljeni u Petri kutije (jedna linija po kutiji) sa 25 mL MS podloge za indukciju kalusa, koja je sadržala 5 μM 2,4-D i 5 μM BA (Sigma-Aldrich). Kulture *in vitro* su gajene pod difuznom svetlošću pri PPFD od oko 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u trajanju od osam nedelja. Eksplantati sa formiranim kalusom su prebačeni na MS podlogu za indukciju regeneracije sa 5 μM BA, i gajeni su još osam nedelja pri PPFD od 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nakon čega su grupacije izdanaka formirane na kalusu prebačene na MS podlogu bez RR. Nakon četiri nedelje su izolovani pojedinačni izdanci i gajeni dodatne četiri nedelje na svežoj hranljivoj podlozi bez RR.

3.1.4. Uslovi kultivacije

Sve kulture *in vitro* su gajene pod svetlošću fluorescentnih lampi ("Tesla", Pančevo, Srbija) pri PPFD koji je u daljem tekstu naznačen za svaki eksperiment. Za merenje PPFD je korišćen uređaj "LI-1400 DataLogger" sa senzorom "LI-190SA

Quantum" (LI-COR Biosciences). Kulture *in vitro* su bile izložene fotoperiodu od 16 h svetlosti/ 8 h mraka i gajene na temperaturi od 25 ± 2 °C.

3.1.5. Regenerativni potencijal pojedinačnih linija

Trideset jedinki (linija), koje su dobijene isključivanjem pojedinačnih semena, su korišćene za testiranje regenerativnog potencijala. Materijal je pripremljen na isti način kao što je opisano u odeljku 3.1.3. Eksperiment je izveden u četiri ponavljanja (Petri kutije) sa 5-13 uzoraka (odsečaka korenova po Petri kutiji) po liniji ($n = 30-40$). Pupoljci su prebrojani pomoću stereo mikroskopa (Carl Zeiss, Jena, Nemačka) posle osam nedelja kultivisanja na podlozi za indukciju regeneracije.

3.1.6. Optimizacija protokola za regeneraciju

Za optimizaciju protokola za regeneraciju pupoljaka su korišćeni apikalni odsecci korenova biljaka, koje su dobijene regeneracijom iz odsečaka korenova klijanaca u prethodnom eksperimentu. Ove biljke su gajene u Erlenmajerima na MS hranljivoj podlozi bez RR. Za sve eksperimente je korišćena linija 6, zbog najvećeg regenerativnog potencijala i sposobnosti formiranja dobrog korenovog sistema, čime je bila obezbeđena dovoljna količina biljnog materijala za eksperimente.

Protokol za optimizaciju uslova za regeneraciju pupoljaka je obuhvatio optimizaciju inteziteta svetlosti tokom faze indukcije kalusa i indukcije regeneracije, odnos 2,4-D/BA tokom faze indukcije kalusa i trajanje faze indukcije kalusa.

Uticaj inteziteta svetlosti na regeneraciju pupoljaka iz odsečaka korenova tokom faze indukcije kalusa i indukcije regeneracije je testiran u dva eksperimenta. U prvom eksperimentu, odsecci korenova su bili izloženi PPFĐ od 0, 10, 50, 100 ili $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom obe faze, dok su u drugom eksperimentu odsecci korenova bili izloženi PPFĐ od 0, 10, 50, 100 ili $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom faze indukcije kalusa, a zatim su svi eksplantati bili izloženi PPFĐ od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom faze indukcije regeneracije. Podloge za indukciju kalusa i indukciju regeneracije su bile iste kao podloge opisane u poglavlju 3.1.3. Obe faze su trajale po osam nedelja.

Uticaj odnosa 2,4-D/BA tokom faze indukcije kalusa je testiran kombinovanjem 1, 5 ili $10 \mu\text{M}$ 2,4-D sa 0, 1, 5 ili $10 \mu\text{M}$ BA u trajanju od osam nedelja. Nakon toga su

svi eksplantati subkultivisani na MS podlogu za indukciju regeneracije sa 5 μM BA, takođe u trajanju od osam nedelja. Tokom obe faze eksplantati su bili izloženi PPFD od 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Optimalno trajanje faze indukcije kalusa je određeno gajenjem apikalnih odsečaka korenova na podlozi za indukciju kalusa tokom različitog vremenskog perioda (0-12 nedelja). Nakon toga, eksplantati su subkultivisani na podlogu za indukciju regeneracije. Trajanje ove faze je takođe bilo varijabilno, tako da su obe faze ukupno trajale 12 nedelja. PPFD tokom obe faze je iznosio 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ustanovljeni optimalni protokol za regeneraciju pupoljaka linije 6, koji je obuhvatao pet nedelja kultivacije na podlozi za indukciju kalusa (5 μM 2,4-D i 5 μM BA) i osam nedelja na podlozi za indukciju regeneracije (5 μM BA), pri PPFD od 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom obe faze, je primenjen na osam linija sa različitim regenerativnim potencijalom. Odabrane su sledeće linije za eksperiment: 6 i 35 (sa visokim regenerativnim potencijalom), 2, 14 i 54 (sa umerenim regenerativnim potencijalom) i 32, 34 i 45 (sa niskim regenerativnim potencijalom).

Eksperimenti za optimizaciju inteziteta svetlosti, odnosa 2,4-D/BA, trajanja faze indukcije kalusa i primenu tog optimiziranog protokola na izabrane linije su izvedeni kroz tri ponavljanja (Petri kutije), svaki sa 20 uzoraka ($n = 60$). Regeneranti su izbrojani pomoću stereo mikroskopa nakon osam nedelja kultivisanja na podlozi za indukciju regeneracije.

3.1.7. Ožiljavanje i aklimatizacija biljaka

Za indukciju ožiljavanja, dobro razvijeni pojedinačni izdanci linije 6 su kultivisani na podlozi za ožiljavanje sa MS ili $\frac{1}{2}$ MS mineralnim rastvorom i 0, 1, 5 ili 10 μM indol-3-buternom kiselinom (IBA) (Sigma-Aldrich) tokom pet nedelja. Ožiljene biljke su posađene u žardinjere sa mešavinom humusa i perlita u odnosu 4:1 (v/v), zatim su tretirane fungicidom (Previcur, Bayer Crop Science, Nemačka). Biljke u žardinjerama su tokom prve nedelje bile zaštićene providnom folijom, da bi se na taj način očuvala vlažnost i omogućilo da se što bolje prilagode uslovima u stakleniku. Označene su biljke koje su prethodno gajene na različitim podlogama za ožiljavanje, tako da je bilo moguće pratiti uticaj tih tretmana na stopu preživljavanja biljaka.

Za eksperiment ožiljavanja je postavljeno pet Erlenmajera sa po šest biljaka po tretmanu ($n = 30$). Nakon pet nedelja kultivacije izbrojani su korenovi i izmerena je dužina najdužeg korena. Ožiljene biljke su posađene u žardinjere (po pet biljaka u šest redova) i broj uspešno aklimatizovanih biljaka je određen posle četiri nedelje.

3.2. Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova *A. schoenoprasum*

3.2.1. Osnovna podloga

Za gajenje vlašca u uslovima *in vitro* pored MS mineralnog rastvora (Tab. 6), korišćen je i BDS (Dunstan i Short, 1977) mineralni rastvor (Tab. 7).

Tabela 7. Sastav BDS (Dunstan i Short, 1977) mineralnog rastvora.

Jedinjenje	mg L ⁻¹	Jedinjenje	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	329,16	H ₃ BO ₃	3
KNO ₃	2530	KJ	0,75
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150	NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
MgSO ₄ x 7H ₂ O	247	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
NH ₄ H ₃ PO ₄	230,06	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,039
(NH ₄) ₃ x SO ₄	134	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	172
MnSO ₄ x 4H ₂ O	13,2	Na ₂ EDTA	37,25
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85

3.2.2. Biljni materijal

Semena vlašca su sakupljena sa biljaka koje su gajene u Botaničkoj bašti Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Vaučer broj 1753 2-1917 je deponovan u Herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Površinska sterilizacija i isključavanje semena je izvršeno po proceduri opisanoj za *A. ascalonicum* (videti odeljak 3.1.2.). Apikalni pupoljci klijanaca su takođe izolovani i kultivisani kako je opisano u odeljku 3.1.2. Izdanak i odsečki korenova istog klijanca su označeni istim brojem i održavani su kao pojedinačna linija. Nakon preliminarnih istraživanja, odabrana je linija 3 sa najvećim

regenerativnim potencijalom. Eksplantati izolovani sa biljaka ove linije su korišćeni za sve eksperimente.

3.2.3. Indukcija kalusa iz odsečaka korenova i regeneracija somatskih embriona

Za indukciju kalusa, apikalni odsecci korenova klijanaca (1 cm) i biljaka vlašca koje su se razvile iz njihovih apikalnih pupoljaka su kultivisani na MS ili BDS podlozi, koja je sadržala 5 μM 2,4-D u kombinaciji sa 1, 5 ili 10 μM Kin (Sigma-Aldrich), BA ili TDZ (Duchefa Biochemia, Holandija) u trajanju od osam nedelja. Testirano je 18 tretmana: tri tipa citokinina (BA, Kin ili TDZ), tri koncentracije citokinina (1, 5 i 10 μM) i dva tipa mineralnog rastvora (MS ili BDS). Za svaki tretman je postavljeno pet ponavljanja (Petri kutija) sa 20 uzoraka (odsecci korenova) ($n = 100$). Učestalost formiranja kalusa je zabeležena posle osam nedelja kultivacije.

Nakon toga, kalusi dobijeni na različitim podlogama za indukciju kalusa su subkultivisani na podlogu istog mineralnog sastava (MS ili BDS), koja je sadržala samo 1 μM 2,4-D. Kalusi su subkultivisani u Petri kutije (10 kalusa po Petri kutiji), sa 2-8 ponavljanja po tretmanu ($n = 20-78$), u zavisnosti od broja kalusa dobijenih u prethodnoj fazi. Uticaj svih 18 tretmana za indukciju kalusa na kasniju indukciju somatske embriogeneze je procenjen posle osam nedelja kultivisanja na MS ili BDS podlozi sa 1 μM 2,4-D. Somatski embrioni su izbrojani uz pomoć stereo mikroskopa.

Embriogeni kalus, sa uočljivim globularnim embrionima, gajen na podlozi sa 1 μM 2,4-D, je podeljen na jednake delove (5 x 5 mm) i subkultivisan na MS podlogu sa 0; 0,5; 2,5 ili 5 μM Kin u trajanju od četiri nedelje, sa ciljem da se somatski embrioni što bolje razviju i umnože. Svaki tretman je urađen u dva ponavljanja sa četiri uzorka (Petri kutije) i pet poduzoraka (kalusa) ($n = 40$). Broj somatskih embriona, kao i broj embriona sa dobro razvijenim apikalnim pupoljkom i korenom su određeni uz pomoć stereo mikroskopa posle četiri nedelje.

Biljke vlašca koje su se razvile iz somatskih embriona na podlozi sa Kin, su subkultivisane na $\frac{1}{2}\text{MS}$ podlogu bez RR da bi se korenov sistem što bolje razvio. Testiran je uticaj koncentracije Kin u prethodnoj podlozi (0,5; 2,5 i 5 μM) na kasnije razviće izdanka i korena, nakon četiri nedelje kultivacije na $\frac{1}{2}\text{MS}$ podlozi bez RR, kada

je izmerena dužina korena i izdanka i izbrojani korenovi. Najmanje 30 biljaka je postavljeno po tretmanu.

3.2.4. Uslovi kultivacije

Kulture *in vitro* su gajene pod svetlošću fluorescentnih lampi, kako je opisano u odeljku 3.1.4., pri PPF od $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i fotoperiodu od 16 h svetlosti/ 8 h mraka, na temperaturi od $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.5. Aklimatizacija biljaka

Ožiljene biljke su posađene u saksije sa mešavinom komposta i peska u odnosu 2:1 (v/v). Nedelju dana su bile zaštićene prozirnom folijom i gajene u uslovima visoke vlažnosti, a zatim su bile izložene normalnim uslovima u stakleniku. Broj aklimatizovanih biljaka je određen posle četiri nedelje.

3.3. Indukcija kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum*

3.3.1. Biljni materijal

Kao materijal za eksperimente su korišćene biljke vlašca linije 3, prečnika oko 2 mm, sa 4-5 listova, gajene u uslovima *in vitro* na MS podlozi bez RR, koje su dobijene u prethodnom eksperimentu. Eksplantati su pripremljeni odstranjivanjem korenova do bazalnog dela stabljike, tzv. bazalne ploče, a zatim su napravljani uzastopni poprečni preseci biljke. Bazalni presek je obuhvatao bazalnu ploču, apikalni meristem izdanka (SAM) i bazu listova, dok su gornji preseci obuhvatali samo listove. Napravljeno je 3-6 preseka svake biljke, u zavisnosti od eksperimenta. Eksplantati su postavljeni u Petri kutije na MS podlogu (proksimalnom stranom prema podlozi) sa različitim sadržajem RR.

3.3.2. Uslovi kultivacije

Sve kulture *in vitro* su gajene kako je opisano u odeljku 3.1.4., pri PPF od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i fotoperiodu od 16 h svetlosti/ 8 h mraka, na temperaturi od $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.3. Indukcija kaulogeneze

Za indukciju kaulogeneze je od svake biljke napravljeno šest uzastopnih poprečnih preseka debljine 3 mm, koji su subkultivisani na čvrstu MS podlogu koja je sadržala 1, 5 ili 10 μM Kin, BA, ZEA (Olchemim, Olomouc, Češka Republika), *mT*; (Duchefa Biochemie), TDZ ili CPPU (Duchefa Biochemia). Za procenu uticaja citokinina na regenerativni potencijal i rastenje biljaka urađena su tri ponavljanja za svaki eksperiment, svaki sa četiri uzorka (Petri kutije) i tri poduzorka (biljke) ($n = 36$) po tretmanu.

3.3.4. Optimizacija procedure za regeneraciju

Za optimizaciju procedure za regeneraciju iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca testiran je uticaj različite debljine preseka. Ispitivana je regenerativna sposobnost bazalnih poprečnih preseka debljine 0,5; 2 i 5 mm. Preseci su kultivisani na podlozi sa 10 μM TDZ tokom osam nedelja. Od jedne biljke, uz pomoć veoma oštrog žileta, je isečeno šest preseka debljine 0,5 mm, ili po tri preseka debljine 2 ili 5 mm. Za procenu debljine poprečnog preseka na regenerativni potencijal i rastenje biljaka urađena su tri ponavljanja za svaki eksperiment, svaki sa četiri uzorka (Petri kutije) i tri poduzorka (biljke) ($n = 36$) po tretmanu.

Za ispitivanje uticaja produženog delovanja TDZ na kasnije rastenje i razviće izdanka, bazalni preseci biljaka debljine 3 mm su gajeni četiri nedelje na MS podlozi sa 10 μM TDZ, zatim su subkultivisani na podlogu sa 10 μM TDZ, 5 μM KIN, 1 μM *mT* ili na podlogu bez RR, u trajanju od još četiri nedelje. Za svaku biljku su postavljena tri preseka. Eksperiment je urađen u tri ponavljanja sa četiri uzorka (Petri kutije), svaki sa po četiri poduzorka (biljke) ($n = 48$). Broj izdanaka je određen uz pomoć stereo mikroskopa, i parametri rastjenja regeneranata (dužina najdužeg izdanka i korena, kao i broj korenova) su određeni osam nedelja posle subkultivisanja na četiri navedene podloge.

3.3.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. *scanning electron microscopy* - SEM) je upotrebljena za praćenje procesa regeneracije pupoljaka. Eksplantati su

direktno postavljeni unutar skenirajućeg elektronskog mikroskopa (JOEL-JSM-6390LV, Tokio, Japan) bez prethodne fiksacije.

3.3.6. Histološka analiza

Histološkoj analizi su podvrgnuti bazalni odsecci biljaka vlašca, kultivisani na podlozi koja je sadržala 10 μ M TDZ tokom 22 dana. Uzorci su fiksirani u rastvoru FAA (formalin : sirćetna kiselina : etanol = 10 : 5 : 85) na 4 °C, dehidrirani u seriji rastvora etanola rastuće koncentracije i ukalupljeni u parafin na 58 °C. Napravljene su presece debljine 8 μ m i obojeni hematoksilinom, a zatim fotografisani pod svetlosnim mikroskopom (Zeiss Axiovert microscope, Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Nemačka).

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

U svim eksperimentima kulture *in vitro* su bile nasumično raspoređene. Podaci izraženi u procentima su pre analize podvrgnuti angularnoj transformaciji ($\arcsin\sqrt{X}$), dok su podaci o broju regeneranata podvrgnuti transformaciji kvadratnim korenovanjem. Podaci su zatim podvrgnuti standardnoj analizi varijanse (ANOVA), a poređenja između srednjih vrednosti su urađena pomoću testa najmanje značajnih razlika (eng. *Least Significant Difference*, LSD) ili Duncan testom, sa nivoom značajnosti od $P \leq 0,05$. Za predstavljanje rezultata izvršena je inverzna transformacija.

Za regeneraciju pupoljaka iz odsečaka korenova šalota, rezultati su izraženi kao učestalost kalusa koji regenerišu pupoljke, srednji broj pupoljaka po kalusu i indeks kaulogeni potencijal (KP), koji je korišćen za procenu ukupnog efekta dve navedene promenljive. Izračunat je na sledeći način:

$$KP = (\text{srednji broj pupoljaka po Petri kutiji}) \times (\% \text{ kalusa koji regeneriše po Petri kutiji})$$

Za izračunavanje indeksa KP su korišćeni transformisani podaci, a vrednosti su prikazane bez inverzne transformacije.

Prilikom analize somatske embriogeneze kod odsečaka korenova vlašca, rezultati su izraženi kao učestalost eksplantata koji formiraju kalus, zatim učestalost kalusa koji regenerišu somatske embrione i broj somatskih embriona po regenerišućem

kalusu. Za procenu embriogenog potencijala korišćen je indeks embriogeni potencijal (EP) koji je izračunat na sledeći način:

$$EP = (\text{srednji broj somatskih embriona po embriogenom kalusu po Petri kutiji}) \times (\% \text{ embriogenog kalusa po Petri kutiji})$$

Za regeneraciju pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca rezultati su izraženi kao učestalost regeneracije pupoljaka iz poprečnog preseka koji sadrže SAM, zatim srednja vrednost broja pupoljaka po SAM preseku i indeks kaulogeni potencijal (KP), koji je izračunat po gore navedenoj formuli. Pošto su pupoljke regenerisali samo odsecci biljaka koji su sadržali SAM, za svaku biljku je unet samo jedan podatak (bez obzira što je za eksperiment korišćeno 3-6 preseka po biljci).

3.5. Analiza aktivnosti enzima antioksidativnog sistema tokom regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum*

Za praćenje promena aktivnosti antioksidativnog sistema tokom procesa regeneracije je izabran najefikasniji sistem za regeneraciju dobijen u ovom radu – indukcija pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca. Analizirana je aktivnost POD, CAT i SOD u bazalnim odseccima biljaka vlašca koji su bili kultivisani tokom 1, 3, 5, 7, 10 i 14 dana na podlozi sa 10 μM TDZ ili 1 μM Kin. Odabrana su ova dva tretmana, koja su u prethodnom eksperimentu indukovala najveći, odnosno najmanji regenerativni odgovor.

3.5.1. Izolacija proteina

Ukupni solubilni proteini su izolovani iz istog tipa eksplantata koji je u prethodnom eksperimentu korišćen za indukciju regeneracije. Bazalni poprečni preseki (3 mm) su postavljeni na podlogu sa 10 μM TDZ ili 1 μM Kin, kako je opisano u odeljku 3.3.1. Eksplantati su sakupljeni posle 1, 3, 5, 7, 10 i 14 dana kultivacije. Nakon tog vremenskog perioda, pred samu izolaciju proteina, uklonjeni su listovi koji su se razvili tokom perioda kultivacije i eksplantati su svedeni na dimenzije početnog eksplantata. Kao kontrola su korišćeni eksplantati pripremljeni neposredno pre izolacije proteina na isti način kao i eksplantati izloženi gore opisanim tretmanima. Kontrolni

eksplantati su izolovani sa biljaka starih četiri nedelje, koje su održavane na MS podlozi bez RR. Za svaki tretman i za svaku vremensku tačku je sakupljeno po 10 eksplantata, koji su činili jedan uzorak za izolaciju ukupnih proteina. Biljno tkivo je prvobitno mehanički usitnjeno do finog praha u tečnom azotu, zatim je ledeni ekstrakcioni pufer dodat u proporciji 2:1 (v/w). Ekstrakcioni pufer se sastojao od 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) (pH 8), 1 mM ditiotreitola (DTT), 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), 10% (v/v) glicerola i 5% (w/v) polivilnilpolipirolidona (PVP). Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 12000 x g u trajanju od 10 min na temperaturi od 4 °C. Supernatant je odliven u nove ependorfe, a zatim je usledilo ponovno centrifugiranje. Dobijeni ekstrakt je korišćen za dalju analizu. Koncentracija ukupnih proteina je određena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 595 nm (Bradford, 1976) uz korišćenje BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) kao proteinskog standarda. Eksperiment je urađen u dva biološka ponavljanja za svaki tretman.

3.5.2. Denaturišuća elektroforeza (SDS-PAGE) i imunodetekcija proteina

Izolovani proteini su pomešani sa puferom za uzorke (eng. *Sample Buffer*, SB; Laemmli, 1970) u odnosu 1:1. SB je sadržao 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2,5% (w/v) boje brom-fenol-plavo (BPB), 2% (w/v) Na-dodecil-sulfata (SDS), 10% (v/v) glicerola i 0,5% (v/v) β - merkptoetanol. Nakon dodavanja SB uzorci su inkubirani 5 min na 95 °C, nakon čega su brzo ohlađeni na 4 °C, a zatim centrifugirani 3 min na 12000 x g.

Razdvajanje proteina je izvršeno denaturišućom SDS-PAGE elektroforezom (eng. *SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*) na diskontinuiranom poliakrilamidnom gelu koji se sastojao od 7% gela za razdvajanje (eng. *separating gel*) i 4% gela za koncentrovanje (eng. *stacking gel*). Na gelove su nanošene jednake zapremine uzoraka sa po 15 µg ukupnih proteina. Proteini su razdvajani 120 min na 120 V u puferu za transfer (eng. *Transfer Buffer*, TB), koji je sadržao 25 mM Tris, 192 mM glicin i 0,1% (w/v) SDS - u aparaturi za vertikalnu elektroforezu Blue Vertical 102 (Serva Electrophoresis, GmbH, Nemačka).

Razdvajanje proteina je paralelno urađeno na dva gela. Jedan gel je korišćen za bojenje ukupnih proteina, inkubiranjem gela u rastvoru boje u trajanju od 45 min, zatim

obezbojavanjem gela u PDS rastvoru (eng. *Protein Destaining Solution*). Rastvor za bojenje je sadržao 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue boje, 50% (v/v) metanola i 10% (v/v) glacijalne sirćetne kiseline. PDS rastvor je sadržao 15% (v/v) metanola i 7% (v/v) glacijalne sirćetne kiseline.

Drugi gel je iskorišćen za detekciju specifičnih proteina imuno blot (eng. *Immuno blotting*) procedurom. Transfer proteina sa poliakrilamidnog gela izvršen je elektrotransferom na PVDF (eng. *polyvinylidene difluoride*) membranu (Bio-Rad, SAD), u trajanju od 60 min na 100 V, u TB koji je sadržao 25 mM Tris-HCl i 192 mM glicin. Membrane su nakon toga inkubirane preko noći na 4 °C u rastvoru 10% nemasnog mleka u prahu (eng. *Non fat dry milk*; NFDm; Nestle, SAD) u T-PBS puferu (PBS pufer + 0,05% Tween-20). PBS pufer (eng. *Phosphate - Buffered Saline*) sadrži 80 g L⁻¹ NaCl, 2 g L⁻¹ KCl, 26,8 g L⁻¹ Na₂HPO₄ × 7H₂O i 2,4 g L⁻¹ KH₂PO₄.

Sledećeg dana membrane su nakon ispiranja u T-PBS (2 x 1 min) inkubirane u rastvorima primarnih antitela, tokom dva sata na sobnoj temperaturi uz blago mešanje.

Za detekciju aktina korišćena su komercijalna primarna monoklonalna antitela proizvođača Agrisera Antibodies, Švedska (*Anti-Mouse Actin 11*, kat. br. AS10 702), dobijena imunizacijom miša, a rastvorena u 5% NFDm u T-PBS puferu, u odnosu 1:1000 (v:v).

Kod imunodetekcije izoformi SOD korišćena su komercijalna poliklonalna primarna antitela istog proizvođača. Antitela za detekciju Cu/Zn-SOD (*Anti-Rabbit Chloroplastic CuZn Superoxide Dismutase*; kat. br. AS06 170) i Mn-SOD (*Anti-Rabbit Mn-Superoxide Dismutase*, kat. br. AS09 524), dobijena imunizacijom zeca, rastvorena su u T-PBS puferu koji je sadržao 5% NFDm, u odnosu 1:10000 (v:v). Za detekciju CAT korišćena su antitela proizvođača Abcam, SAD (*Anti-Rabbit Catalase*, kat. br. ab1877), takođe rastvorena u 5% NFDm u koncentraciji 1:1000 (v:v).

Sve membrane su nakon inkubacije u rastvorima primarnih antitela ispirane 2 x 1 min i 3 x 10 min u T-PBS puferu. Zatim je usledila dvočasovna inkubacija sa sekundarnim antitelom na sobnoj temperaturi. U radu su korišćena komercijalna sekundarna antitela, koja su konjugovana sa POD iz rena: *Goat Anti-Rabbit IgG-HRP* (kat. br. A0545, Sigma Aldrich) i *Goat Anti-Mouse IgG-HRP* (kat. br. SC 2031, Agrisera

Antibodies), oba rastvorena u T-PBS puferu koji sadrži 5% NFDM, u odnosu 1:20000 (v:v).

Nakon ponovnog ispiranja u T-PBS puferu membrane su inkubirane 5 min u ECL (eng. *Enhanced Chemiluminescence*) detekcionom reagensu, a nakon toga je izvršena ekspozicija na film (Kodak X-Omat LS film, Sigma Aldrich) u trajanju od 2 do 5 min. ECL reagens sadrži 0,2 mM p-kumarnu kiselinu, 1,25 mM 3-amino ftalidrazid (luminol) i 30% (v/v) H₂O₂ u 100 mM Tris-HCl puferu (pH 8,5).

3.5.3. Nativna elektroforeza (Native PAGE)

Razdvajanje izoformi analiziranih enzima je vršeno nativnom elektroforezom na diskontinuiranim poliakrilamidnim gelovima, koji su se sastojali od 10% gela za razdvajanje i 4% gela za koncentrovanje, korišćenjem Mini-Protean Tetra Cell sistema (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Na gelove je nanošeno 15 µg ukupnih proteina. Razdvajanje proteina je vršeno tokom 150 min na 4 °C, prvih 20 min pri voltaži od 100 V, a zatim pri voltaži od 120 V, u Tris-glicin TB pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glicin) (Laemmli, 1970). Nakon završenog razdvajanja ukupnih proteina pristupilo se specifičnim bojenjima, koja su omogućila detektovanje aktivnosti POD, CAT i SOD.

Za analizu aktivnosti POD su korišćene tri različite metode sa ciljem optimizovanja protokola koji će omogućiti detekciju što većeg broja izoformi ovog enzima. Za sve tri metode osnovna komponenta rastvora za bojenje je 50 mM K-fosfatni pufer. U prvoj metodi gelovi su nakon native elektroforeze inkubirani u rastvoru za bojenje, koji je pored pufera sadržao 10 mM pirogalol kao supstrat i 10 mM (v/v) H₂O₂ (Mittler i Zilinskas, 1993). U reakciji POD sa ovim jedinjenjem nastaje smeđe jedinjenje purpurogalin, te se na mestima gde je bila prisutna peroksidaza uočavaju braon trake. Zatim je urađena metoda koju su opisali Dragišić-Maksimović i sar. (2013) korišćenjem 4-hloro-1-naftola kao POD supstrata. Gelovi su nakon native elektroforeze inkubirani u rastvoru za bojenje koji je sadržao pufer sa 0,56 mM 4-hloro-1-naftolom i 0,01% (v/v) H₂O₂. Na mestima na kojima je detektovana POD aktivnost pojavile su se trake ljubičaste boje nakon 20 min od početka bojenja. U trećoj metodi po Mohammadi i Kazemi (2002), gelovi su nakon native elektroforeze inkubirani 30 min

u rastvoru za bojenje koji je pored pufera sadržao i 5 mM gvajakol kao supstrat. Nakon dodavanja 5 μ L 30% (v/v) H_2O_2 u rastvor za bojenje nastaje crveno jedinjenje tetrahidrogvajakol, na mestima na kojima je bila detektovana aktivnost POD.

Za detekciju CAT korišćena je metoda koju su opisali Woodbury i sar. (1971). Nakon native elektroforeze gelovi su inkubirani 10 min u 0,01% (v/v) rastvoru H_2O_2 , zatim su kratko isprani destilovanom vodom i inkubirani su još 10 min u rastvoru za bojenje koji je sadržao 0,123 mM gvožđe(III)-hlorid ($FeCl_3$) i 0,061 mM kalijum-heksacijanoferat(III) [$K_3Fe(CN)_6$]. Jedinjenje $KFe^{III}(Fe^{II}(CN)_6)$, koje pri tome nastaje, boji gel plavo-zeleno. Na mestima na kojima je bila prisutna CAT (koja vrši degradaciju H_2O_2) pojavljivale su se bezbojne trake nakon nekoliko minuta. Kada su se trake najbolje uočavale reakcija je zaustavljena ispiranjem gela destilovanom vodom.

Za detekciju SOD korišćena je modifikovana metoda koju su opisali Beauchamp i Fridovich (1971). Gelovi su nakon native elektroforeze inkubirani 30 min u mraku u smeši koja je sadržala 1 mM EDTA, 0,25 mM NBT (eng. *nitroblue tetrazolium*), 0,08 mM riboflavin i 1,33 mM TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) u 100 mM K-fosfatnom puferu (pH 7,8). Gelovi su zatim isprani destilovanom vodom i osvetljeni svetlošću fluorescentnih lampi u trajanju od 15 min, kada je započela fotohemijaska reakcija. Gelovi su dobili ljubičastu boju usled formiranja formazana, a na mestima aktivnosti SOD pojavile su se bezbojne trake. Različite SOD izoforme su identifikovane tako što su gelovi inkubirani u rastvoru inhibitora u trajanju od 30 min pre bojenja (Vitória i sar., 2001). KCN (1 mM) je korišćen za inhibiciju Cu/Zn-SOD aktivnosti, a H_2O_2 (4 mM) za inhibiciju Cu/Zn-SOD i Fe-SOD aktivnosti, dok je Mn-SOD aktivnost bila otporna na oba inhibitora (Bridges i Salin, 1981).

3.5.4. Diferencijalno bojenje POD i CAT

Nakon detekcije POD i CAT metodama opisanim u odeljku 3.5.3. uočeno je da dolazi do preklapanja mesta na kojima su detektovane izofome ova dva enzima. Zbog toga je urađeno diferencijalno bojenje POD i CAT sa ciljem precizne detekcije ovih enzima i razdvajanja njihovih aktivnosti na gelu (Darr i Fridovich, 1985).

Nakon native elektroforeze gelovi su kratko isprani u K-fosfatnom puferu (pH 7). Prvi gel je inkubiran 45 min u rastvoru peroksidaza (Sigma-Aldrich)

koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon isteka ovog vremenskog perioda u rastvor je dodat $5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ i nastavljeno je inkubiranje još 10 min . Nakon toga gel je ispran destilovanom vodom. Zatim je usledila inkubacija gela u rastvoru 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). Ovo jedinjenje u reakciji sa POD daje tamno braon boju, dok istovremeno inhibira aktivnost CAT, pa zbog toga deo gela na kome se pozicioniraju ovi enzimi ostaje neobojen.

Drugi gel je 10 min inkubiran u 5 mM rastvoru H_2O_2 . Nakon toga gel je ispran destilovanom vodom. Zatim je usledila inkubacija gela u rastvoru DAB u trajanju od 20 min . Na ovom gelu se jasno uočavaju braon obojene trake POD, dok su CAT inhibirane.

3.5.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti POD, CAT i SOD

Ukupna aktivnost POD je izmerena po modifikovanoj metodi Flatmark-a (1964) u $1,5 \text{ mL}$ reakcione smeše koja je sadržala 10 mM pirogalol i $10 \mu\text{L}$ proteinskog izolata u 50 mM K-fosfatnom puferu (pH 6,5). Reakcija započinje dodavanjem $0,07\%$ (v/v) H_2O_2 . POD katalizuje polimerizaciju i oksidaciju pirogalola u prisustvu H_2O_2 . Nastali proizvod je purpurogalin, čija je kinetika nastajanja praćena na 430 nm merenjem povećanja apsorbance pomoću Agilent 8453 spektrofotometra (Life Science, SAD). Aktivnost enzima je izračunata prema jednačini:

$$A_{\text{POD}} = \frac{(V_T \times \Delta A \times 1000)}{V_U \times 2,47}$$

ΔA – promena apsorbance na 430 nm u minuti ($\text{min}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

V_T – zapremina reakcione smeše (mL)

V_U – zapremina uzorka (mL)

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

Specifična POD aktivnost je izražena u jedinicama (U) koje predstavljaju broj μmol purporogalina koji se nagradi u min ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

Aktivnost CAT je određena spektrofotometrijski praćenjem kinetike na 240 nm (posledica potrošnje H_2O_2 u reakcionoj smeši), po metodi koju je opisao Aebi (1984). Reakciona smeša (1,5 mL) se sastojala od 50 mM Na-K-fosfatnog pufera i 10 μL proteinskog izolata. Reakcija je započela dodavanjem 0,07% (v/v) H_2O_2 . Aktivnost CAT je izračunata prema jednačini:

$$A_{CAT} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) \times V_K \times 1000}{0,0436 \times V_U}$$

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

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

V_K – zapremina reakcione smeše (mL)

V_U – zapremina uzorka (mL)

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

Specifična CAT aktivnost je izražena u jedinicama (U) koje predstavljaju broj μmol H_2O_2 koji se razgradi u min ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

Određivanje ukupne aktivnosti SOD se zasniva na sposobnosti enzimskog ekstrakta da inhibira fotohemijску redukciju NBT do formazana (Beyer i Fridovich, 1987). Reakciona smeša je sadržala 50 mM K-fosfatni pufer (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 12 mM L-metionina, 0,075 mM NBT, 0,002 mM riboflavina i 0-10 μL proteinskog ekstrakta. Reakciona smeša je izložena svetlosti u trajanju od 15 min na temperaturi od 25 °C. Apsorbanca na 540 nm je zabeležena pomoću ELISA Micro plate reader aparata (LKB Vetriebs GmbH, Austija). Mera aktivnosti SOD je kapacitet određenog ekstrakta da inhibira fotohemijскую redukciju NBT u formazan, koji je plave boje. Intezitet boje, koji je inverzno proporcionalan aktivnosti SOD uzorka, je meren kao povećanje apsorbance na 540 nm. Jedna SOD jedinica (U) se definiše kao količina ekstrakta koja dovodi do 50% inhibicije fotohemijске redukcije NBT u poređenju sa osvetljavanom smešom bez ekstrakta.

Specifična aktivnost POD, CAT i SOD je izražena kao jedinica enzimske aktivnosti (U) po mg solubilnih proteina. Rezultati su predstavljeni relativno u odnosu

na aktivnosti dobijene u netretiranoj kontroli kojima je dodeljena vrednost 1. Prikazane vrednosti su izražene kao srednja vrednost iz dva biološka ponavljanja za svaki uzorak.

3.5.6. *In vivo* detekcija H₂O₂ u biljnom tkivu

U biljnom tkivu je detektovano prisustvo H₂O₂ korišćenjem jedinjenja DAB (Orozco-Cardenas i Ryan, 1999). Bazalni odsečki debljine 3 mm su gajeni na podlozi sa 10 µM TDZ tokom tri dana kako je opisano u odeljku 3.3.1. Nakon toga eksplantati su uronjeni u DAB rastvor (1 mg mL⁻¹, pH 3,8) u trajanju od 8 h pri temperaturi od 25 °C. Tokom reakcije DAB i H₂O₂ pojavljuju se tamno braon obojena polimerizovana jedinjenja. Nakon toga eksplantati su preko noći bili uronjeni u 96% etanol prilikom čega je došlo do obezbojavanja biljnog tkiva, te su akumulirani produkti reakcije ostali jasno uočljivi.

3.5.7. Statistička obrada podataka koji se odnose na aktivnost enzima antioksidativnog sistema

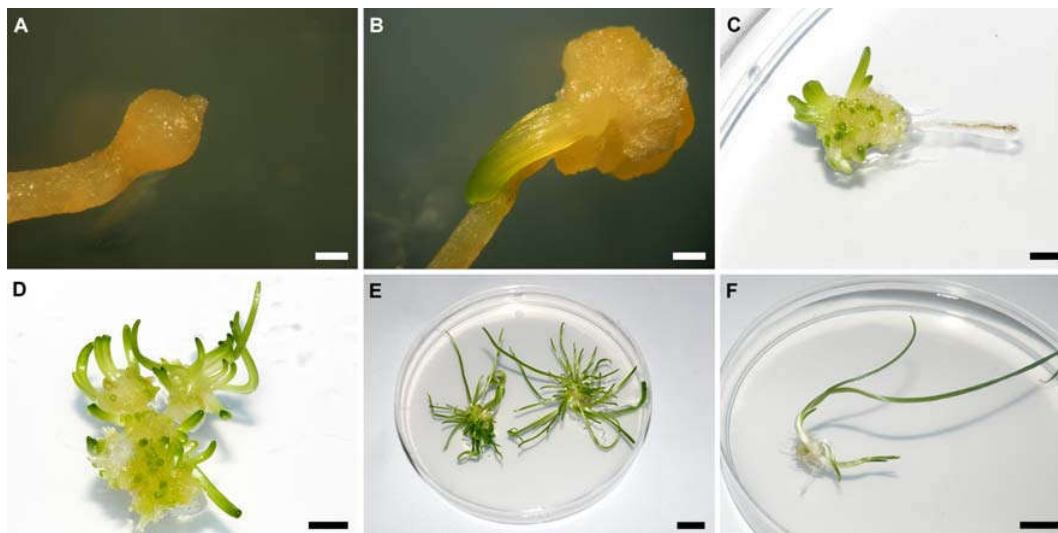
Vrednosti dobijene spektrofotometrijskim određivanjem nivoa aktivnosti analiziranih antioksidativnih enzima podvrgnute su standardnoj analizi varijanse (ANOVA). Određivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti vršeno je LSD testom na nivou značajnosti $P \leq 0,05$. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti dva nezavisna biološka ponavljanja. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ukazuju na statistički značajne razlike.

4. REZULTATI

4.1. Indukcija kaulogeneze iz odsečaka korenova *A. ascalonicum*

4.1.1. Indukcija kalusa, regeneracija pupoljaka i umnožavanje izdanaka

U preliminarnim istraživanjima je pokazano da samo apikalni region korena *A. ascalonicum* ima sposobnost formiranja kalusa na podlozi za indukciju kalusa, pa su u daljim istraživanjima korišćeni samo ovi odsecci kao eksplantati. Već tokom prve nedelje kulture apikalni deo korena se uvećavao (Sl. 2A), a nakon osam nedelja na tom delu eksplantata je uočen kalus (Sl. 2B). Kalusi, koji su dobijeni od različitih linija klijanaca, nisu imali sposobnost regeneracije pupoljaka tokom kulture na podlozi za indukciju kalusa, izuzev linije 6 (Sl. 2B). Nakon subkultivisanja eksplantata na podlogu za indukciju regeneracije iz kalusa su regenerisali pupoljci (Sl. 2C-E). Grupe pupoljaka, subkultivisane na MS podlogu bez RR, su se dalje razvijale, formirajući bokore ili busenove, da bi zatim izolovane pojedinačne biljke spontano formirale korenov sistem na svežoj MS podlozi u naredne četiri nedelje (Sl. 2F).

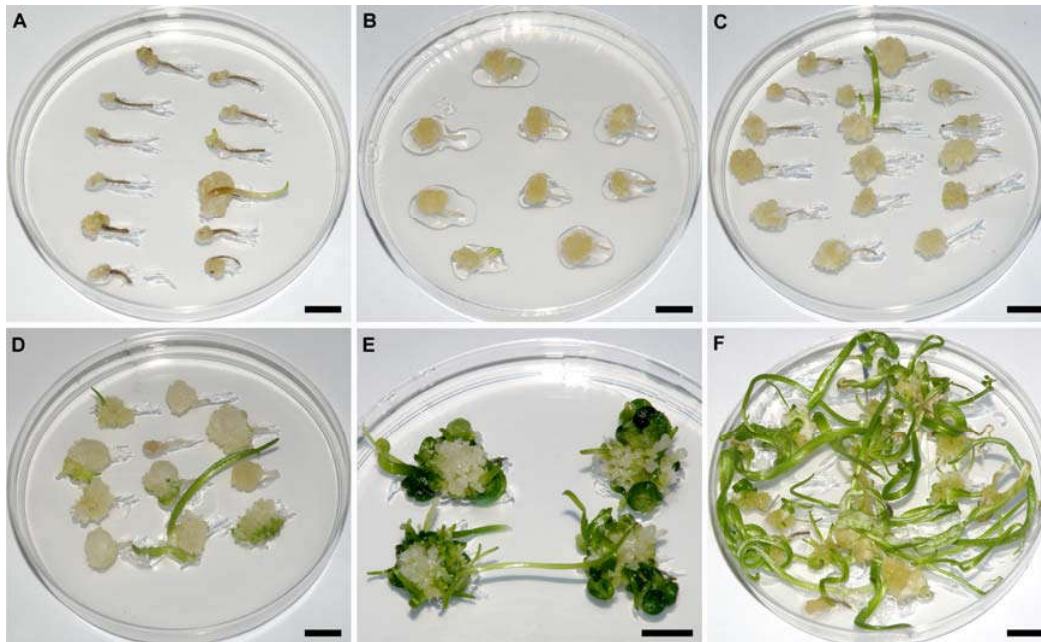


Slika 2. Regeneracija pupoljaka iz odsečaka korenova šalota linije 6. **A)** Zadebljanje apikalnog regiona korena posle nedelju dana na podlozi za indukciju kalusa sa 5 μM 2,4-D + 5 μM BA. **B)** Formiranje kalusa na istom eksplantatu posle osam nedelja na podlozi za indukciju kalusa. **C-E)** Regeneracija i umnožavanje pupoljaka posle 4, 6 i 8 nedelja na podlozi za indukciju regeneracije sa 5 μM BA. **F)** Formiranje korenovog sistema kod izolovane biljke na podlozi bez RR. Razmera: A, B 1 mm; C, D 2 mm; E, F 10 mm.

4.1.2. Regenerativni potencijal pojedinačnih linija

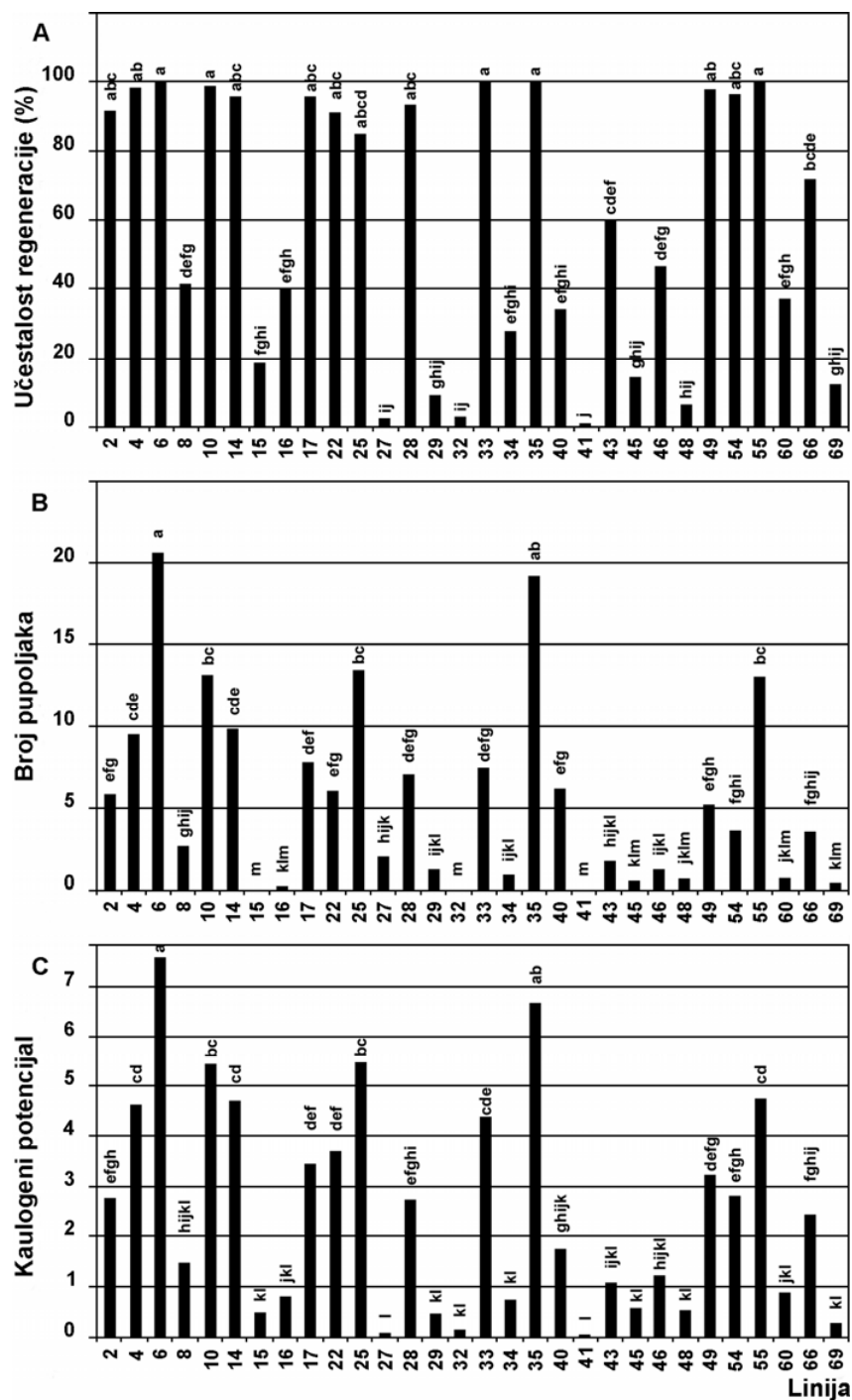
U istraživanjima u okviru ove disertacije, najpre je testiran regenerativni odgovor odsečaka korenova 70 linija šalota. Međutim, najefikasnija procedura za regeneraciju nije mogla da se utvrdi, jer je regenerativni potencijal ovih linija izrazito varirao. Među linijama su postojale upadljive razlike u vremenu pojave kalusa, kao i u boji, teksturi, obliku, prisustvu i količini eksudata oslobođenih u podlozi oko eksplantata. Zbog ovih zapažanja moralo je da se izvrši testiranje razlika u regenerativnom potencijalu između linija, koristeći proceduru dobijenu tokom preliminarnih istraživanja pre optimizacije protokola za regeneraciju. Odsecci korenova svih linija gajeni su osam nedelja na podlozi za indukciju kalusa sa 5 μM 2,4-D i 5 μM BA, zatim na podlozi za indukciju regeneracije sa 5 μM BA u trajanju od osam nedelja.

Biljke velikog broja linija šalota (od 70 ustanovljenih linija) su spontano formirale mali broj korenova, tako da je zbog nedovoljne količine biljnog materijala odabrano 30 linija sa sposobnošću formiranja dobrog korenovog sistema, sa ciljem ispitivanja uticaja genotipa na regenerativni potencijal. Uočena je visoka varijabilnost (kvalitativna i kvantitativna) među kalusima, dobijenim iz korenova različitih klijanaca (Sl. 3). Odsecci korenova nekih linija su formirali male kaluse (Sl. 3A), dok se kod drugih razvijao masivni kalus (Sl. 3B-D), sa ili bez eksudata (Sl. 3D) ili se formirao kalus koji je podsećao na glavicu karfiola (Sl. 3E). Kod najvećeg broja linija, regeneracija pupoljaka iz kalusa počinjala je na kraju četvrte nedelje na podlozi za indukciju regeneracije (Sl. 3C, D). Kalusi najosetljivijih linija su počinjali da regenerišu odmah po prebacivanju na podlogu za indukciju regeneracije, dok su jedino kalusi linije 6 regenerisali pupoljke tokom kultivacije na podlozi za indukciju kalusa (Sl. 3F). Najupečatljivije karakteristike, koje su se zadržale tokom celog eksperimenta, su uniformnost morfologije kalusa i regenerativnog potencijala eksplantata iste linije.



Slika 3. Izgled kalusa linija 18 (A), 69 (B), 55 (C), 22 (D), 12 (E) i 6 (F). Uočava se sličnost u izgledu kalusa, kao i u regenerativnom kapacitetu unutar linije. Eksplantati su kultivisani na podlozi za indukciju kalusa ($5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA) tokom osam nedelja, a zatim na podlozi za indukciju regeneracije ($5 \mu\text{M}$ BA) tokom četiri nedelje. Razmera: A-F 10 mm.

Analizom varijanse je potvrđen statistički značajan uticaj genotipa na regenerativni potencijal eksplantata (Sl. 4), kako na učestalost regeneracije pupoljaka ($P \leq 0,001$), tako i na broj pupoljaka po eksplantatu ($P \leq 0,01$). Učestalost regeneracije pupoljaka se kretala od 0,93% (kod linije 41) do 100% (kod linija 6, 33, 35 i 55) (Sl. 4A). Značajna varijabilnost je uočena i za srednju vrednost broja pupoljaka po eksplantatu, koja je varirala od vrednosti manje od jedan (kod linija 15, 16, 32, 41, 45, 48, 60 i 69) do 20,7 kod linije 6 (Sl. 4B). Genotip je statistički značajno uticao i na indeks KP ($P \leq 0,01$), koji je bio najviši za linije 6 (7,6) i 35 (6,69) (Sl. 4C). Superiornost linije 6 je takođe pokazana činjenicom da je regeneracija počela četiri nedelje ranije nego kod drugih linija.



Slika 4. Regenerativni odgovor kalusa koji je formiran na odsečcima korenova 30 nasumično izabranih linija šalota. **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Srednja vrednost broja pupoljaka po eksplantatu. **C)** Indeks KP – kaulogeni potencijal. Kalusi su indukovani iz apikalnih odsečaka korenova na podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA, pri PPF od $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u trajanju od osam nedelja. Zatim su subkultivisani na podlogu za indukciju regeneracije sa $5 \mu\text{M}$ BA i izloženi su PPF od $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u trajanju od osam nedelja. Podaci predstavljaju srednje vrednosti četiri ponavljanja sa 5-13 uzoraka po liniji ($n = 30-40$). Vrednosti obeležene istim slovima nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

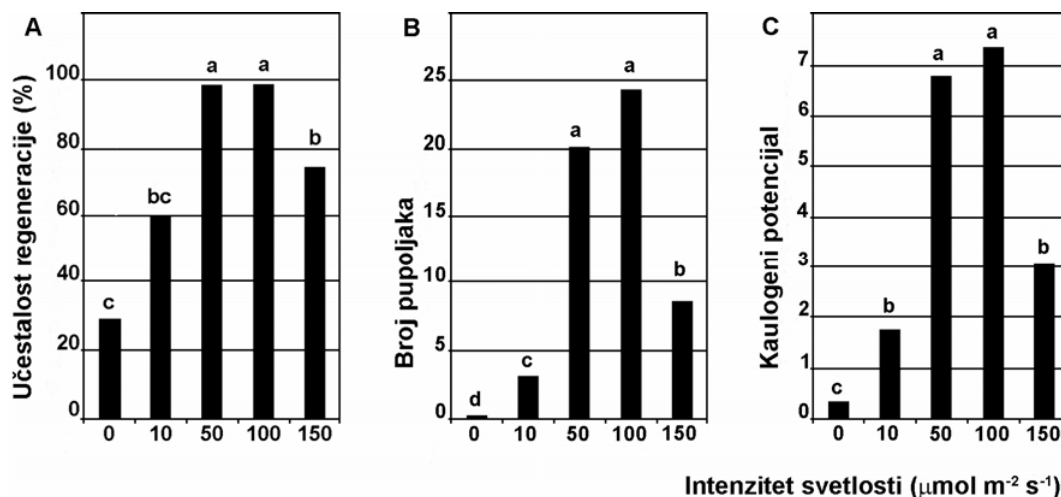
Protokol za regeneraciju pupoljaka je dodatno optimizovan korišćenjem odsečaka korenova izolovanih sa regeneranata linije 6. Ovo je bilo moguće zahvaljujući činjenici da su odsečki korenova regeneranata i korenova biljaka dobijenih razvićem apikalnog pupoljka klijanaca imali približan regenerativni potencijal.

Pored najvećeg kaulogenog potencijala, linija 6 je takođe imala najveći rizogeni potencijal, formirajući do 23 korena po biljci (prosečno $13,61 \pm 0,21$) tokom osam nedelja. Ovim je obezbeđeno dovoljno biljnog materijala za sve eksperimente. Nasuprot liniji 6, linija 35 sa visokim regenerativnim potencijalom je formirala samo $4 \pm 0,17$ korena po biljci u istom vremenskom periodu i zbog toga nije korišćena za eksperimente optimizacije procesa regeneracije.

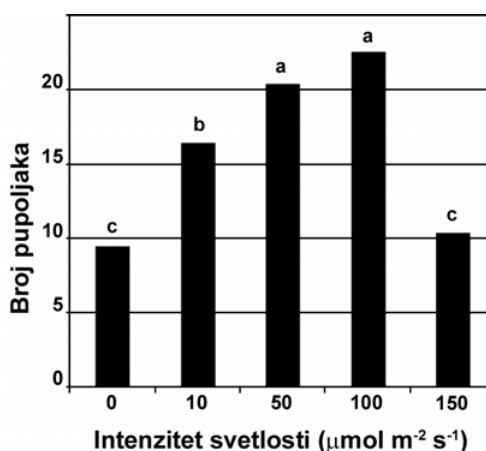
4.1.3. Uticaj inteziteta svetlosti

U prvom eksperimentu odsečki korenova linije 6 su tokom faze indukcije kalusa i indukcije regeneracije bili izloženi istom PPFD od 0, 10, 50, 100 ili $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i tada je utvrđeno da sva tri analizirana parametra koji opisuju regenerativni potencijal pokazuju najveće vrednosti pri PPFD 50 i $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Sl. 5). Intezitet svetlosti je statistički značajno uticao na učestalost regeneracije pupoljaka ($P \leq 0,001$), prosečan broj pupoljaka po eksplantatu ($P \leq 0,01$) i KP indeks ($P \leq 0,001$). Pokazano je da je regeneracija pupoljaka moguća u odsustvu svetlosti (PPFD = 0), ali sa niskom učestalošću ($29,8\% \pm 0,6$) (Sl. 4A) i sa vrlo malim brojem pupoljaka po eksplantatu ($0,26 \pm 0,02$) (Sl. 5B).

U drugom eksperimentu odsečki korenova linije 6 su tokom faze indukcije kalusa bili izloženi različitim vrednostima PPFD (0, 10, 50, 100 ili $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), da bi tokom faze indukcije regeneracije svi bili izloženi istoj vrednosti PPFD od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Učestalost regeneracije pupoljaka je dostigla 100% pri svim primenjenim vrednostima PPFD. Srednja vrednost broja pupoljaka po eksplantatu se statistički značajno razlikovala među tretmanima ($P \leq 0,001$) (Sl. 6). U poređenju sa prethodnim eksperimentom, srednja vrednost broja pupoljaka je bila povećana, ukazujući da je najefikasnija regeneracija postignuta kada su eksplantati tokom obe faze bili izloženi PPFD od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.



Slika 5. Uticaj inteziteta svetlosti na regenerativni potencijal odsečaka korenova šalota linije 6. **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Srednja vrednost broja pupoljaka po eksplantatu. **C)** Indeks KP – kaulogeni potencijal. Kalusi su indukovani na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA, u trajanju od osam nedelja. Zatim su subkultivisani na podlogu za indukciju regeneracije sa $5 \mu\text{M}$ BA, još osam nedelja. Eksplantati su tokom obe faze bili izloženi istoj vrednosti PPFD (0, 10, 50, 100 ili $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 20 uzoraka po tretmanu ($n = 60$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.



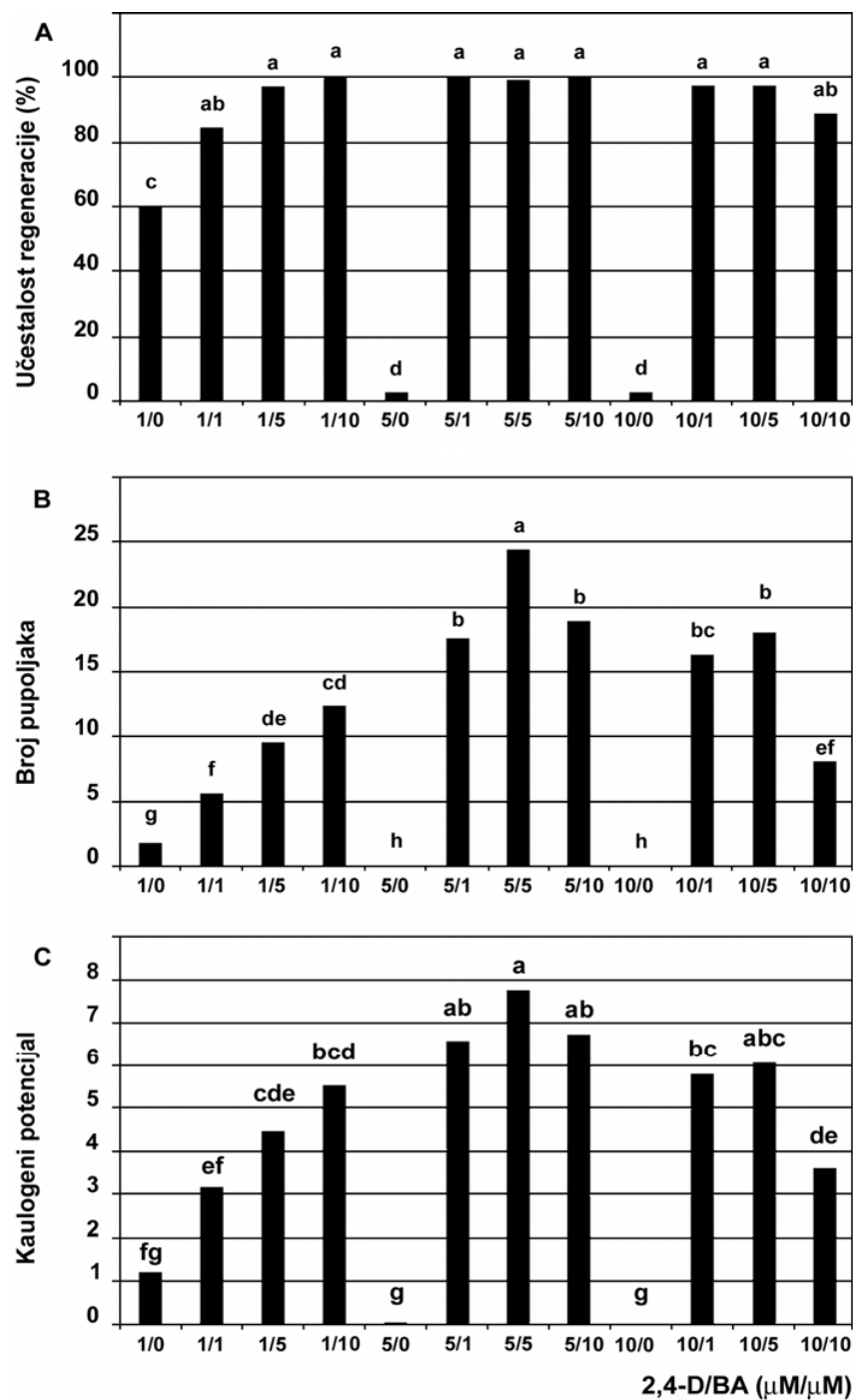
Slika 6. Uticaj inteziteta svetlosti na srednju vrednost broja pupoljaka po odsečku korena šalota linije 6. Kalusi su indukovani na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA, u trajanju od osam nedelja. Zatim su subkultivisani na podlogu za indukciju regeneracije sa $5 \mu\text{M}$ BA, još osam nedelja. Eksplantati su bili izloženi različitoj vrednosti PPFD (0, 10, 50, 100 ili $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tokom faze indukcije kalusa, zatim su svi izloženi PPFD od $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tokom faze indukcije regeneracije. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 20 uzoraka po tretmanu ($n = 60$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

4.1.4. Uticaj odnosa 2,4-D/BA

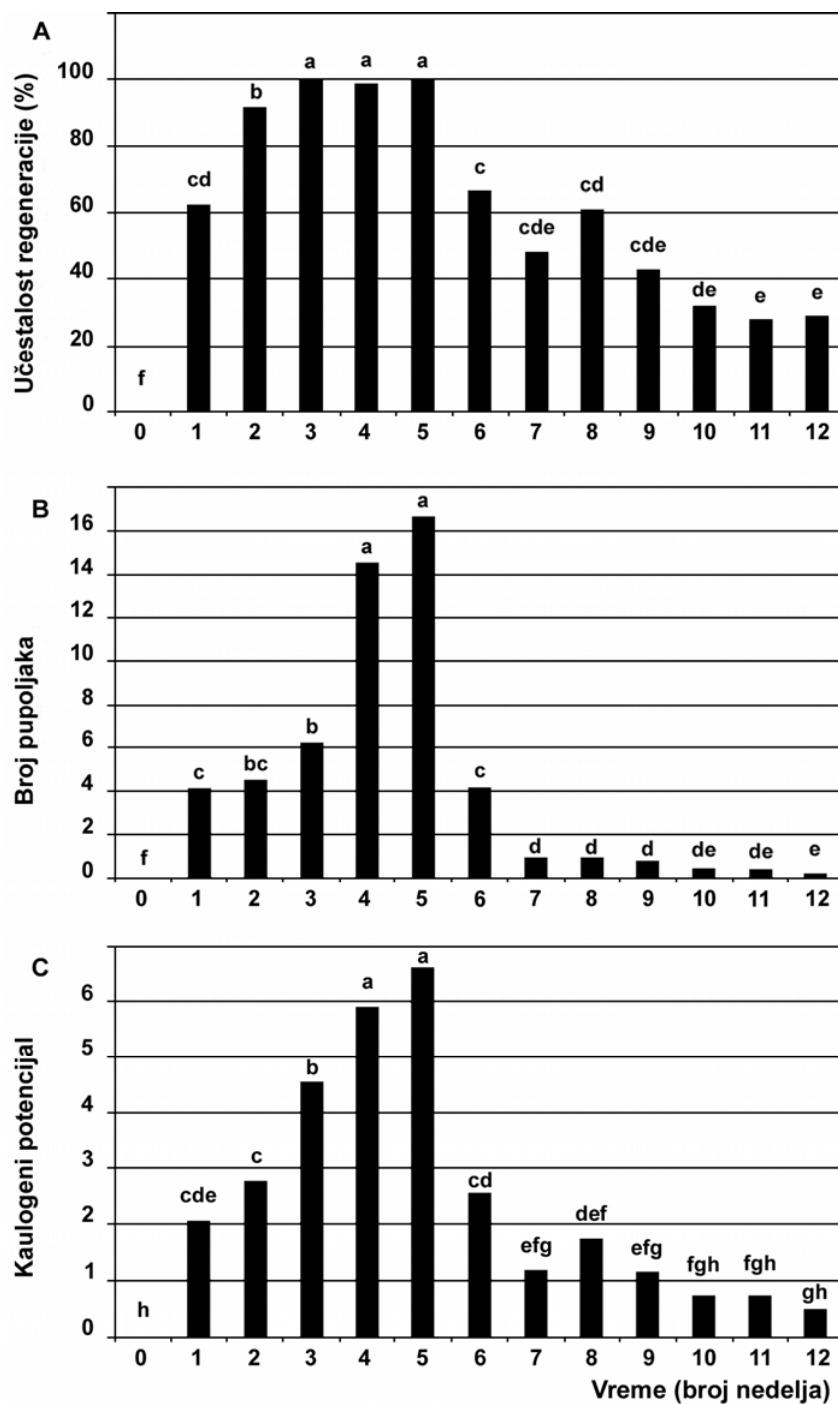
2,4-D, kao jedini prisutni RR u hranljivoj podlozi, je indukovao formiranje organogenog kalusa na odsečcima korenova šalota, ali sa izuzetno niskom efikasnošću (Sl. 7). Za efikasnu regeneraciju pupoljaka, dodatak BA je bio neophodan i tada je učestalost regeneracije dostigla skoro 100% kod eksplantata izloženih većini tretmana (Sl. 7). Analiza rezultata pomoću ANOVA je potvrdila da nivo 2,4-D u podlozi nije statistički značajno uticao na regenerativni potencijal eksplantata, dok je nivo BA ($P \leq 0,001$), kao i njegova interakcija sa 2,4-D ($P \leq 0,01$), značajno uticao na učestalost regeneracije pupoljaka. Najefikasnija regeneracija pupoljaka je postignuta kod eksplantata gajenih na podlozi koja je sadržala $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA tokom faze indukcije kalusa (Sl. 7). Nivo 2,4-D i BA, kao i njihova interakcija, su značajno uticali kako na broj pupoljaka po eksplantatu ($P \leq 0,001$ za sve), tako i na indeks KP ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$; odnosno $P \leq 0,05$). KP indeks je bio najveći za eksplantate gajene na podlozi $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA, zatim na podlogama $5 \mu\text{M}$ 2,4-D u kombinaciji sa 1 ili $10 \mu\text{M}$ BA (Sl. 7C). Tretman $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA je predstavljao optimalan odnos za indukciju kalusa i kasniju indukciju regeneracije pupoljaka.

4.1.5. Trajanje faze indukcije kalusa

Trajanje faze indukcije kalusa je značajno uticalo na učestalost regeneracije pupoljaka, broj pupoljaka po eksplantatu i KP indeks ($P \leq 0,001$; $P \leq 0,01$; odnosno $P \leq 0,001$). Gajenje eksplantata tokom jedne nedelje na podlozi za indukciju kalusa je bilo dovoljno da izazove regeneraciju pupoljaka kod približno 60% eksplantata, dok su tri nedelje tretmana bile dovoljne za regeneraciju pupoljaka skoro svih eksplantata (Sl. 8A). Međutim, najveći broj pupoljaka po eksplantatu (u proseku 16,6) je dobijen kada je faza indukcije kalusa trajala pet nedelja (Sl. 8B). Sa produžavanjem faze indukcije kalusa došlo je do naglog pada broja pupoljaka (Sl. 8B).



Slika 7. Uticaj odnosa 2,4-D/BA ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$) na regeneraciju pupoljaka iz odsečaka korenova šalota linije 6. **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Srednja vrednost broja pupoljaka po eksplantatu. **C)** Indeks KP – kaulogeni potencijal. Kalusi su indukovani na MS podlozi za indukciju kalusa sa različitim odnosom 2,4-D/BA, u trajanju od osam nedelja. Zatim su prebačeni na podlogu za indukciju regeneracije sa 5 μM BA, još osam nedelja. Eksplantati su tokom obe faze bili izloženi PPFD od 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 20 uzoraka po tretmanu ($n = 60$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.



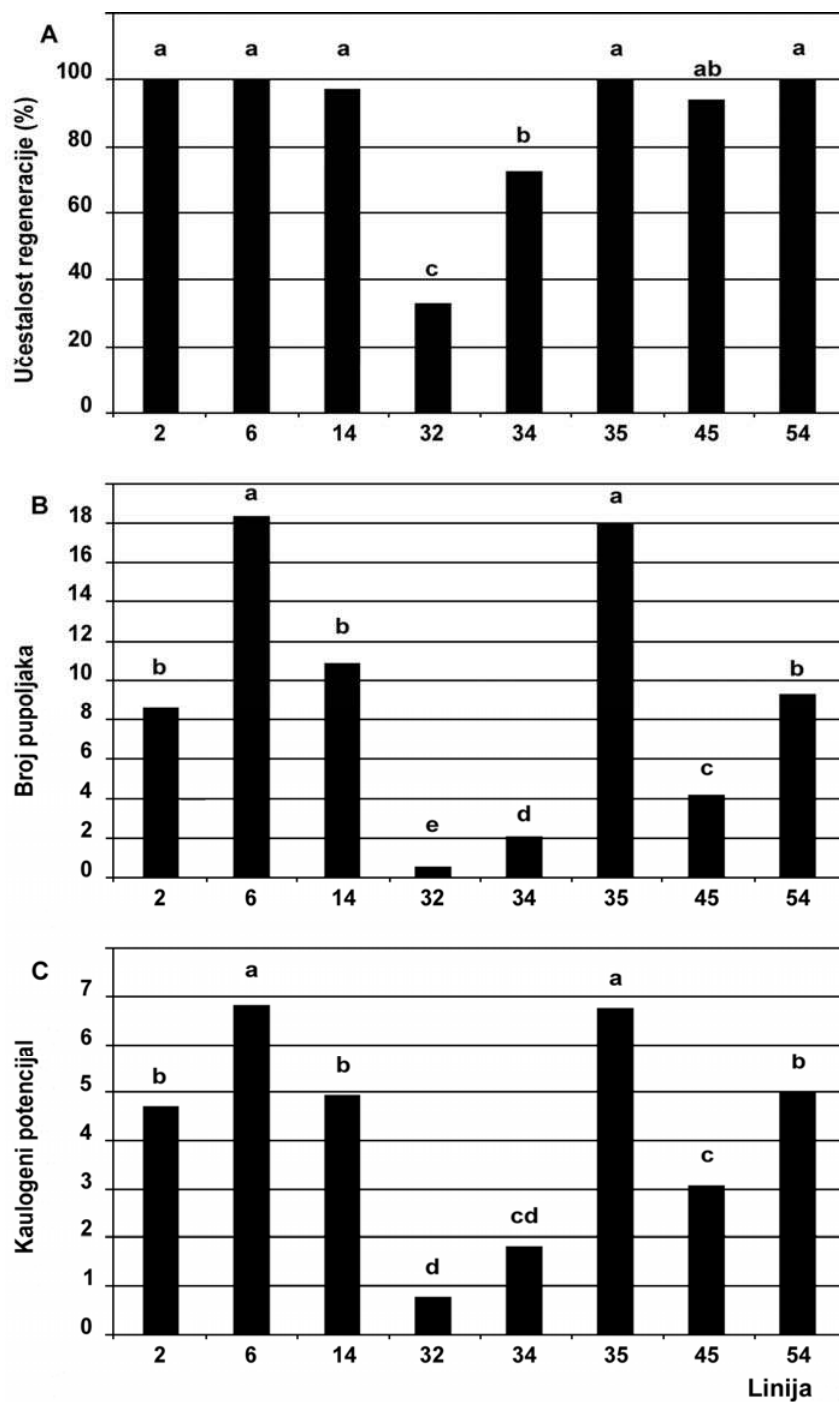
Slika 8. Uticaj trajanja faze indukcije kalusa na regeneraciju pupoljaka iz odsečaka korenova šalota linije 6 . **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Srednja vrednost broja pupoljaka po eksplantatu. **C)** Indeks KP – kaulogeni potencijal. Kalusi su indukovani na MS podlozi sa 5 μ M 2,4-D + 5 μ M BA. Ta faza je trajala 0-12 nedelja. Zatim su eksplantati subkultivisani na podlogu za indukciju regeneracije sa 5 μ M BA tokom različitog vremenskog perioda. Ukupno trajanje obe faze je 12 nedelja. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 20 uzoraka po tretmanu (n = 60). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

4.1.6. Primena optimizovanog protokola na linije sa različitim regenerativnim potencijalom

Optimizovan protokol za regeneraciju pupoljaka iz apikalnih odsečaka korenova biljaka šalota uključuje pet nedelja na podlozi za indukciju kalusa sa 5 μM 2,4-D i 5 μM BA, zatim osam nedelja na podlozi za indukciju regeneracije sa 5 μM BA, pri PPFD od 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom obe faze. Protokol je primenjen na osam linija koje su izabrane na osnovu njihovog različitog regenerativnog potencijala. Iako su razlike u učestalosti regeneracije pupoljaka ($P \leq 0,001$), srednjeg broja pupoljaka po eksplantatu ($P \leq 0,01$) i indeksa KP ($P \leq 0,001$) i dalje bile statistički značajno različite kod testiranih linija, primenom ovog protokola je uočeno povećanje regenerativnog potencijala kod svih linija (Sl. 9). Optimizovani protokol je naročito bio pogodan za linije sa slabim regenerativnim potencijalom (32, 34 i 45), čiji je KP indeks bio povećan 4,7; 2,4; odnosno 5,2 puta. Međutim, uprkos povećanju koje je postignuto, njihov regenerativni potencijal je i dalje bio 2-8 puta niži od regenerativnog potencijala linije 6 (Sl. 4, 9, 10A-C), što potvrđuje snažan uticaj genotipa na proces organogeneze.

4.1.7. Ožiljavanje i aklimatizacija biljaka

Uspešno su ožiljene sve biljke izložene tretmanima za indukciju ožiljavanja. Među tretmanima je uočena razlika srednje vrednosti broja i dužine korenova. Izdanci su se spontano ožiljavali i na podlozi bez RR (Sl. 10D), neznatno bolje na $\frac{1}{2}\text{MS}$ nego na MS podlozi u pogledu broja korenova, dok razlike između ova dva tretmana nisu bile statistički značajne što se tiče dužine korenova (Tab. 8). Koncentracija soli u MS podlozi i koncentracija IBA, kao i njihova interakcija, su značajno uticale na broj korenova po biljci ($P \leq 0,001$; $P \leq 0,001$; odnosno $P \leq 0,05$) i njihovu dužinu ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,001$; odnosno $P \leq 0,05$). Iako su biljke gajene na podlozi sa 5 μM IBA ($\frac{1}{2}\text{MS}$ i MS) formirale najveći broj korenova, IBA u većoj koncentraciji je inhibirala izduživanje korenova, pa su najduže korenove formirale biljke gajene na podlozi bez RR ili sa 1 μM IBA.

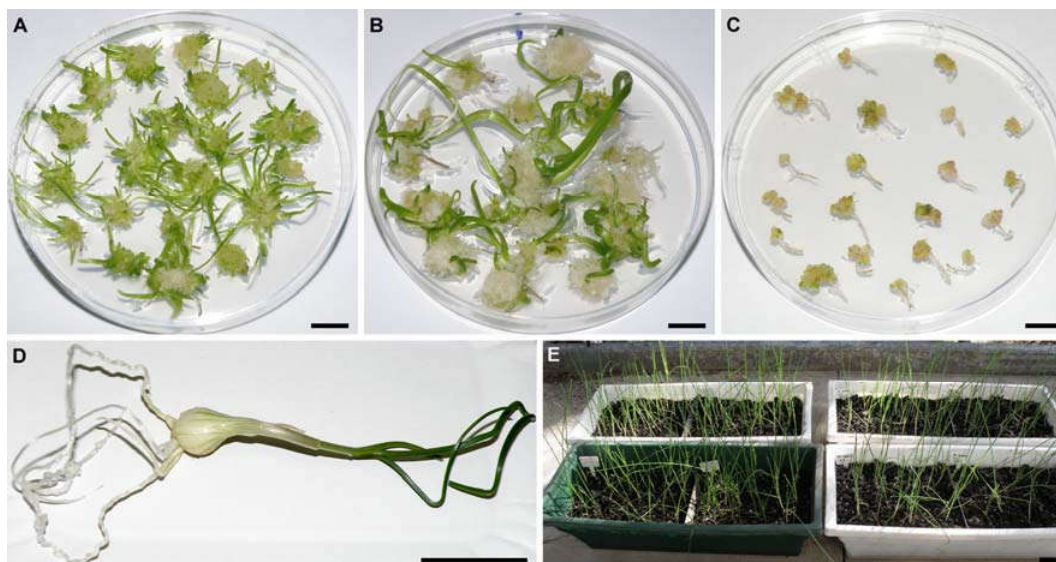


Slika 9. Primena optimizovanog protokola za regeneraciju pupoljaka iz odsečaka korenova linija šalota sa različitim regenerativnim potencijalom. **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Srednja vrednost broja pupoljaka po eksplantatu. **C)** Indeks KP - kaulogeni potencijal. Kalusi su indukovani na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA, u trajanju od pet nedelja. Zatim su subkultivisani na podlogu za indukciju regeneracije sa $5 \mu\text{M}$ BA, još osam nedelja. Eksplantati su tokom obe faze bili izloženi PPF od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 20 uzoraka po tretmanu ($n = 60$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

Tabela 8. Morfološke karakteristike korenovog sistema i stopa aklimatizacije biljaka šalota linije 6.

Mineralni rastvor	IBA (μM)	Broj korenova	Najduži koren (mm)	Stopa aklimatizacije (%)
$\frac{1}{2}$ MS	0	$3,88 \pm 0,040$ cd	$51,72 \pm 4,57$ a	$94,7 \pm 1,1$ a
	1	$4,33 \pm 0,006$ bc	$44,20 \pm 3,99$ ab	$94,7 \pm 1,1$ a
	5	$5,42 \pm 0,008$ a	$32,77 \pm 4,70$ cd	$85,8 \pm 0,6$ a
	10	$5,04 \pm 0,010$ ab	$29,67 \pm 3,84$ d	$85,8 \pm 0,6$ a
MS	0	$2,83 \pm 0,006$ e	$43,90 \pm 5,30$ abc	$90,7 \pm 0,9$ a
	1	$3,59 \pm 0,004$ cde	$46,46 \pm 4,92$ a	$94,7 \pm 1,1$ a
	5	$5,58 \pm 0,004$ a	$32,88 \pm 3,35$ bcd	$90,7 \pm 0,9$ a
	10	$3,16 \pm 0,015$ de	$8,83 \pm 1,04$ e	$80,0 \pm 0$ a

Dužina i broj korenova su određeni posle pet nedelja kultivacije na podlozi za indukciju ožiljavanja, koja je sadržala $\frac{1}{2}$ MS ili MS mineralnog rastvora i 0, 1, 5 ili 10 μM IBA. Stopa uspešno aklimatizovanih biljaka je zabeležena posle četiri nedelje gajenja u stakleniku. Pet Erlenmajera sa po šest izdanaka, su postavljeni po tretmanu ($n = 30$). Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SE (eng. *standard error* – standardna greška). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.



Slika 10. Regeneracija, ožiljavanje i aklimatizacija biljaka šalota. **A-C)** Regeneracija pupoljaka iz odsečaka korenova kod tri linije koje pokazuju **A)** visok (linija 6), **B)** umeren (linija 54) i **C)** nizak (linija 34) regenerativni potencijal. Primenjen je optimizovan protokol – pet nedelja na podlozi za indukciju kalusa ($5 \mu\text{M}$ 2,4-D i $5 \mu\text{M}$ BA) i osam nedelje na podlozi za indukciju regeneracije ($5 \mu\text{M}$ BA) pri PPF od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Kulture su fotografisane posle četiri nedelje gajenja na podlozi za indukciju regeneracije. **D)** Ožiljena biljka na podlozi bez RR. **E)** Biljke šalota posle četiri nedelje aklimatizacije na uslove staklenika. Razmera: A-C 10 mm, D,E 50 mm.

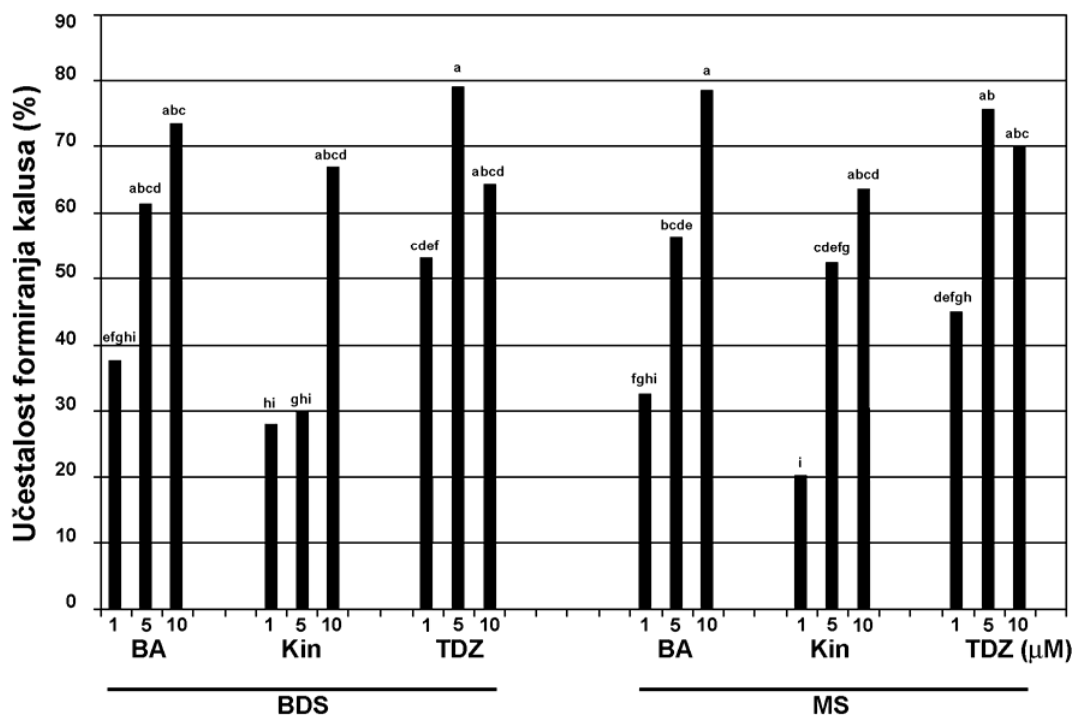
Stopa preživljavanja biljaka posle četiri nedelje aklimatizacije u stakleniku je bila visoka (80–94,7%) (Tab. 8) i nisu utvrđene statistički značajne razlike u sposobnosti aklimatizacije biljaka koje su bile podvrgnute različitim tretmanima ožiljavanja. Neznatno bolja stopa preživljavanja je postignuta kod biljaka koje su ožiljene na podlozi bez RR ili sa 1 μM IBA, na podlozi sa $\frac{1}{2}\text{MS}$ (Sl. 10E, žardinjera u donjem levom uglu).

4.2. Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova *A. schoenoprasum*

4.2.1. Indukcija kalusa

U preliminarnom istraživanju proučavan je efekat 1, 5, 10, 20 ili 40 μM 2,4-D na indukciju kalusa i regeneraciju pupoljaka ili somatskih embriona iz odsečaka korenova vlašca. Kalus je indukovano samo na apikalnim odsečcima korenova sa učestalošću od 36,7%; 73,3%; 70%; 23,3%; odnosno 20%. Međutim, posle subkultivacije eksplantata na podlogu sa 0, 1 ili 5 μM 2,4-D nije došlo do regeneracije pupoljaka ili somatskih embriona, što je ukazalo da 2,4-D nije dovoljan za indukciju morfogeneze. Zato je u daljem radu 5 μM 2,4-D kombinovan sa citokininima BA, Kin i TDZ.

Apikalni odsecci korenova vlašca su postavljeni na 18 tretmana za indukciju kalusa. Tip citokinina i njegova koncentracija su značajno uticali na učestalost formiranja kalusa ($P \leq 0,001$ oba), dok uticaj mineralnog rastvora u osnovnoj hranljivoj podlozi (MS ili BDS) nije bio statistički značajan. Najveća učestalost formiranja kalusa je postignuta na MS i BDS podlozi koja je sadržala 5 μM 2,4-D u kombinaciji sa 5 μM TDZ ili 10 μM BA (Sl. 11). Pretežno se formirao žuti kompaktni kalus (Sl. 12A), koji se kasnije transformisao u embriogeni kalus, ali je primećen i bleđi, rastresiti kalus (Sl. 12B), koji nikad nije bio embriogen. Tokom formiranja kalusa na eksplantatima je uočen eksudat (Sl. 12A, B).



Slika 11. Učestalost formiranja kalusa na apikalnim odsečcima korenova vlašca. Eksplantati su gajeni na BDS ili MS podlozi sa 5 µM 2,4-D u kombinaciji sa 1, 5 ili 10 µM BA, Kin ili TDZ u trajanju od osam nedelja. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednje vrednosti pet ponavljanja sa po 20 uzoraka (n = 100). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema Duncan testu.

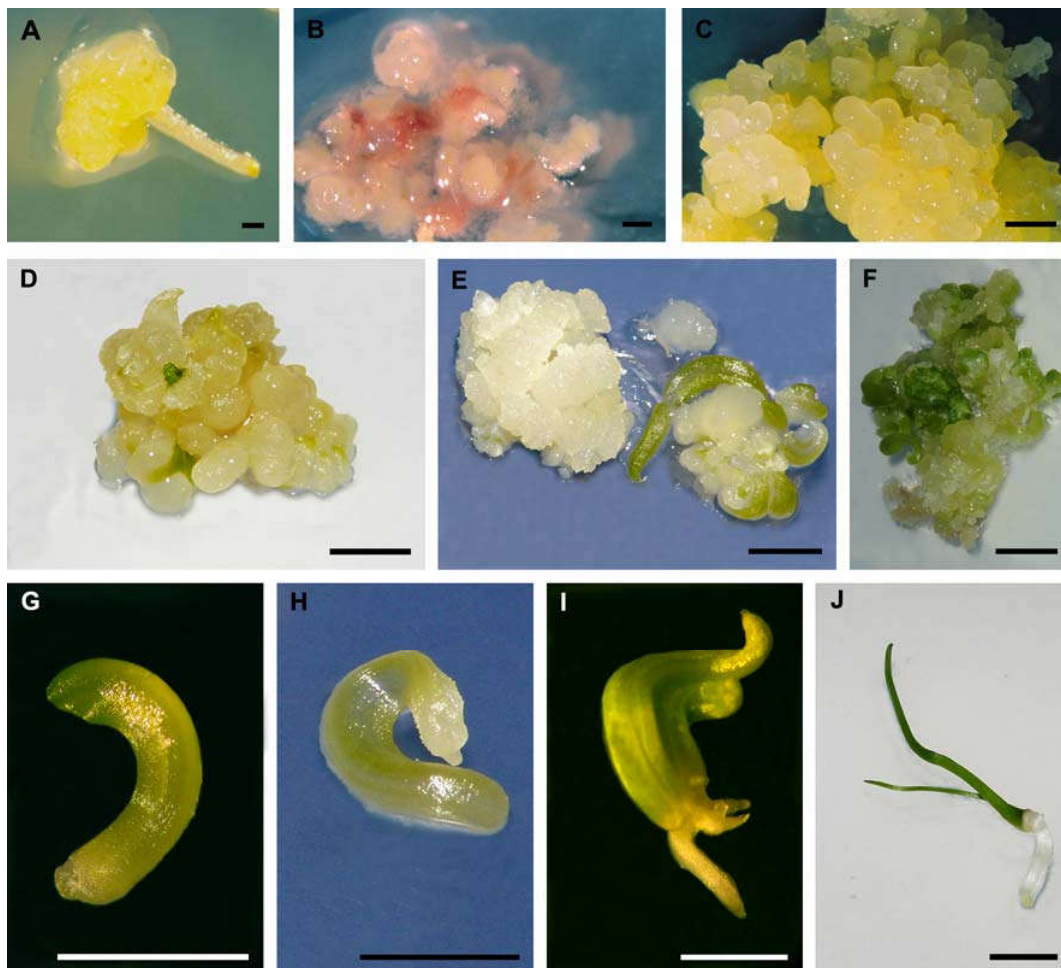
4.2.2. Indukcija somatske embriogeneze

Nakon subkultivacije kalusa na MS ili BDS podlogu, koja je sadržala 1 µM 2,4-D, kalusi su postali segmentirani i žučkasti, a već posle 7-8 nedelja su uočeni globularni somatski embrioni (Sl. 12C). Na rastresitom kalusu nikada se nisu formirali somatski embrioni ili pupoljci (Sl. 12B). Posle osam nedelja, na žutom kalusu su uočeni somatski embrioni na različitim stupnjevima razvića (Slika 12D, E). Koncentracija citokinina u podlozi za indukciju kalusa je značajno uticala na učestalost formiranja embriogenog kalusa ($P \leq 0,001$), dok tip citokinina i mineralnog rastvora u hranljivoj podlozi nisu statistički značajno uticali na ovu veličinu. Generalno, svi citokinini pri koncentraciji 10 µM su indukovali značajno veću konverziju žutog kompaktnog kalusa u embriogeni kalus u odnosu na niže koncentracije citokinina, pri čemu citokinini u koncentraciji 1 µM nisu indukovali pojavu embriogenog kalusa. Najveća učestalost formiranja embriogenog kalusa je postignuta kada je kalus indukovao na MS podlozi sa 5 µM 2,4-D i 10 µM BA, ili na BDS podlozi sa 5 µM 2,4-D i 10 µM TDZ (Sl. 13A).

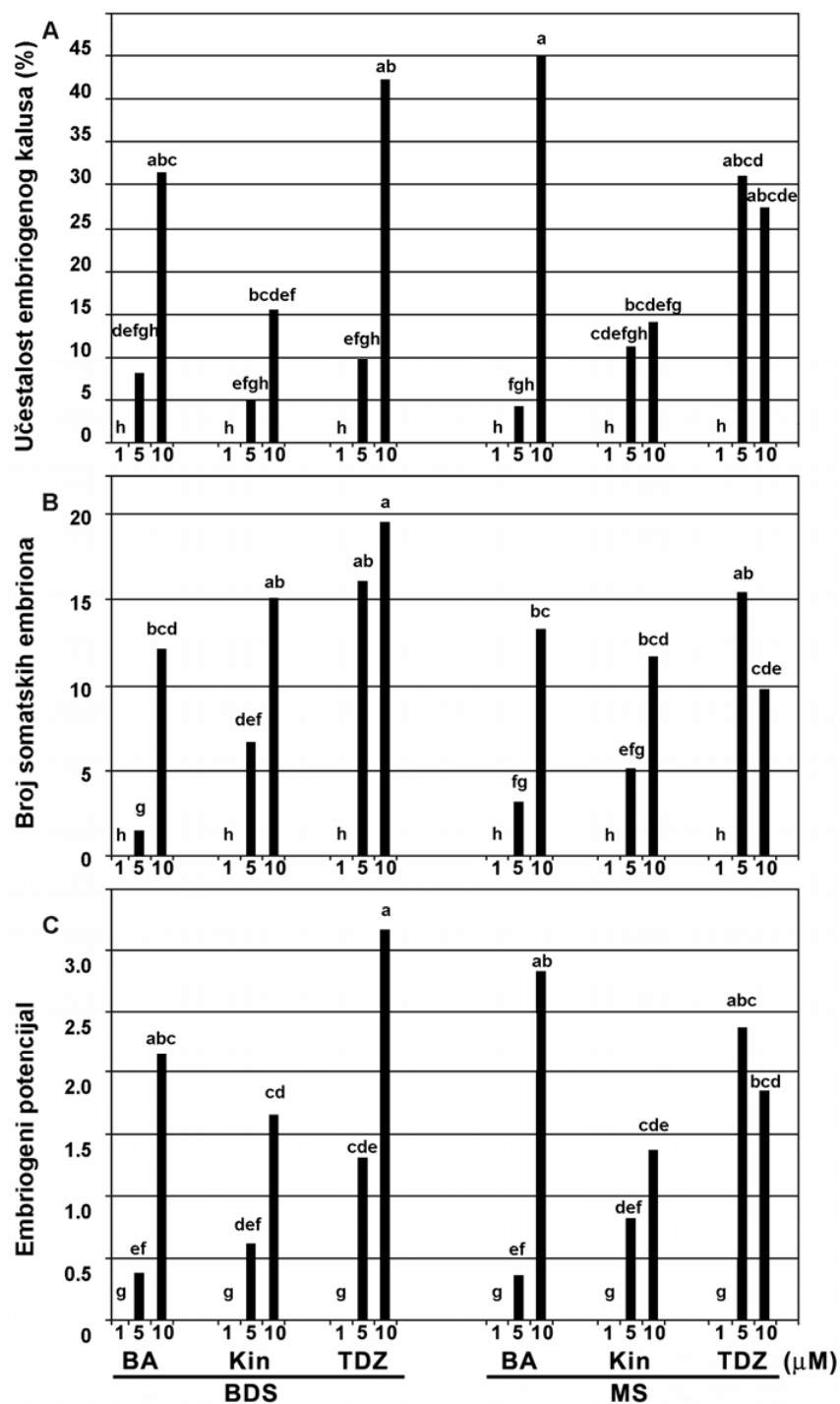
Tip i koncentracija citokinina su statistički značajno uticali i na srednju vrednost broja somatskih embriona po kalusu ($P \leq 0,001$ oba), dok tip mineralnog rastvora nije statistički značajno uticao ni na ovu veličinu. Prisustvo citokinina u koncentraciji $10 \mu\text{M}$ u podlozi za indukciju kalusa je izazvalo kasniju regeneraciju najvećeg broja somatskih embriona po eksplantatu. Najveća srednja vrednost broja somatskih embriona po regenerišućem kalusu je dobijena kada je kalus indukovan na BDS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D i $10 \mu\text{M}$ TDZ (Sl. 13B), ali ova vrednost nije bila statistički značajno različita u odnosu na tretmane u kojima je $5 \mu\text{M}$ 2,4-D bio kombinovan sa $5 \mu\text{M}$ TDZ ili $10 \mu\text{M}$ BA.

Embriogeni potencijal eksplantata je bio najveći kada je kalus indukovan na BDS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D i $10 \mu\text{M}$ TDZ ili na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D i $10 \mu\text{M}$ BA (Sl. 13C).

Pošto su ova istraživanja pokazala da tip mineralnog rastvora nije statistički značajno uticao na embriogeni potencijal eksplantata, u kasnijim istraživanjima je korišćen samo MS mineralni rastvor.



Slika 12. Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova vlašca i razviće somatskih embriona. **A)** Kompaktan žuti kalus indukovan iz odsečaka korenova posle osam nedelja kultivacije na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $10 \mu\text{M}$ BA, koji će dati embriogeni kalus. **B)** Bledi, rastresiti, neembriogeni kalus indukovan iz odsečaka korenova na BDS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $10 \mu\text{M}$ BA u trajanju od osam nedelja, koji je zatim gajen na BDS podlozi sa $1 \mu\text{M}$ 2,4-D u trajanju od sedam nedelja. **C)** Embriogeni kalus sa globularnim somatskim embrionima na površini, dobijen iz kalusa prikazanog na slici 12A posle sedam nedelja na MS podlozi sa $1 \mu\text{M}$ 2,4-D. **D)** Somatski embrioni na "notch" stadijumu razvića posle osam nedelja na MS podlozi sa $1 \mu\text{M}$ 2,4-D. **E, F)** Umnožavanje somatskih embriona na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ Kin, odnosno $2,5 \mu\text{M}$ Kin u trajanju od četiri nedelje. **G-J)** Klijanje somatskih embriona na MS podlozi sa $2,5 \mu\text{M}$ Kin. Razmera: A-C 1 mm, D-J 5 mm.

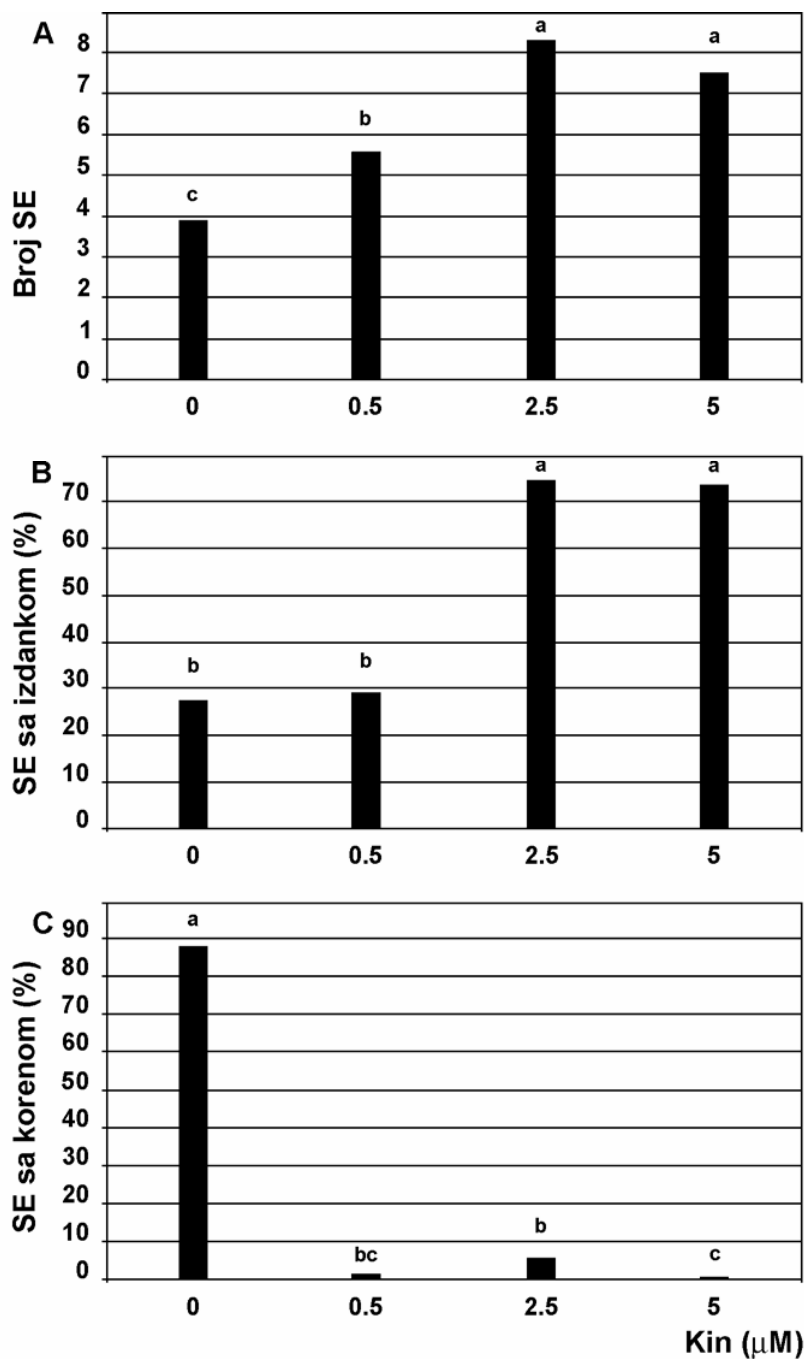


Slika 13. Indukcija kalusa i regeneracija somatskih embriona iz odsečaka korenova vlašca. **A)** Učestalost formiranja embriogenog kalusa. **B)** Broj somatskih embriona po embriogenom kalusu. **C)** Embriogeni potencijal. Odsečki korenova su gajeni na BDS ili na MS podlozi sa 5 μM 2,4-D u kombinaciji sa 1, 5 ili 10 μM BA, Kin ili TDZ u trajanju od osam nedelja. Zatim su kalusi subkultivisani na podlogu istog mineralnog sastava sa 1 μM 2,4-D u trajanju od osam nedelja. Vrednosti na grafiku su srednje vrednosti 2-8 ponavljanja sa po 10 kalusa po tretmanu (n = 20-78). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema Duncan testu.

4.2.3. Razviće i umnožavanje somatskih embriona

Embriogeni kalus kultivisan tokom jednog meseca ili duže od toga na MS podlozi sa 1 μM 2,4-D nije pokazivao značajne promene u proliferaciji tkiva i diferencijaciji somatskih embriona. Mada su na ovoj podlozi uočeni somatski embrioni na noć (eng. *notch*) stadijumu razvića (Sl. 12D), njihovo dalje razviće je bilo zaustavljeno. Noć predstavlja fazu razvića embriona monokotila sa začetkom koleoptila. Posle subkultivacije eksplantata (embriogenog kalusa sa somatskim embrionima na ranim stadijumima razvića) na podlozi bez RR, somatski embrioni na noć stadijumu razvića su se razvili u biljčice sa dobro formiranim izdancima i korenovima. Međutim, podloga bez RR nije bila pogodna za dalje razviće globularnih somatskih embriona, pa je testiran uticaj citokinina na njihovo dalje razviće. Na podlozi sa citokinima somatski embrioni su se značajno bolje razvijali i umnožavali (Sl. 12E, F) i bili su sposobni da klijaju (Sl. 12G-J). U tu svrhu BA i TDZ su pokazali slabije rezultate u odnosu na Kin, zato što su izazivali pojavu hiperhidriranosti (rezultat nije prikazan). U skladu sa tim, u daljem radu je testiran uticaj Kin, sa ciljem da se pronađe njegova optimalna koncentracija za razviće somatskih embriona u biljčice.

Koncentracija Kin je značajno uticala na broj somatskih embriona koji regenerišu iz embriogenog kalusa ($P \leq 0,001$), kao i na broj somatskih embriona sa dobro razvijenim apikalnim pupoljkom ($P \leq 0,001$) i korenom ($P \leq 0,001$). Značajno veći broj somatskih embriona je dobijen kada je embriogeni kalus kultivisan na podlozi sa Kin u odnosu na podlogu bez RR. Najveći broj somatskih embriona je dobijen na podlozi sa 2,5 μM Kin (Sl. 14A), dvostruko veći nego na podlozi bez RR.



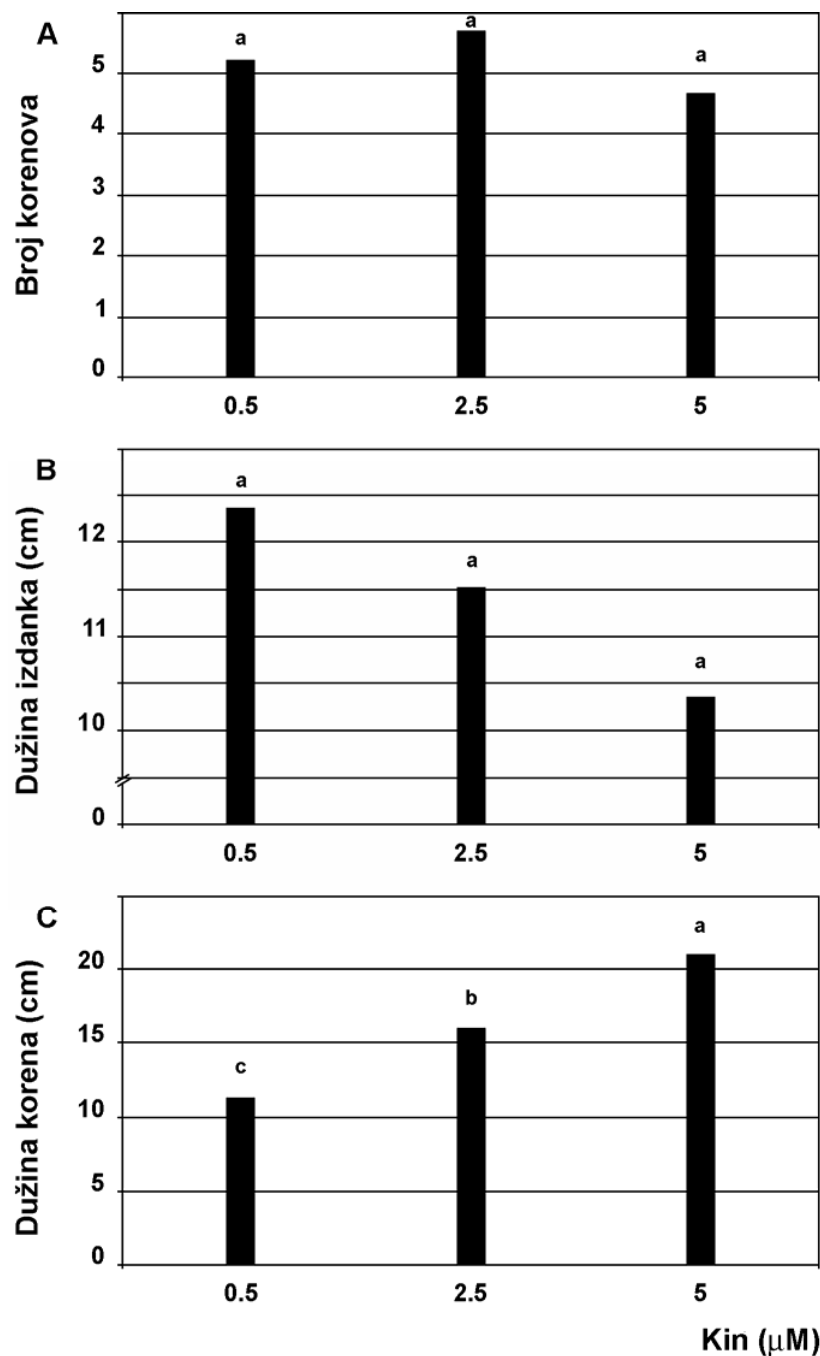
Slika 14. Umnožavanje i diferencijacija somatskih embriona (SE) vlašca. **A)** Broj somatskih embriona po embriogenom kalusu. **B)** Učestalost formiranja somatskih embriona sa apikalnim pupoljkom. **C)** Učestalost formiranja somatskih embriona sa korenom. Embriogeni kalus (5 x 5 mm) je subkultivisan sa MS ili BDS podloge koja je sadržala 1 μM 2,4-D na MS podlogu sa 0; 0,5; 2,5 ili 5 μM Kin. Broj somatskih embriona, kao i broj somatskih embriona sa razvijenim apikalnim pupoljkom i korenom su određeni posle mesec dana kultivacije. Podaci su prikazani kao srednja vrednost dva ponavljanja sa četiri uzorka, svaki sa pet poduzorka po tretmanu (n = 40). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema Duncan testu.

Među dobijenim somatskim embrionima koji su bili kultivisani na podlozi bez RR ili sa 0,5 μ M Kin, samo oko 30% je razvilo apikalni pupoljak, dok je u prisustvu 2,5–5 μ M Kin preko 70% somatskih embriona razvilo apikalni pupoljak (Sl. 14B). Somatski embrioni koji su rasli na podlozi sa Kin su imali sposobnost da formiraju korenov sistem, ali sa niskom učestalošću od najviše 5% (Sl. 14C). Razviće korenovog sistema je bilo značajno efikasnije kod somatskih embriona kultivisanih na podlozi bez RR, gde je skoro 90% somatskih embriona razvilo korenov sistem (Sl. 14C). S obzirom da je dobijen značajno veći ukupan broj somatskih embriona, kao i somatskih embriona sa razvijenim apikalnim pupoljkom, iz embriogenog kalusa kultivisanog na podlozi sa Kin nego na podlozi bez RR, u daljem radu je testiran efekat subkultivacije somatskih embriona sa podloge koja je sadržala Kin na podlogu bez RR na njihovo razviće.

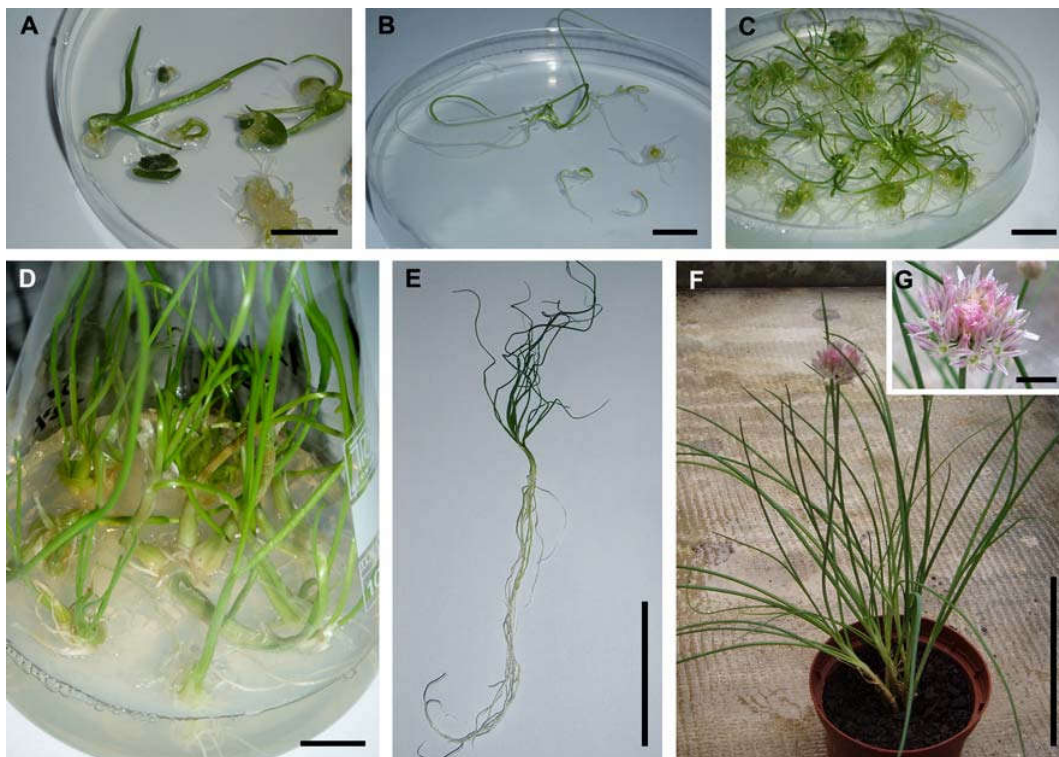
Somatski embrioni koji su kultivisani na podlozi sa Kin su dodatno kultivisani na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez RR da bi formirali dobar korenov sistem. Nivo Kin u prethodnom tretmanu nije statistički značajno uticao na srednju vrednost broja korenova (Sl. 15A) ili dužinu izdanka, ali je značajno uticao na dužinu korena ($P \leq 0,001$) (Sl. 15B, C). Ovom procedurom su somatski embrioni koju su prethodno kultivisani na podlozi koja je sadržala Kin (Sl. 16A) formirali dobar korenov sistem (Sl. 16D). Biljke koje su regenerisale iz somatskih embriona su bile zelene i zdrave, bez abnormalnosti (Sl. 16D-F).

4.2.4. Aklimatizacija biljaka

Posle mesec dana aklimatizacije stopa preživljavanja biljaka je bila $96,07 \pm 0,42\%$. Biljke su se umnožavale tokom ove faze, tako da je broj biljaka bio povećan u odnosu na broj posađenih biljaka za 38,4% nakon dva meseca, odnosno 57,1% nakon tri meseca aklimatizacije (Sl. 16F, G).



Slika 15. Ožiljavanje somatskih embriona na podlozi sa $\frac{1}{2}$ MS bez RR. **A)** Broj korenova po biljci. **B)** Dužina izdanka. **C)** Dužina korena. Somatski embrioni koji su kultivisani na MS podlozi sa 0,5; 2,5 i 5 μM Kin su subkultivisani na $\frac{1}{2}$ MS podlogu bez RR u trajanju od četiri nedelje. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 30 eksplantata po tretmanu. Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema Duncan testu.



Slika 16. Razviće somatskih embriona i aklimatizacija biljaka vlašca. **A)** Razviće somatskih embriona na MS podlozi sa 5 μM Kin. **B,C)** Klijanje i umnožavanje somatskih embriona na MS podlozi bez RR. **D)** Biljke koje su se razvile iz somatskih embriona su ožiljene na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez RR. **E)** Ožiljena biljka na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez RR, prethodno gajena na MS podlozi sa 5 μM Kin. **F)** Ista biljka aklimatizovana u stakleniku, umnožena i procvetala. **G)** Cvast, detalj sa slike F. Razmera: A-C 1 cm, D-F 10 cm, G 1 cm.

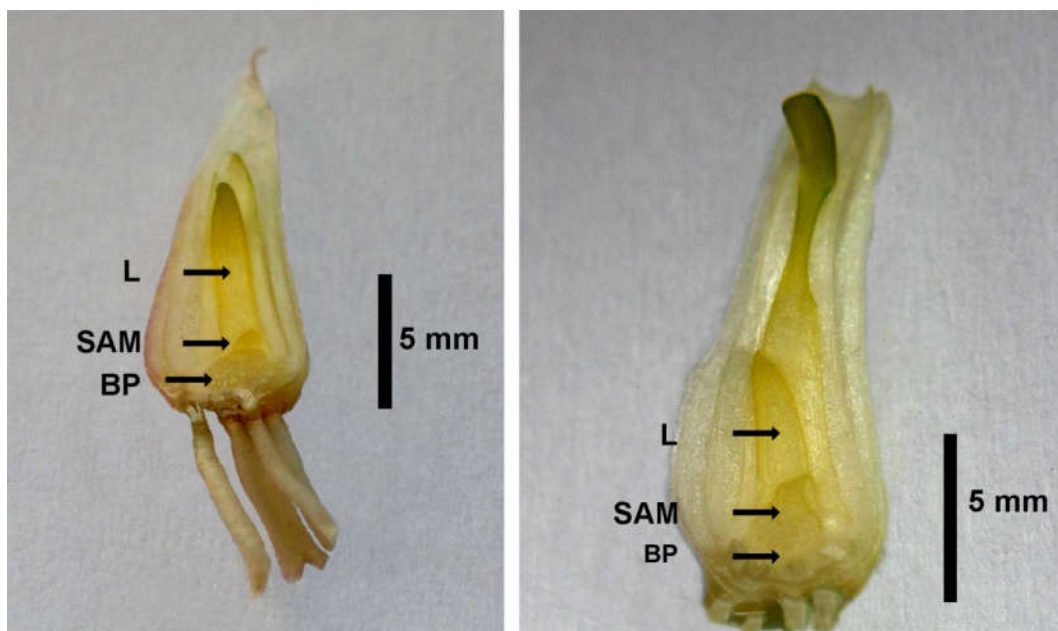
4.3. Indukcija kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka

A. schoenoprasum

Kod vlašca je bilo teško precizno odrediti mesto odakle počinje bazalna ploča, čak i pomoću stereo mikroskopa, pošto bazalna ploča nije sasvim ravna i njene granice nisu jasne, zbog mnogobrojnih korenova koji iz nje izbijaju (Sl. 17). Zbog toga je SAM najčešće pripadao prvom, ali ponekad i drugom bazalnom odsečku.

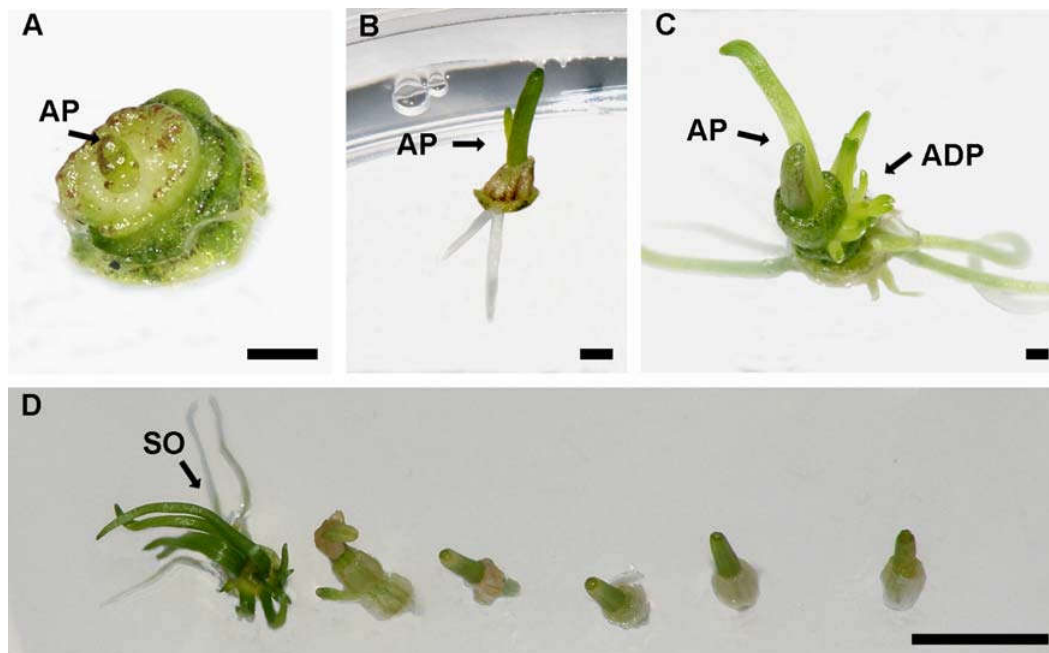
Bazalni odsečki biljaka *A. schoenoprasum* su se uvećali tokom tretmana citokininima, ali formiranje kalusa nije zapaženo ni na jednom od 18 testiranih tretmana (1, 5 i 10 μM ZEA, Kin, BA, *mT*, CPPU ili TDZ) (Sl. 18A). Na podlozi bez RR SAM se razvio i formirao izdanak, dok spontano formiranje adventivnih pupoljaka nije uočeno (Sl. 18B). Adventivni pupoljci su se formirali samo u prisustvu citokinina (Sl. 18C). Odsečki biljaka koji su sadržali SAM su bili jedini eksplantati koji su regenerisali adventivne pupoljke (Sl. 18D). Zbog toga su samo odsečki koji su sadržali SAM

uzimani u obzir pri statističkoj obradi rezultata. Ostali odsecci biljke, koji su sadržali samo fragmente listova, su se izduživali i retko formirali kalus (Sl. 18D).

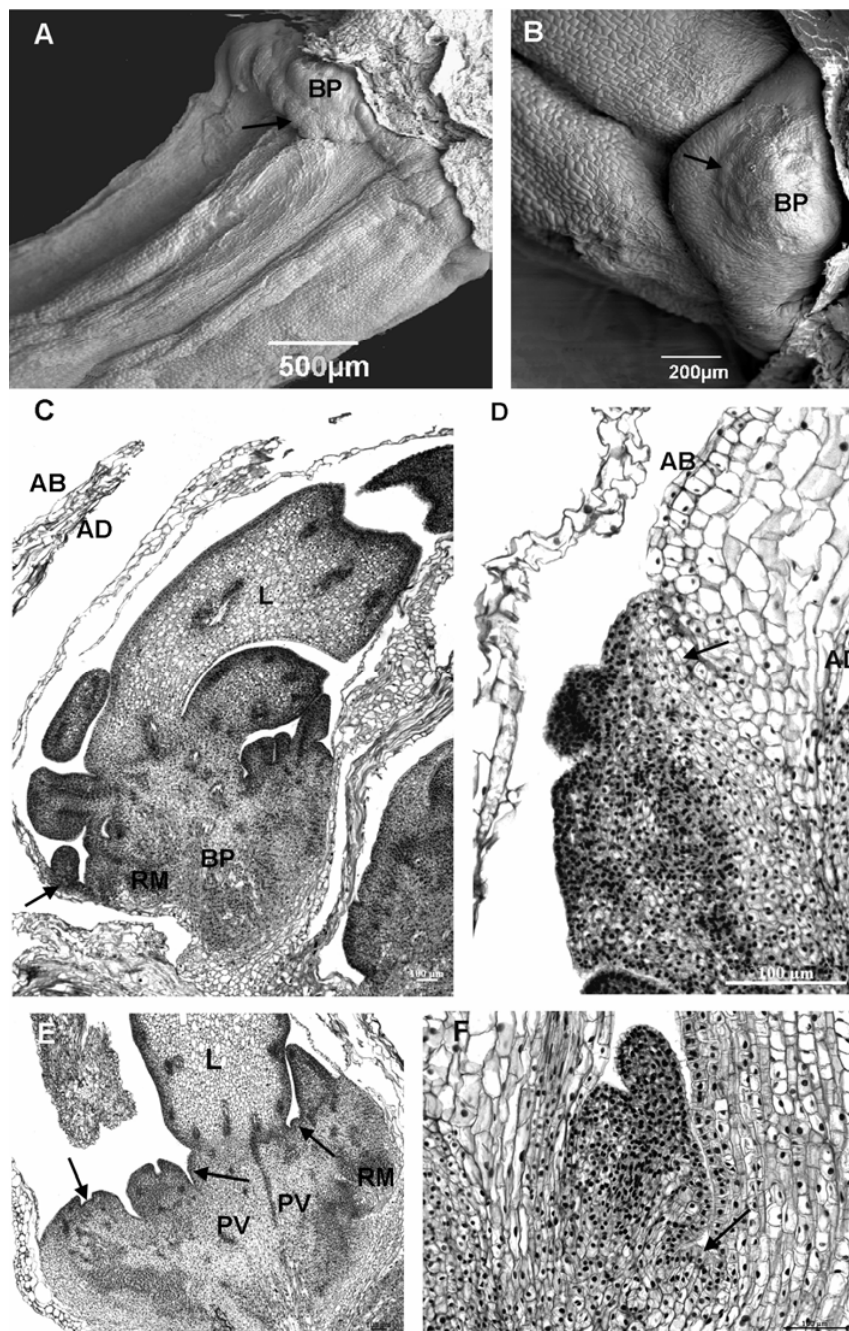


Slika 17. Uzdužni presek bazalnog dela donor biljaka vlašca – eksplantata koji su korišćeni za eksperiment. BP – bazalna ploča, SAM – apikalni meristem izdanka, L – list.

Prvi pupoljci su uočeni pomoću stereo mikroskopa već petog dana gajenja na MS podlozi sa 10 μ M TDZ, a golim okom su uočeni 14. dana kultivacije. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je uočeno prisustvo zadebljanja usled proliferacije tkiva bazalne ploče u bazalnom regionu listova (Sl. 19A, B). Histološkom analizom je utvrđeno prisustvo adventivnih pupoljaka (Sl. 19C, E). Bazalnu ploču su uglavnom činile meristemske ćelije i organizovani meristemoidi. Uvećanju bazalne ploče su doprinele ćelije nastale periklinom deobom ćelija baze lista (Sl. 19D). Adventivni pupoljci su uglavnom regenerisali iz bazalnih delova listova, sa adaksijalne i abaksijalne strane lista, kao i iz meristemoida iz površinskih slojeva bazalne ploče (Sl. 19C-E). Aksilarni pupoljci su bili retki i uočeni su samo u pazusima listova u blizini SAM (Sl. 19F).



Slika 18. Regeneracija pupoljaka iz bazalnog odsečka biljke vlašca. **A)** Bazalni odsečak biljke posle sedam dana na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ BA. **B)** Biljčica razvijena iz bazalnog odsečka biljke kultivisanog na MS podlozi bez RR. **C)** Apikalni pupoljak i adventivni pupoljci, koji su se razvili nakon četiri nedelje kultivacije bazalnog odsečka na MS podlozi sa $5 \mu\text{M}$ BA. **D)** Bazalni odsečak biljke, koji sadrži SAM, jedini regeneriše pupoljke posle četiri nedelje kultivacije na MS podlozi sa citokininom ($10 \mu\text{M}$ CPPU). AP – apikalni pupoljak; ADP – adventivni pupoljci; SO – odsečak koji sadrži SAM. Razmera: A-C 1 mm, D 10 mm.

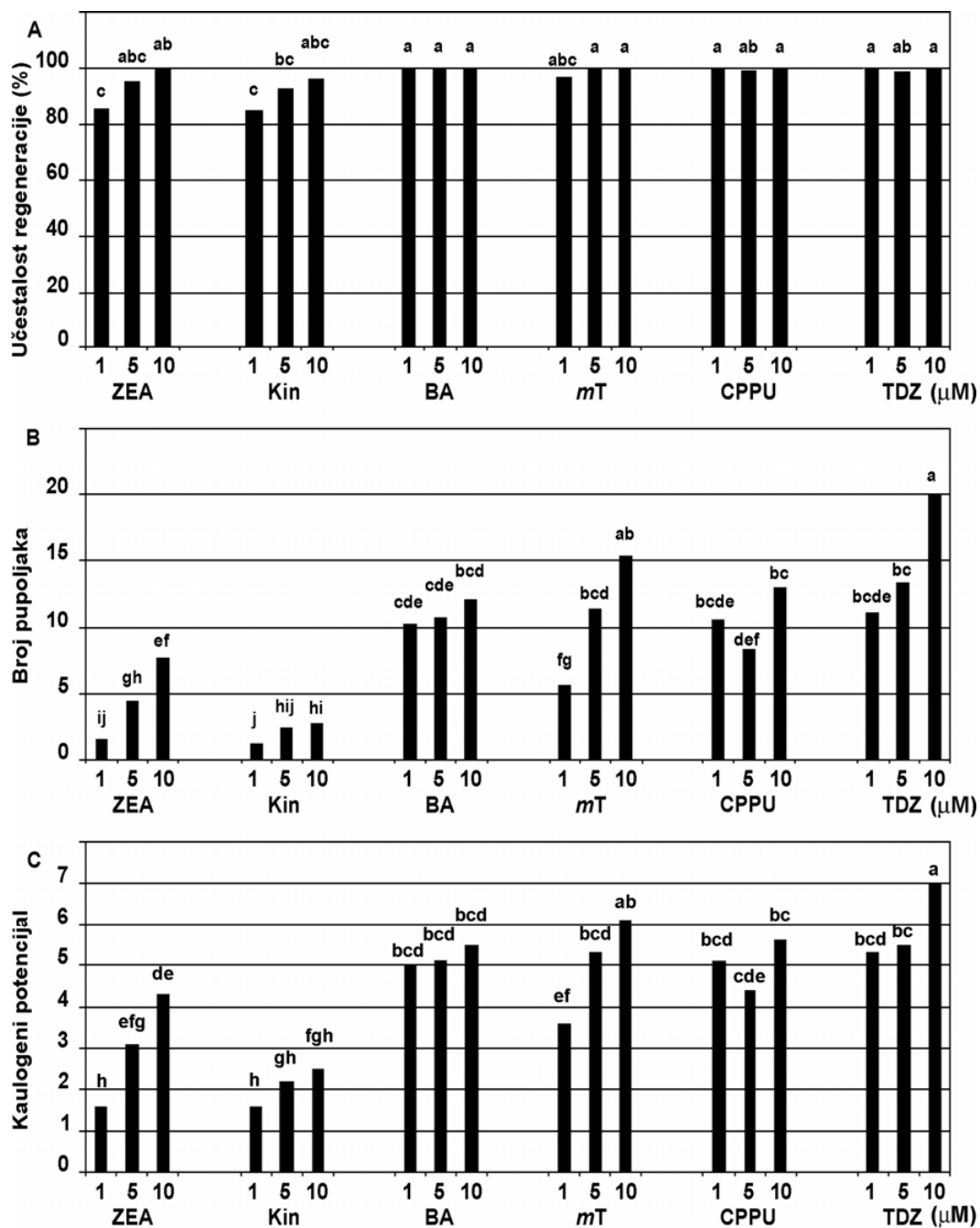


Slika 19. Regeneracija pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca, kultivisanih na MS podlozi sa $10 \mu\text{M}$ TDZ. **A-B)** Skenirajuće elektronske mikrografije eksplantata posle 14 dana kultivacije. Uočava se proliferacija tkiva bazalne ploče u bazi listova i primordije adventivnih pupoljaka oko tkiva koje proliferiše (↑). **C-F)** Mikrografije dobijene svetlosnom mikroskopijom uzdužnih preseka eksplantata posle 22 dana kultivacije. **C)** Adventivni pupoljci u bazi lista i primordije adventivnih pupoljaka koji se razvijaju iz listova (↑). **D)** Perikline deobe ćelija (↑) u bazi abaksijalne strane lista. **E)** Adventivni pupoljci (↑) na različitim stupnjevima razvića. Uočava se primordija pupoljka koji se razvija iz baze lista (↑) i meristem korena u unutrašnjem regionu stabla. **F)** Apikalni meristem izdanka sa primordijama listova oko apikalnog meristema. Uočava se aksilarni pupoljak koji se razvija iz pazuha mladog lista (↑). AB - abaksijalna strana lista; AD - adaksijalna strana lista; BP - bazalna ploča; L - list; PV - provaskularni elementi; RM - meristemi korena.

Tip citokinina je uticao na učestalost regeneracije pupoljaka ($P \leq 0,001$), dok koncentracija citokinina nije statistički značajno uticala na ovu veličinu. Zapravo, svi citokinini su bili efikasni u indukciji pupoljaka (Sl. 20A). Jedino su eksplantati kultivisani na podlozi sa $1 \mu\text{M}$ Kin ili $1 \mu\text{M}$ ZEA regenerisali pupoljke sa nižom učestalošću od 85,1 i 85,7% (Sl. 20A).

Tip i koncentracija citokinina, kao i njihova interakcija, su značajno uticali i na broj pupoljaka po eksplantatu, koji je rastao sa povećanjem koncentracije citokinina, i bio je najveći kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa $10 \mu\text{M}$ TDZ (20,0), mada ova vrednost nije bila statistički značajno različita od broja pupoljaka dobijenih iz eksplantata kultivisanih na podlozi sa $10 \mu\text{M}$ *mT* (15,4) (Sl. 20B). Najmanji broj pupoljaka je dobijen na eksplantatima kultivisanim na podlozi sa Kin (1,2 do 2,8), zatim eksplantatima kultivisanim na podlozi sa ZEA (1,6 do 7,7). BA i CPPU su imali sličan efekat na kaulogenezu (10,2 do 12,1; odnosno 8,3 do 13 pupoljaka po eksplantatu) (Sl. 20B).

Tip citokinina ($P \leq 0,001$) i koncentracija ($P \leq 0,01$) su značajno uticali na KP indeks, dok njihova interakcija nije značajno uticala na ovu veličinu. KP indeks je imao najveće vrednosti kod eksplantata kultivisanih na podlogama sa $10 \mu\text{M}$ TDZ (7,0) ili $10 \mu\text{M}$ *mT* (6,1), a najmanje kod eksplantata kultivisanih na podlogama sa $1 \mu\text{M}$ Kin ili $1 \mu\text{M}$ ZEA (1,6 na obe podloge) (Sl. 20C).

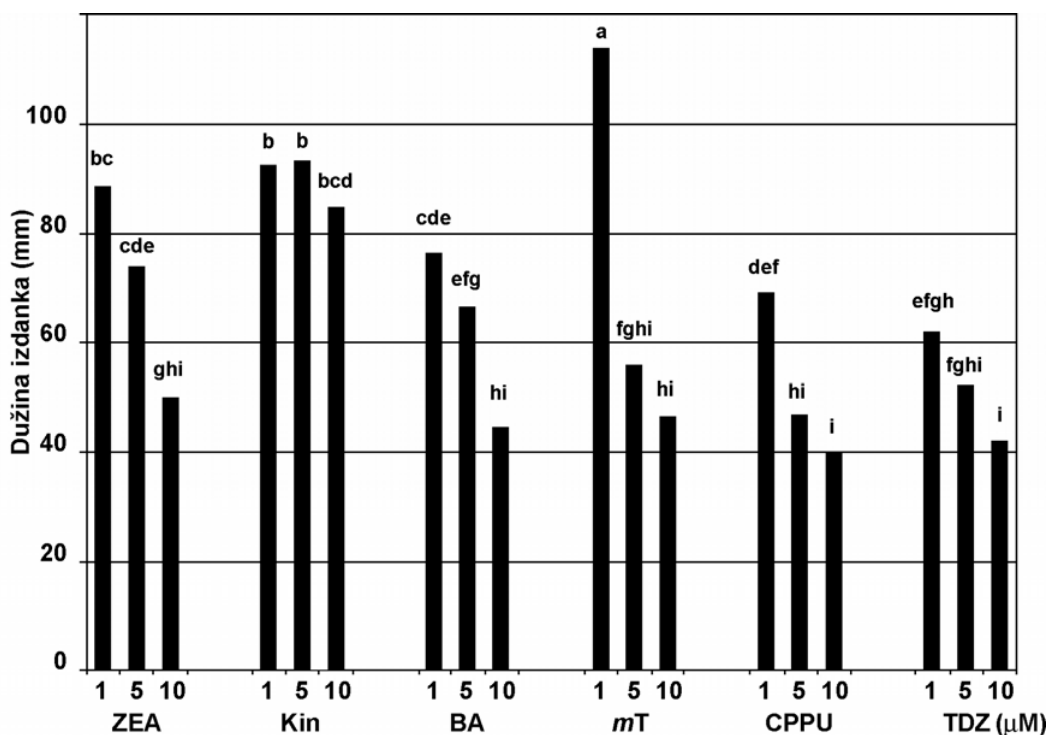


Slika 20. Uticaj tipa i koncentracije citokinina na regeneraciju pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca. **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Broj pupoljaka. **C)** Indeks kaulogeni potencijal. Bazalni odsečki biljaka su kultivisani na MS podlozi sa 1, 5 ili 10 μ M ZEA, Kin, BA, *mT*, CPPU ili TDZ u trajanju od osam nedelja. Podaci su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja sa 12 uzoraka po tretmanu ($n = 36$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

4.3.1. Uticaj tipa citokinina na rasteenje biljaka

Tokom osam nedelja kultivacije iz pupoljaka su se razvile biljke, koje su formirale busenove karakteristične za vlašac. Tip i koncentracija citokinina su značajno uticali na sve parametre rasteenja (dužinu najdužeg izdanka i korena, učestalost formiranja korenova i broj korenova po eksplantatu), dok je njihova interakcija statistički značajno uticala na sve parametre ($P \leq 0,001$) izuzev na dužinu korena.

Dužina najdužeg izdanka je opadala sa povećanjem koncentracije kod svih ispitivanih citokinina i to smanjenje je bilo statistički značajno za sve citokinine izuzev za Kin. Dužina izdanka biljaka koje su se razvile iz eksplantata kultivisanih na podlozi sa 1, 5 ili 10 μM Kin je u proseku bila 92,7; 93,2; odnosno 84,7 mm (Sl. 21). Najduži izdanak su formirale biljke dobijene iz eksplantata kultivisanih na podlozi sa 1 μM *mT* (113,7 mm) (Sl. 21). Najkraće izdanke su formirale biljke dobijene iz eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM CPPU (39,6 mm) ili 10 μM TDZ (42 mm) (Sl. 21).

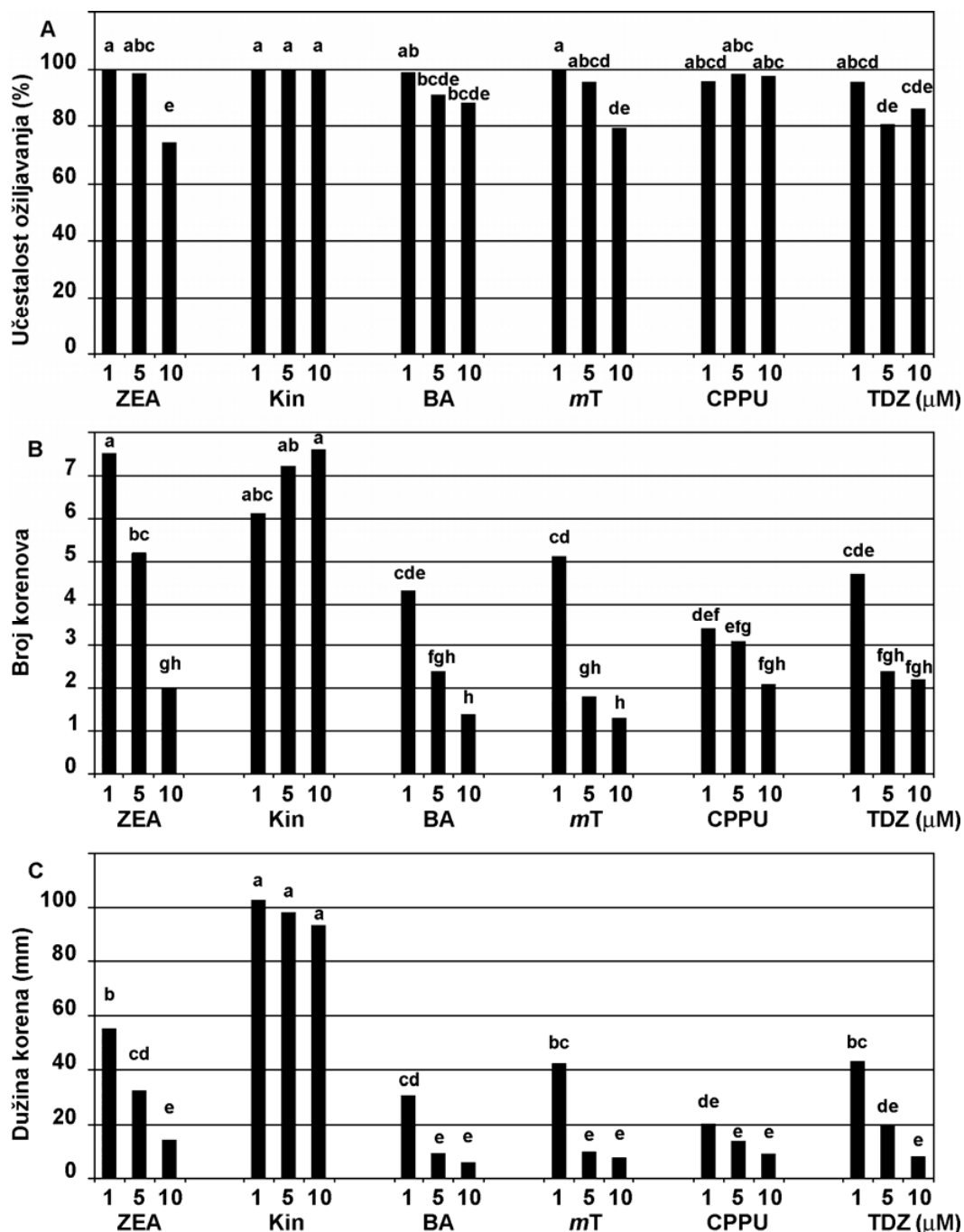


Slika 21. Uticaj tipa i koncentracije citokinina na dužinu izdanaka regeneranata vlašca. Bazalni odsecci biljaka vlašca su kultivisani na MS podlozi sa 1, 5 ili 10 μM ZEA, Kin, BA, *mT*, CPPU ili TDZ tokom osam nedelja. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 12 uzoraka po tretmanu ($n = 36$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

Tip i koncentracija citokinina, kao i njihova interakcija su značajno uticali na učestalost ožiljavanja biljaka. Najbolji rezultati su dobijeni kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa Kin (Sl. 22), gde su svi izdanci bili ožiljeni na podlogama sa različitim koncentracijama Kin. Ostali citokinini su takođe bili efikasni u indukciji ožiljavanja (Sl. 22A). Učestalost ožiljavanja je opadala sa povećanjem koncentracije citokinina. Generalno su postignute visoke učestalosti ožiljavanja (80–100%). Najniža učestalost ožiljavanja je postignuta kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM ZEA (74,2%) ili sa 10 μM *mT* (79,2%) (Sl. 22A).

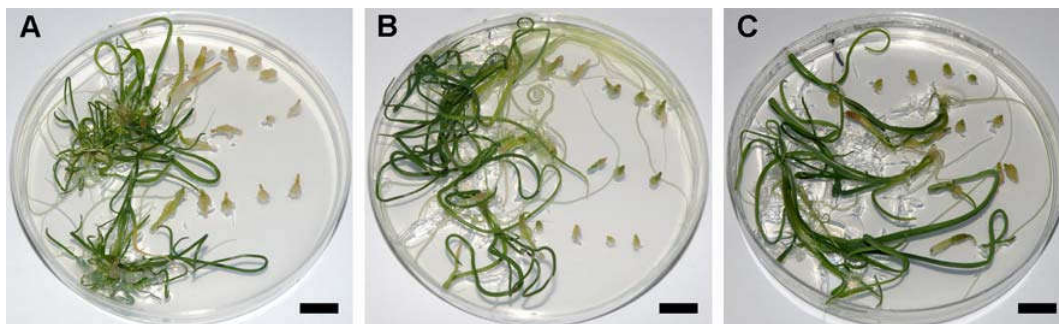
Broj korenova je takođe opadao sa povećanjem koncentracije svih citokinina, izuzev Kin (Sl. 22B). Kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa Kin srednji broj korenova se kretao od 6,1 kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 1 μM Kin do 7,6 kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM Kin, mada razlike nisu bile statistički značajno različite. Najveći broj korenova po busenu biljaka je dobijen kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM Kin (7,6), zatim sledi 1 μM ZEA (7,5), dok je najmanji broj dobijen kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM *mT* (1,3) ili 10 μM BA (1,4).

Dužina najdužeg korena je takođe opadala sa koncentracijom citokinina, i taj pad je bio statistički značajan kod svih eksplantata, osim onih kultivisanih na podlozi sa Kin. Dužina korenova se kretala u rasponu od 93,3 mm kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM Kin do 102,5 mm kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 1 μM Kin (Sl. 22C). Ostali citokinini su inhibirali izduživanje korena, tako da su najduži korenovi dobijeni kod biljaka koje su regenerisale iz eksplantata kultivisanih na podlozi sa 1 μM citokininom (od 20,1 mm na podlozi sa 1 μM CPPU do 54,9 mm na podlozi sa 1 μM ZEA) i najkraći kod eksplantata kultivisanih na podlozi sa 10 μM citokininom (od 6,1 mm na podlozi sa 10 μM BA do 14,2 mm na podlozi sa 10 μM ZEA).



Slika 22. Uticaj tipa i koncentracije citokinina na ožiljavanje regeneranata dobijenih iz bazalnog odsečka biljaka vlašca. **A)** Učestalost ožiljavanja (%). **B)** Broj korenova po busenu. **C)** Dužina najdužeg korena (mm). Bazalni odsečki biljaka vlašca su kultivisani na MS podlozi sa 1, 5 ili 10 μM ZEA, Kin, BA, mT, CPPU ili TDZ tokom osam nedelja. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 12 uzoraka po tretmanu (n = 36). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

Prethodni eksperiment je pokazao da su najveći regenerativni potencijal imali eksplantati kultivisani na podlozi sa 10 μM TDZ (Sl. 23A), a regenerisane biljake su formirale najbolji korenov sistem kad su eksplantati kultivisani na podlozi sa 5 μM Kin (Sl. 23B) i najduži izdanak kad su eksplantati kultivisani na podlozi sa 1 μM *mT* (Sl. 23C).

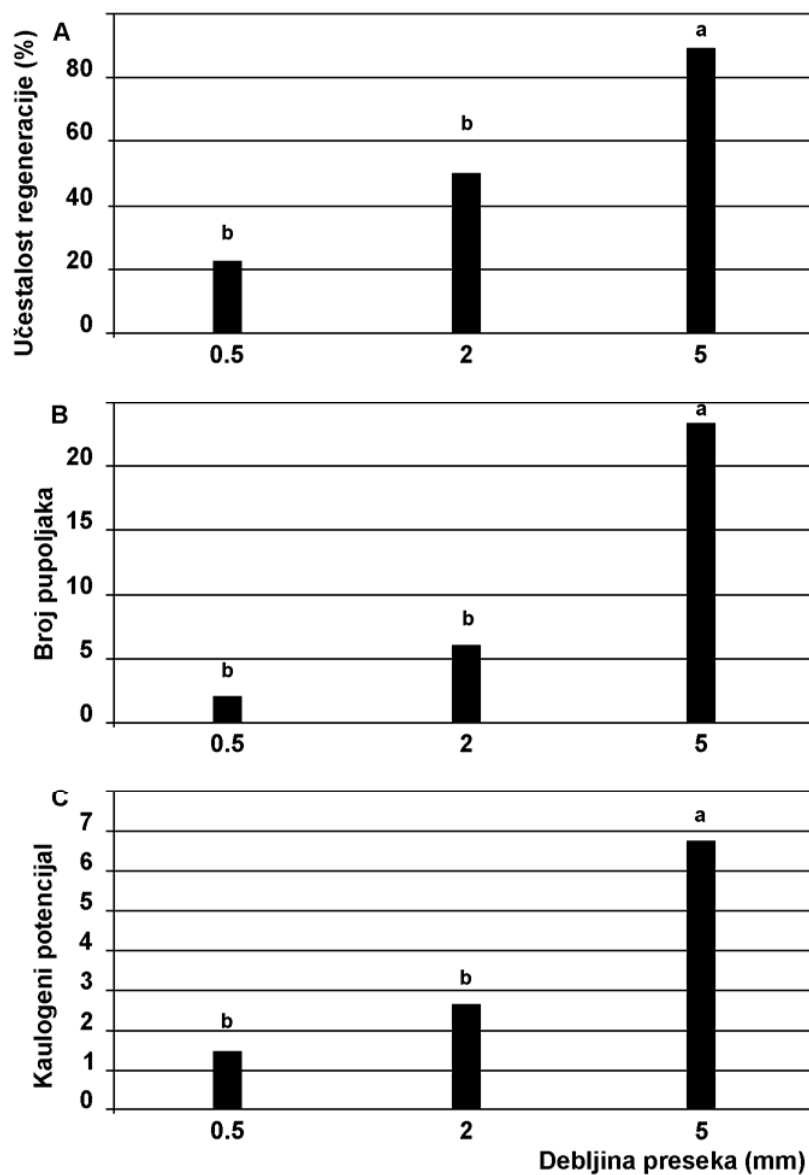


Slika 23. Regeneracija adventivnih pupoljaka iz bazalnog odsečka biljaka vlašca i rasteње regeneranata. Eksplantati su gajeni osam nedelja na MS podlozi sa **A)** 10 μM TDZ, **B)** 5 μM KIN i **C)** 1 μM *mT*. Razmera: A-C 10 mm.

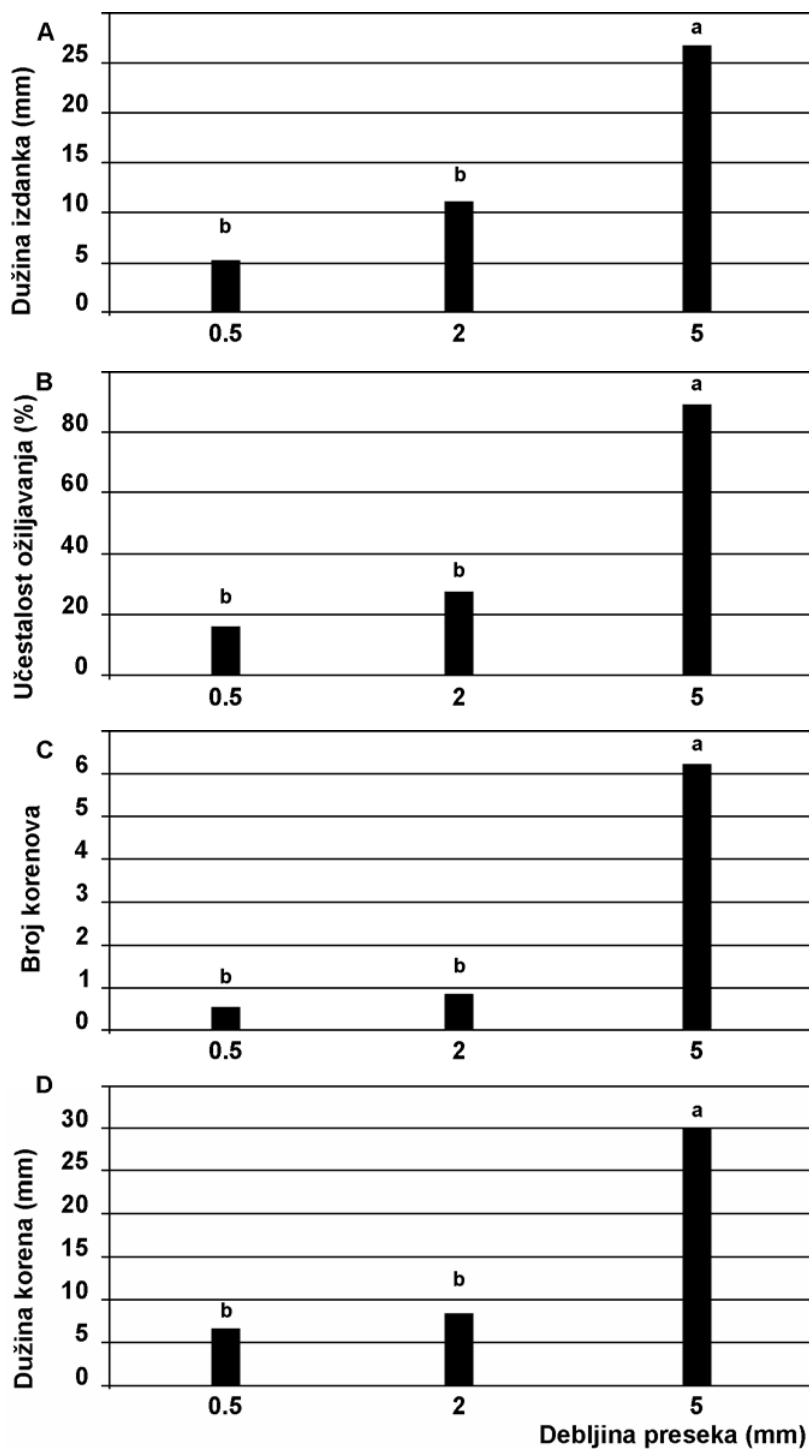
4.3.2. Optimizacija protokola za regeneraciju

Bazalni odsecci debljine 0,5 mm (eng. *thin cell layer* – TCL) su sadržali samo bazalnu ploču (Sl. 17), dok su bazalni odsecci debljine 2 mm i 5 mm sadržali i bazu listova (Sl. 17). U slučaju preseka debljine 2 mm i 5 mm, samo jedan presek po biljci je imao regenerativni potencijal (Sl. 18D). To je takođe bio slučaj i kod većine TCL preseka, ali su u nekoliko slučajeva dva TCL preseka po biljci regenerisala pupoljke. U tim slučajevima za statističku analizu je računat zbir pupoljaka dobijen sa oba odsečka iste biljke.

Debljina preseka je statistički značajno uticala na učestalost regeneracije pupoljaka, srednju vrednost broja pupoljaka po eksplantatu i indeks KP. Kod TCL preseka, učestalost regeneracije je iznosila 22,6%, sa prosečno 2,07 pupoljaka, dok su deblji preseki regenerisali sa većom učestalošću (do 89% kod preseka od 5 mm) i većim prosečnim brojem pupoljaka po eksplantatu (do 23,4 kod preseka od 5 mm) (Sl. 24A, B). Sveukupno, preseki debljine 5 mm su imali najveći indeks KP, do 6,75 (Sl. 24C).



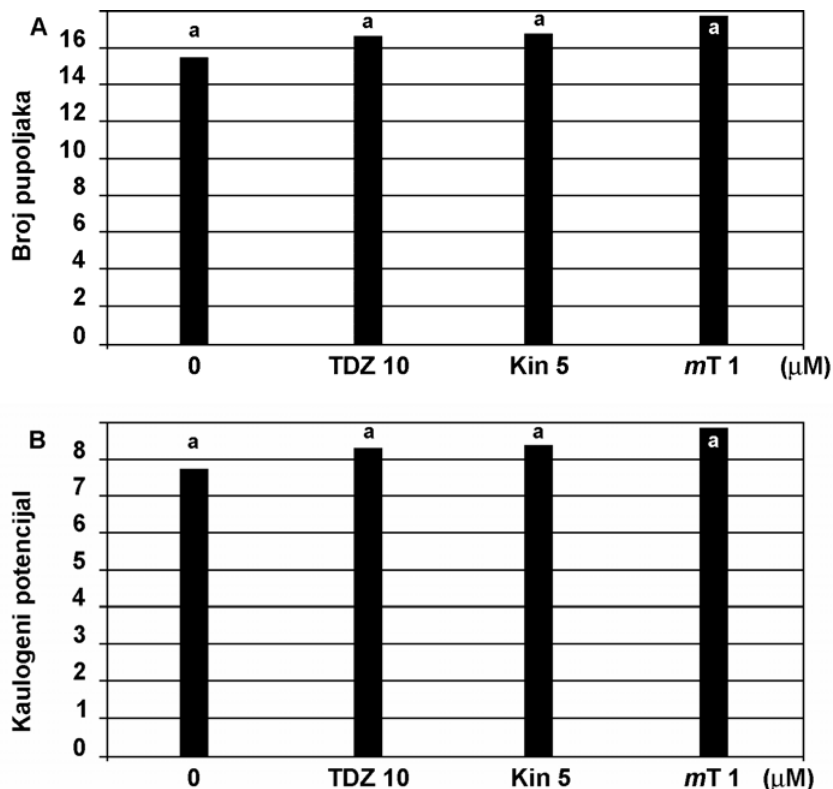
Slika 24. Uticaj debljine preseka na regeneraciju pupoljaka iz bazalnog odsečka biljaka vlašca. **A)** Učestalost regeneracije pupoljaka. **B)** Broj pupoljaka. **C)** Kaulogeni potencijal. Bazalni odsečki biljaka (0,5; 2 ili 5 mm) su kultivisani osam nedelja na podlozi sa 10 μ M TDZ. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 12 uzoraka po tretmanu ($n = 36$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.



Slika 25. Uticaj debljine preseka na rastenje regeneranata dobijenih iz bazalnog odsečka biljaka vlašca. **A)** Dužina izdanka (mm). **B)** Učestalost ožiljavanja (%). **C)** Broj korenova. **D)** Dužina korena (mm). Bazalni odsečki biljaka (0,5; 2 ili 5 mm) su kultivisani osam nedelja na podlozi sa 10 μ M TDZ. Podaci su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja sa 12 uzoraka po tretmanu (n = 36). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

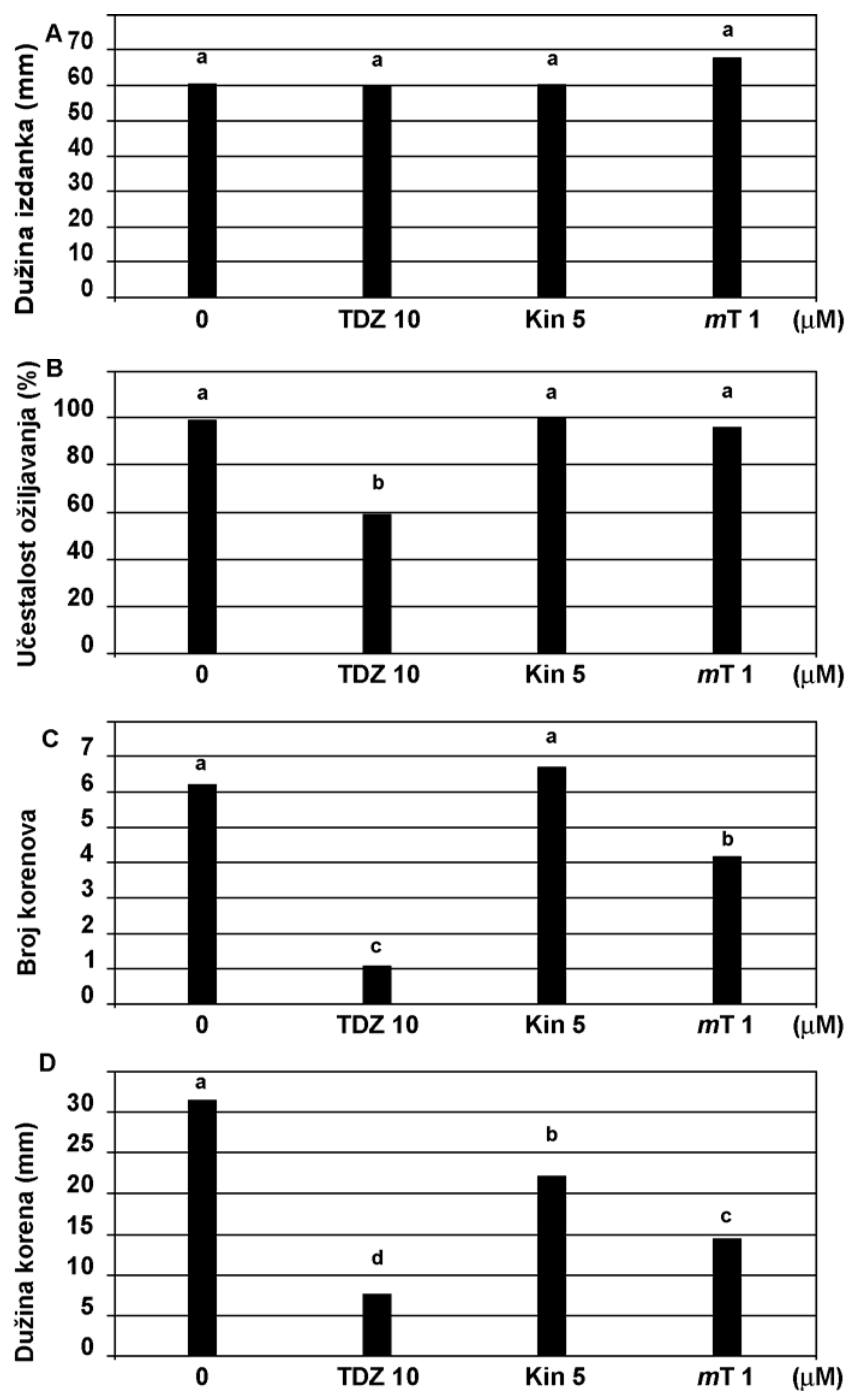
Debljina preseka je značajno uticala i na dužinu izdanka i korena, učestalost ožiljavanja i srednju vrednost broja korenova po eksplantatu ($P \leq 0,001$ za sve veličine). Svi parametri su bili najveći kod regeneranata dobijenih iz preseka debljine 5 mm (Sl. 25A-D).

Pošto je demonstrirano da su eksplantati imali najveći regenerativni potencijal kada su kultivisani na podlozi sa 10 μM TDZ (Sl. 20, 23A), a regenerisane biljke su imale najbolje parametre rastenja kada su eksplantati kultivisani na podlozi sa 5 μM Kin (Sl. 22, 23B) ili 1 μM *mT* (Sl. 21, 23C), protokol za optimizaciju procesa regeneracije rastenja regeneranata je podrazumevao gajenje eksplantata debljine 5 mm na podlozi sa 10 μM TDZ tokom četiri nedelje i subkultivaciju na podlogu sa 5 μM Kin, 1 μM *mT* ili bez RR. U poređenju sa kontrolnim eksplantatima, koji su tokom celog eksperimenta gajeni na podlozi sa 10 μM TDZ, zamena TDZ gore navedenim RR ili njegovim isključenjem posle četiri nedelje nije značajno uticala na učestalost regeneracije (100% na svim tretmanima), srednji broj pupoljaka po eksplantatu, KP indeks (Sl. 26A, B) i dužinu izdanka (Sl. 27A). Međutim, ova promena tretmana je značajno uticala na učestalost ožiljavanja, srednju vrednost broja korenova i dužinu korenova ($P \leq 0,001$ za svaki parametar). Najmanju učestalost ožiljavanja i najmanji broj korenova (1,1) su imale biljke regenerisane iz eksplantata koje su tokom celog eksperimenta (osam nedelja) bili kultivisani na podlozi sa 10 μM TDZ (Sl. 27B, C), dok su najveći broj korenova formirale biljke regenerisane iz eksplantata subkultivisanih na podlogu sa 5 μM Kin (6,7) ili bez RR (6,2) (Sl. 27C). Isti trend je uočen i za dužinu korena. Najduži koren su formirale biljke koje su regenerisale iz eksplantata subkultivisanih na podlogu bez RR (31,5 mm), zatim one subkultivisane na podlogu sa 5 μM Kin (22,1 mm) (Sl. 27D). *mT* je imao slabiji efekat na razviće korenovog sistema, pošto su biljke dobijene na ovoj podlozi imale statistički značajno manji broj korenova, koji su bili kraći od korenova biljaka dobijenih iz eksplantata gajenih na podlozi sa Kin ili bez RR (Sl. 27B-D).

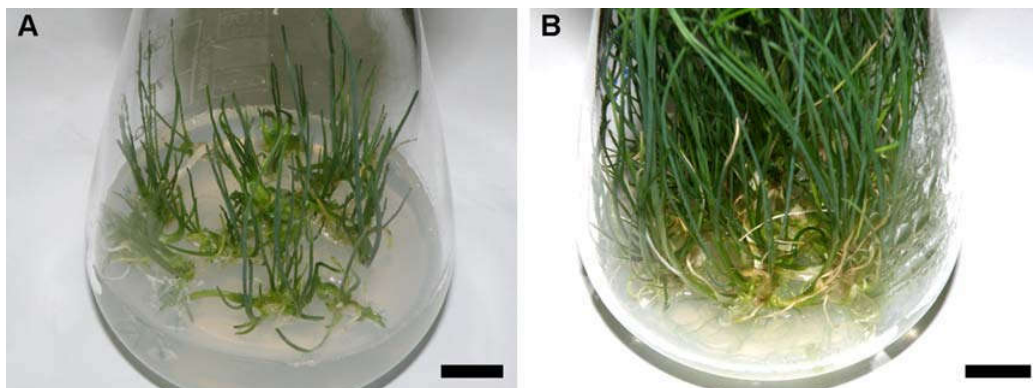


Slika 26. Uticaj produžene kultivacije eksplantata na MS podlozi sa 10 µM TDZ ili subkultivacije na podlogu sa 5 µM Kin, 1 µM *mT* ili bez RR na broj pupoljaka i kaulogeni potencijal. **A)** Broj pupoljaka. **B)** Kaulogeni potencijal. Bazalni odsečki (5 mm) biljaka vlašca su gajeni na MS podlozi sa 10 µM TDZ četiri nedelje, a onda su subkultivisani na MS podlogu sa 10 µM TDZ, 5 µM Kin, 1 µM *mT* ili podlogu bez RR tokom još četiri nedelje. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 16 uzoraka po tretmanu ($n = 48$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

Ovaj eksperiment je pokazao da je za efikasno rastenje regenerisanih biljaka bila neophodna zamena TDZ kinetinom ili njegovo isključenje, posle četiri nedelje indukcije regeneracije. U poređenju sa biljkama koje su kontinuirano rastle na podlozi sa Kin (Sl. 20-22), biljke indukovane iz eksplantata kultivisanih najpre na TDZ i zatim subkultivisanih na podlogu sa Kin su formirale kraći izdanak i koren (Sl. 27A, D), ali im je kaulogeni potencijal bio značajno poboljšao (Sl. 26). Stoga, zadovoljavajući kaulogeni potencijal i rastenje regenerisanih biljaka su postignuti gajenjem eksplantata četiri nedelje na podlozi sa 10 µM TDZ, i nakon toga još četiri nedelje (ili duže) na podlozi bez RR (Sl. 28) ili na podlozi sa 5 µM Kin.



Slika 27. Uticaj produžene kultivacije eksplantata na MS podlozi sa 10 μM TDZ ili subkultivacije na podlogu sa 5 μM Kin, 1 μM *mT* ili bez RR na rastenje regeneranata. **A)** Dužina izdanka. **B)** Učestalost ožiljavanja. **C)** Broj korenova. **D)** Dužina korena. Bazalni odsečki (5 mm) biljaka vlašća su gajeni na MS podlozi sa 10 μM TDZ četiri nedelje, a zatim su subkultivisani na MS podlogu sa 10 μM TDZ, 5 μM Kin, 1 μM *mT* ili podlogu bez RR još četiri nedelje. Podaci predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja sa 16 uzoraka po tretmanu ($n = 48$). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

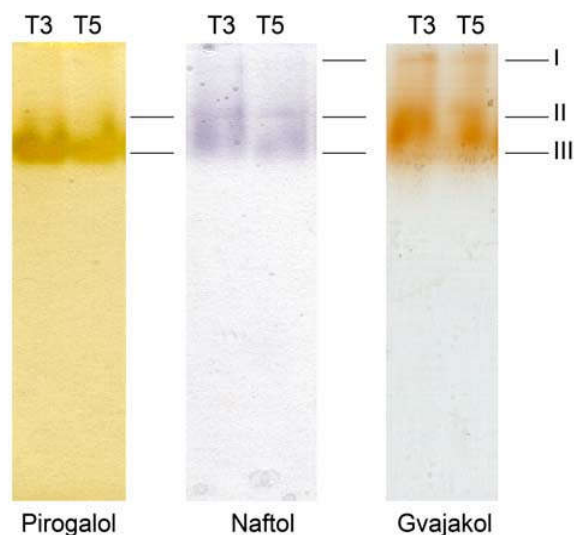


Slika 28. Biljke vlašca koje su regenerisale iz eksplantata kultivisanih tokom četiri nedelje na MS podlozi sa 10 μ M TDZ i **A**) tri ili **B**) osam nedelja na podlozi bez RR. Razmera: A, B 10 mm.

4.4. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema tokom regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum*

Aktivnost POD, CAT i SOD je proučavana tokom prvih 14 dana tretmana za indukciju regeneracije pupoljaka, sa ciljem što boljeg razumevanja potencijalne uloge antioksidativnog sistema u morfogenezi indukovanoj Kin i TDZ iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum* (Sl. 29-32).

Primenom tri metode za detekciju aktivnosti POD, u kojima se koriste različiti supstrati (pirogalol, 4-hloro-1-naftol i gvajakol), detektovan je različit broj izoformi ovog enzima (Sl. 29).

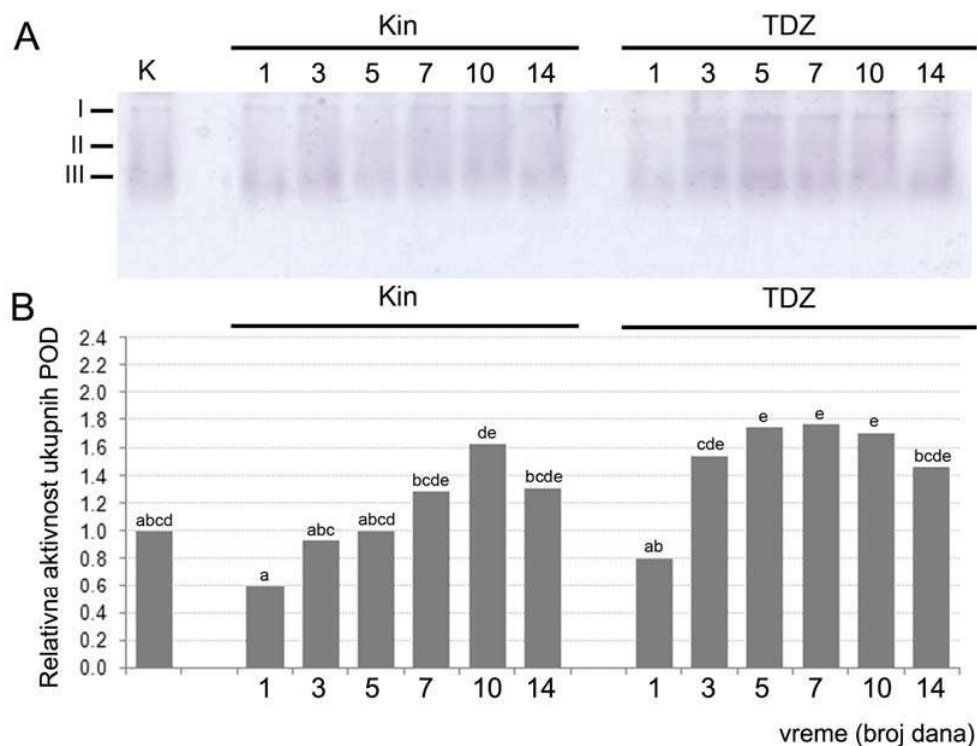


Slika 29. Identifikacija POD izoformi korišćenjem različitih supstrata: pirogalola, 4-hloro-1-naftola i gvajakola u eksplantatima vlašca gajenim na podlozi sa 10 μ M TDZ nakon tri (T3) ili pet (T5) dana kultivacije. Brojevi ukazuju na različite izoforme sa POD aktivnošću.

Dok je u reakciji sa pirogalolom uočena aktivnost dve izoforme POD označene brojevima II i III, u reakcijama sa preostala dva supstrata uočena je još jedna aktivna izoforma POD (I) manje mobilnosti (Sl. 29). Zbog toga je odlučeno da se u eksperimentima u kojima je analizirana aktivnost ovog enzima koristi 4-hloro-1-naftol kao supstrat.

Analizom aktivnosti POD tokom 14 dana morfogeneze *A. schoenoprasum* indukovane citokininima (Kin ili TDZ) detektovano je prisustvo dve od tri izoforme kod svih uzoraka (Sl. 30A). Izoforme I i III bile su prisutne u svim uzorcima tretiranim i Kin i TDZ tokom svih 14 dana, kao i u netretiranoj kontroli, dok je izoforma II uočena samo kod eksplantata izloženih dejstvu TDZ posle trećeg dana od početka tretmana (Sl. 30A).

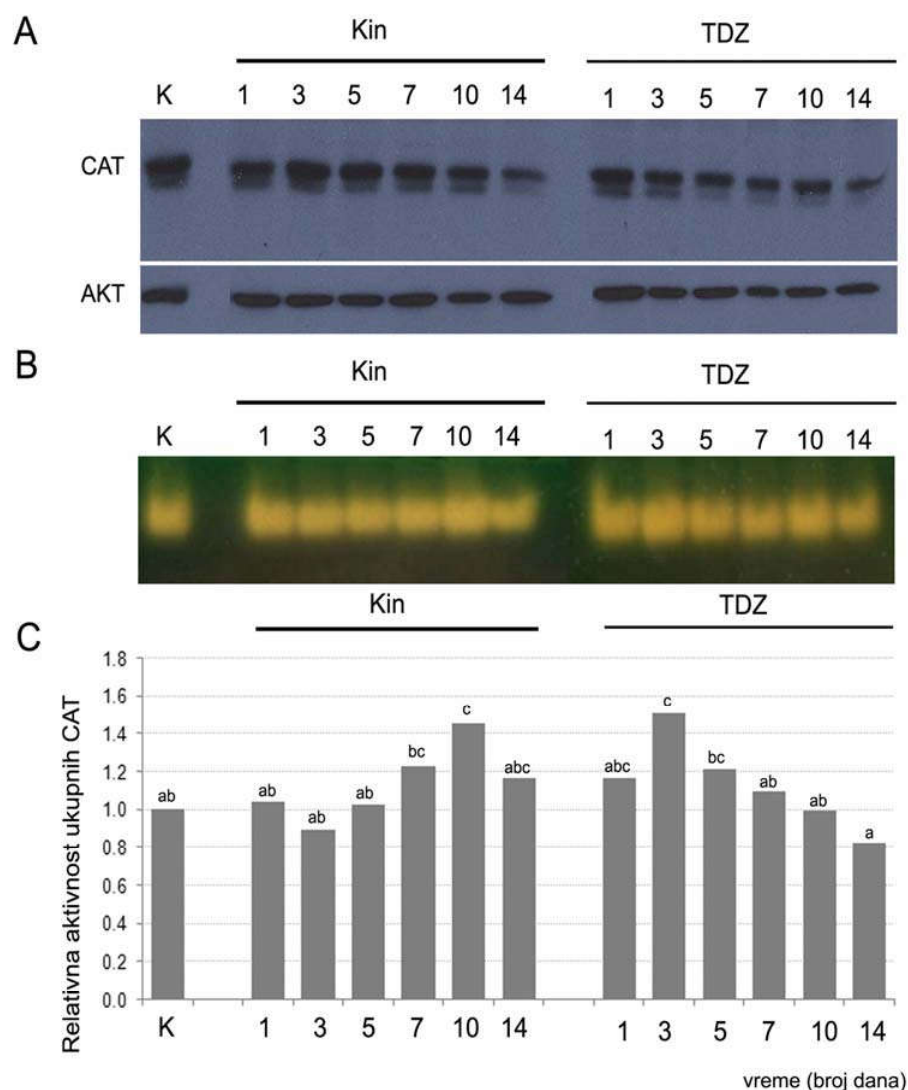
Spektrofotometrijsko merenje ukupne aktivnosti POD je pokazalo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu samo kod eksplantata tretiranih TDZ, kod kojih je uočena dodatna izoforma II (Sl. 30B). Posle 3, 5, 7 i 10 dana kultivacije izmerene aktivnosti POD su bile 54%, 75%, 77% odnosno 70% veće u odnosu na kontrolu. Povećanje ukupne aktivnosti POD u ovim uzorcima koincidira sa pojavom ove izoforme POD. Interesantno je da su eksplantati gajeni na podlozi sa Kin ili TDZ pokazali blago smanjenje aktivnosti POD na samom početku indukcije morfogeneze.



Slika 30. Prisustvo i aktivnost POD u bazalnim odseccima vlašca posle 1, 3, 5, 7, 10 i 14 dana tretmana citokininima (Kin ili TDZ) i kod netretirane kontrole (K). **A)** Nativna elektroforeza je pokazala prisustvo tri aktivne izoforme POD (I, II i III) u reakciji sa 4-hloro-1-naftolom. **B)** Relativna aktivnost ukupnih POD u odnosu na kontrolu dobijena je nakon spektrofotometrijskog određivanja nivoa aktivnosti. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti dva biološka ponavljanja za svaki od uzoraka. Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

Broj, zastupljenost i aktivnost CAT izoformi utvrđena je imunoblot analizom (Sl. 31A) i nativnom elektroforezom proteina (Sl. 31B). Dok je vezivanjem specifičnih antitela u svim uzorcima vlašca detektovano prisustvo dve blisko postavljene izoforme CAT, nativnom elektroforezom dobijena je samo jedna traka sa CAT aktivnošću. Mala razlika u veličini dve razdvojene trake dovela je najverovatnije do preklapanja i pojave jedinstvene trake koja pokazuje specifičnu aktivnost. Kod uzoraka kultivisanih na podlozi sa Kin ili TDZ aktivnost katalaza se razlikovala, pre svega po dinamici tokom 14 dana tretmana. Tokom morfogeneze, Kin je indukovao slab odgovor i maksimalna aktivnost CAT je uočena tek nakon 10 dana kultivacije, dok je TDZ prouzrokovao nagli porast aktivnosti CAT posle samo tri dana. Ove razlike su potvrđene i spektrofotometrijskom kvantifikacijom aktivnosti CAT (Sl. 31C). Maksimalne vrednosti aktivnosti CAT su bile statistički značajno različite od kontrole, sa aktivnošću

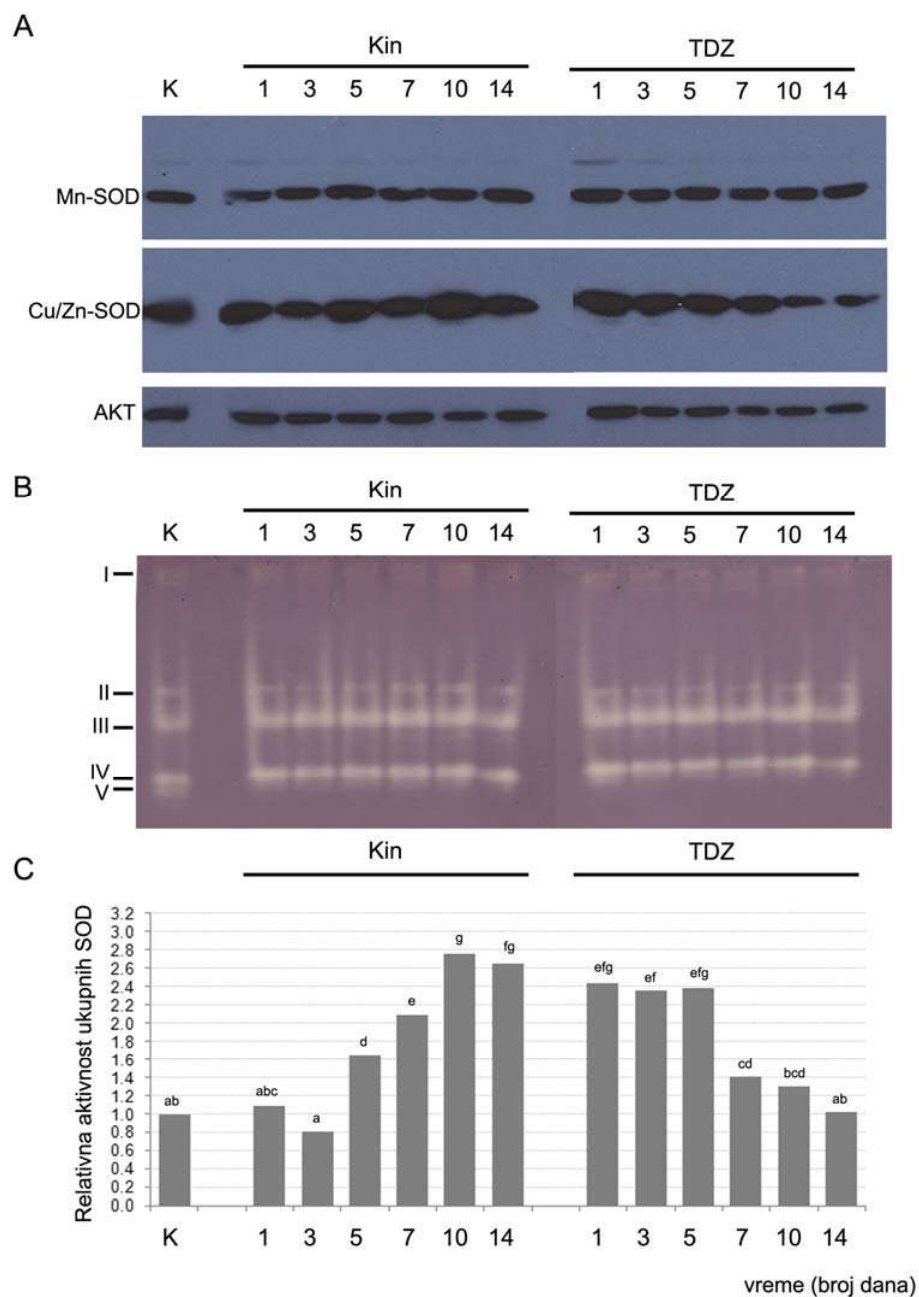
koja je bila veća za 45% kod eksplantata gajenih na podlozi sa Kin i 51% kod eksplantata gajenih na podlozi sa TDZ u odnosu na kontrolu. U ostalim uzorcima aktivnost CAT nije bila statistički značajno različita u odnosu na kontrolu.



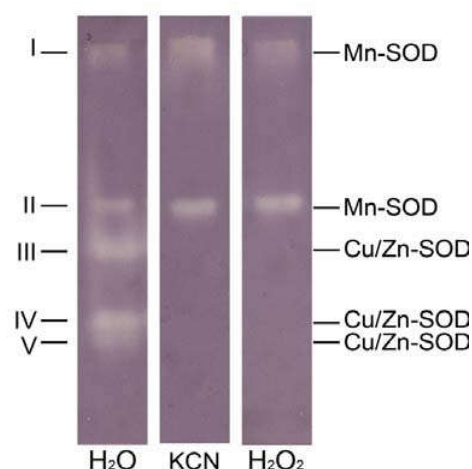
Slika 31. Prisustvo i aktivnost CAT u bazalnim odsečcima vlašca posle 1, 3, 5, 7, 10 i 14 dana tretmana citokininima (Kin ili TDZ) i kod netretirane kontrole (K). **A)** Imunoblot analizom je potvrđeno prisustvo dve izoforme CAT, uz korišćenje aktina (AKT) kao kontrole za ujednačen unos proteina. **B)** Nativna elektroforeza je pokazala aktivnost CAT. **C)** Relativna aktivnost ukupnih CAT u odnosu na kontrolu dobijena nakon spektrofotometrijskog određivanja nivoa aktivnosti izražena je kao srednja vrednost za dva biološka ponavljanja za svaki od uzoraka. Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.

Broj i relativna zastupljenost pojedinih SOD izoformi potvrđena je imunoblot analizom (Sl. 32A). Nakon native elektroforeze proteina detektovano je pet izoformi

SOD kod svih uzoraka (Sl. 32B). Preinkubacija sa specifičnim inhibitorima je omogućila da se identifikuju pojedinačne izoforme: trake I i II predstavljaju MnSOD izoformu, dok III, IV i V predstavljaju Cu/ZnSOD izoforme (Sl. 33). Kod svih uzoraka najintezivnije trake su bile III i IV Cu/ZnSOD izoforme i traka II MnSOD izoforma. Relativna aktivnost SOD dobijena nakon spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti ukupnih SOD je imala sličan trend kao i POD i CAT (Sl. 32C). Kin je indukovao postepeni porast SOD sa maksimalnom vrednošću zabeleženom 10. dana od početka tretmana. Kod eksplantata koji su gajeni na podlozi sa TDZ, maksimalna vrednost aktivnosti SOD je detektovana već posle prvog dana tretmana, a visok nivo aktivnosti se zadržao još dodatnih pet dana, da bi onda aktivnost opala tokom preostalog perioda kultivacije i približila se nivou kontrole.



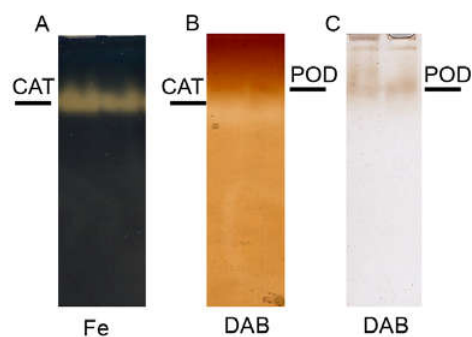
Slika 32. Prisustvo i aktivnost SOD u bazalnim odseccima vlašca posle 1, 3, 5, 7, 10 i 14 dana tretmana citokininima (Kin ili TDZ) i kod netretirane kontrole (K). **A)** Imunoblot analizom je potvrđeno prisustvo Mn- i Cu/Zn-SOD izoformi uz korišćenje aktina (AKT) kao kontrole za ujednačen unos proteina. **B)** Nativna elektroforeza pokazala je aktivnost pet različitih izoformi SOD (I-V). **C)** Relativna aktivnost ukupnih SOD u odnosu na kontrolu, dobijena nakon spektrofotometrijskog određivanja nivoa aktivnosti izražena je kao srednja vrednost za dva biološka ponavljanja za svaki od uzoraka. Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P \leq 0,05$) prema LSD testu.



Slika 33. Identifikacija izoformi SOD preinkubacijom u rastvorima inhibitora KCN i H₂O₂, pet izdvojenih izoformi (I – V) su određene kao MnSOD (I i II) i Cu/ZnSOD (III – V).

4.4.1. Diferencijalno bojenje POD i CAT

Nakon osnovnih metoda za detekciju POD i CAT ustanovljeno je da je njihova aktivnost na istom nivou i da dolazi do preklapanja traka. Napred opisanim procedurama obojeni su gelovi za detekciju aktivnosti. Aktivnost CAT je detektovana kao nebojena traka nakon bojenja rastvorom FeCl₃ i [K₃Fe(CN)₆] (Sl. 34A), dok je POD detektovana bojenjem sa DAB koji u reakciji sa ovim enzimima daje tamno braon boju (Sl. 34C). Diferencijalnim bojenjem jasno je razgraničena aktivnost ova dva enzima (Sl. 34B). S obzirom da DAB inhibira aktivnost CAT, deo gela na kome su pozicionirane CAT je ostao nebojen, dok je POD aktivnost detektovana kao pojava braon traka na gelu (Sl. 34B).



Slika 34. Diferencijalno bojenje POD i CAT. **A)** Detekcija CAT osnovnom metodom (Fe bojenje). **B)** DAB u reakciji sa POD daje tamno braon boju, dok istovremeno inhibira CAT. Nebojena mesta na gelu su mesta pozicioniranja CAT. **C)** Tamno braon obojene trake na gelu su mesta pozicioniranja POD.

4.4.2. *In vivo* detekcija H_2O_2 u biljnom tkivu

Detektovano je prisustvo H_2O_2 u bazalnim odsećima biljaka vlašca posle kultivacije na podlozi sa $10 \mu M$ TDZ. Tamno braon obojene zone su mesta gde dolazi do formiranja polimerizovanih jedinjenja u reakciji DAB i H_2O_2 . Očekivano je da se i na mestu povređivanja eksplantata uočavaju tamno braon obojene zone (Sl. 35, označeno crnom strelicom). Upravo iz dela eksplantata označenog crvenom strelicom započinje regeneracija pupoljaka. Sve to ukazuje na povezanost povećane aktivnosti antioksidativnih enzima i procesa regeneracije pupoljaka.



Slika 35. *In vivo* detekcija H_2O_2 u bazalnom odsećku biljke vlašca nakon tretmana na podlozi sa $10 \mu M$ TDZ. Tamno braon polimerizovana jedinjenja nastaju u reakciji DAB i H_2O_2 .

5. DISKUSIJA

Za razliku od ekonomski najznačajnijih vrsta roda *Allium*, crnog i belog luka, u literaturi je dostupno vrlo malo informacija o indukciji morfogeneze *in vitro* kod šalota i vlašca i ti protokoli nisu dovoljno efikasni za dalju primenu u oplemenjivanju ovih biljnih vrsta (Rauber i Grunewaldt, 1988; Mohamed-Yasseen i sar., 1994, Zheng i sar., 1998, 1999; Sulistyaningsih i sar., 2006; Hailekidan i sar., 2013). Stoga je predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio indukcija procesa regeneracije *in vitro* kod ove dve vrste lukova, koje se koriste u humanoj ishrani, ali i kao lekovite i ukrasne biljne vrste.

5.1. Regeneracija *A. ascalonicum*

5.1.1. Izbor eksplantata i parametara za kvantifikaciju regenerativnog potencijala

Od kada su Hawes i sar. (1991) pokazali da ćelije apikalnog regiona korena vrste *Medicago sp.* poseduju sposobnost kalogeneze i organogeneze, eksplantati korenova se često koriste za indukciju regeneracije kod brojnih biljnih vrsta, uključujući i vrste roda *Allium* (Shuto i sar., 1993; Haque i sar., 1997; Myers i Simon, 1998; Robledo-Paz i sar., 2000; Martín-Urdíroz i sar., 2004; Luciani i sar., 2006; Scotton i sar., 2013). Uspostavljanje pouzdanog sistema za regeneraciju iz vrhova korenova pokazalo se kao efikasan preduslov u procesima genetičkih transformacija biljaka (Robledo-Paz i sar., 2004; Zheng i sar., 2004; Ahn i sar., 2013), pošto zona izduživanja korena predstavlja veoma osetljivo mesto za genetičku transformaciju posredstvom sojeva *Agrobacterium* (Yi i sar., 2002), a istovremeno je i zona sa visokim regenerativnim potencijalom (Haque i sar., 1999).

Osim toga, izolacija korenova sa donor biljaka gajenih u uslovima *in vitro* se pokazala kao vrlo praktičan pristup, jer se korenovi tokom vremena mogu više puta izolovati sa istih biljaka i na taj način se obezbeđuje dovoljno materijala za eksperimente. Takođe, pokazano je i da korenovi izolovani sa regenerisanih biljaka imaju regenerativni potencijal sličan majci biljci, što otvara mogućnost održavanja

biljnog materijala cikličnom regeneracijom, kao što je demonstrirano za eksplantate korenova *A. sativum* i *A. tuberosum* (Shuto i sar., 1993).

Kod nekih vrsta roda *Allium*, uključujući i one analizirane u ovoj disertaciji, samo apikalni region korena odgovara na stimulus RR formiranjem kalusa ili direktnom regeneracijom pupoljaka ili somatskih embriona (Shuto i sar., 1993; Haque i sar., 1997; Robledo-Paz i sar., 2000). Kod belog luka su samo odsecci korenova dužine 2-3 mm imali morfogenetski potencijal (Shuto i sar., 1993; Haque i sar., 1997; 1998). Nasuprot tome, kod drugih vrsta roda *Allium* proliferacija ćelija i regenerativni odgovor se dešava celom dužinom korena (Myers i Simon, 1998; Zheng i sar., 2003; Scotton i sar., 2013), mada je u nekim od tih slučajeva apikalni region sa većom učestalošću regenerisao pupoljke (Zheng i sar., 2003). Ove razlike u regenerativnom odgovoru fragmenata korenova različitih vrsta, kultivara ili linija lukova se mogu objasniti genetičkom osnovom biljnog donor materijala. Eksplantati različitih jedinki ne usvajaju istim tempom RR iz podloge (Auer i sar., 1992a, b; 1999), što zatim različito utiče na metabolizam i distribuciju endogenih RR (Vankova i sar., 1991; Auer i sar., 1992a, b). Osim toga, u navedenim protokolima su korišćeni i različiti citokinini koji se u biljnom organizmu metabolišu u različita jedinjenja (Werbrouck i sar., 1996).

U velikom broju studija na vrstama roda *Allium* učestalost regeneracije se predstavlja kao jedini parametar za kvantifikaciju regenerativnog potencijala (Haque i sar., 1997; Zheng i sar., 1998, 1999; Luthar i Bohanec, 1999; Sata i sar., 2001; Fereol i sar., 2002; Šušek i sar., 2002; Zheng i sar., 2003; Zhang i sar., 2004; Luciani i sar., 2006; Scotton i sar., 2013), što može da dovede do neprecizne interpretacije rezultata kod jedinki koje odgovaraju sa visokom učestalošću regeneracije, ali sa malim brojem regeneranata po eksplantatu, kao što je slučaj sa linijom 54 u ovoj disertaciji. U opsežnoj analizi kaulogenog potencijala jedinki 88 kolekcija *A. thaliana* je takođe demonstrirano da visoka učestalost regeneracije ne znači nužno i veliki prosečan broj regeneranata po eksplantatu (Motte i sar., 2014). Uvođenjem parametra srednji broj regeneranata po eksplantatu (Barandiaran i sar., 1999a; Martín-Urdíroz i sar., 2004) dobija se precizniji i relevantniji uvid u stvarni regenerativni potencijal. Neki istraživači smatraju da ukupan broj regenerisanih biljaka daje bolji uvid u regenerativni potencijal biljnog materijala nego učestalost regeneracije (Taguchi-Shiobara i sar., 1997; Bregitzer

i Campbell, 2001). U skladu sa tim, indeks KP se pokazao kao vrlo koristan za procenu ukupnog regenerativnog potencijala u ovoj disertaciji, jer je omogućio istovremenu procenu učestalosti regeneracije i prosečnog broja regeneranata po eksplantatu.

5.1.2. Regenerativni potencijal pojedinačnih linija

Već na početku ovih istraživanja je uočena vrlo visoka individualna varijabilnost regenerativnog odgovora biljnog materijala (Sl. 3), usled koje nije bilo moguće pouzdano odrediti optimalnu proceduru za indukciju regeneracije. Osim toga, procedura dobijena na osnovu inicijalnih istraživanja je bila suviše dugotrajna. S obzirom da su faze indukcije kalusa i indukcije regeneracije trajale po osam nedelja, a faza ožiljavanja 4-8 nedelja, biljke spremne za aklimatizaciju su dobijene tek nakon 20-24 nedelje. Zbog tih činjenica izvršen je skrining 30 nasumično izabranih jedinki sa dobro razvijenim korenovim sistemom, u cilju izbora visoko regenerativnih individua koje će u što kraćem vremenskom periodu efikasno odgovoriti na indukcionu tretman.

Odabir linija sa visokim regenerativnim potencijalom nije uobičajena praksa pri razvijanju protokola za regeneraciju *in vitro*, već se eksplantati nasumično biraju i postavljaju na različite tretmane. Međutim, brojne publikacije ukazuju na izuzetno značajan uticaj genotipa na ovaj proces. Kod različitih vrsta roda *Allium* je uočena značajna varijabilnost u regenerativnom odgovoru jedinki različitih klonova (Myers i Simon, 1998, 1999), kultivara (Eady i sar., 1998; Robledo-Paz i sar., 2000; Zhang i sar., 2004) ili kolekcija (Barandiaran i sar., 1999a; Martín-Urdíroz i sar., 2004) u okviru iste vrste. Međutim, uticaj genotipa na nivou jedinice je samo retko proučavan. U ovoj disertaciji se pokazalo da je genotip najznačajniji faktor koji utiče na regenerativni potencijal. Iako su sve linije imale sposobnost regeneracije, njihov regenerativni potencijal je bio izuzetno varijabilan; neke od njih su regenerisale samo nekoliko pupoljaka, dok su druge regenerisale desetine ili stotine pupoljaka pod istim uslovima tokom istog vremenskog perioda. Učestalost regeneracije pupoljaka se kretala 0,93-100%, a broj pupoljaka po eksplantatu 0,01-20,67 (Sl. 4).

Slično, Zheng i sar. (1999) su utvrdili značajne razlike u regenerativnom potencijalu između 83 linije kalusa, pri čemu je svaka poticala od pojedinačnog zigotskog embriona vrste *A. cepa*. Pored toga, Bohanec i Jakše (1999) su utvrdili velike

razlike u učestalosti indukcije ginogenih embriona iz cvetova *A. cepa* izolovanih sa različitih donor biljaka, a Silvertand i sar. (1995) individualnu varijabilnost kaulogenog potencijala odsečaka cvetnih drški *A. ampeloprasum*. Štaviše, Javornik i sar. (1998) su utvrdili veliku varijabilnost ginogenog odgovora F1 generacije dobijene samooprašivanjem tri dihaploidne biljke *A. cepa*. Slična varijabilnost regenerativnog potencijala jedinki u okviru inbred linija je uočena i kod drugih monokotila (Popelka i Altpeter, 2003; Ozbay i Özgen, 2010; Rakshit i sar., 2010). Vrlo je ilustrativan primer varijabilnosti regenerativnog potencijala jedinki iz 20 kolekcija vrste *A. sativum*, čija se varijabilnost ogledala kako u učestalosti formiranja kalusa (u rasponu od 11,6% do 62,6%), tako i u srednjem broju izdanaka po gramu kalusnog tkiva (0,2-15,3 izdanaka/g) (Barandiaran i sar., 1999a). Slične rezultate su dobili i Martín-Urdíroz i sar. (2004).

Osim kod lukova, i kod drugih biljnih vrsta je pokazana značajna individualna varijabilnost regenerativnog potencijala, kao kod spanaća (Ishizaki i sar., 2001; Milojević i sar., 2011), dinje (Molina i Nuez, 1995), lucerke (Chen i sar., 1987) i pamuka (Mishra i sar., 2003). Demonstrirano je da se visok regenerativni kapacitet kao osobina može preneti sa roditelja na potomstvo, što ukazuje da je genetički determinisana (Marchionni-Basté i sar., 2007; Anami i sar., 2010; Milojević i sar., 2011). Nedavno su kod nekih biljnih vrsta mapirani lokusi (eng. *quantitative trait loci* - QTL) vezani za potencijal za regeneraciju *in vitro* (Bolibok i sar., 2007; Jia i sar., 2009; Hromada-Judycka i sar., 2010; Liu i sar., 2012; Motte i sar., 2014) i razvijeni su molekularni markeri koji se koriste u potrazi za genotipima sa visokim regenerativnim kapacitetom za neke ekonomski značajne biljne vrste (Taguchi-Shiobara i sar., 1997; Bregitzer i Campbell, 2001; Li i sar., 2004; Bolibok i Rakoczy-Trojanowska, 2006; Jia i sar., 2009; Song i sar., 2010; Priyono i sar., 2010; Liu i sar., 2012). I pored toga što su mehanizmi koji kontrolišu sposobnost biljnog materijala da odgovori na morfogenetski stimulus u velikoj meri rasvetljeni, još uvek nije jasno šta leži u osnovi varijabilnosti regenerativnog potencijala. Na osnovu genetičkih studija je najpre predloženo dihibridno nasleđivanje potencijala za somatsku embriogenezu (Pueschel i sar., 2003; Moltrasio i sar., 2004) i kaulogenezu (Molina i Nuez, 1996), ali je kasnije uočeno da je regenerativni potencijal poligena osobina determinisana od strane više lokusa rasutih po celom genomu (Bolibok i Rakoczy-Trojanowska, 2006; Taguchi-Shiobara i sar., 2006; Jia i sar., 2009; Motte i sar., 2014). Motte i sar. (2014) su identifikovali pet lokusa koji

determinišu regenerativni potencijal *A. thaliana*, a za jedan od njih su utvrdili da kodira LRR receptor kinazu (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1 - RPK1), receptor iz signalnog puta ABA. Ove kinaze su receptorni molekuli, koje aktiviraju stimulusi iz okruženja. Mutacija *RPK1* gena izaziva gubitak regenerativnog potencijala kod jedinki ekotipa *A. thaliana* sa izuzetno visokim regenerativnim potencijalom (Motte i sar., 2014). Ekspresija *RPK1* je važna za lokalizaciju PIN1 i uspostavljanje gradijenta auksina, percepciju intercelularnih signala i posredovanje u intracelularnom odgovoru za pokretanje specifičnog puta koji dovodi do razvića pupoljaka (Motte i sar., 2014). Osim toga, pokazano je da metilacija DNK i modifikacija histona reguliše *de novo* regeneraciju pupoljaka kod *A. thaliana* modulacijom ekspresije *WUS* i promenama u signalnom putu auksina (Li i sar., 2011). Mutacija gena koji kodiraju metiltransferaze i acetiltransferaze, koje vrše metilaciju DNK i modifikaciju histona, utiče na ekspresiju *WUS*. Kod mutanta za metiltransferazu, kod koga ne dolazi do metilacije regulatornih sekvenci *WUS*, ekspresija ovog gena je povećana, kao i ekspresija *ARF3*. Verovatno svi ovi geni doprinose ekspresiji regenerativnog potencijala, a mutacija bilo kog od njih može izazvati njegovo smanjenje. U skladu sa tim, Motte i sar. (2013) su sugerisali da je proces *de novo* regeneracije pupoljaka kod jedinki iz 88 kolekcija *A. thaliana* bio zaustavljen na različitim stupnjevima, što može biti posledica neadekvatne ekspresije gena čiji su produkti neophodni za nastavak procesa regeneracije i razvića pupoljaka. Kod jedinki nekih kolekcija proces kaulogeneze je npr. bio zaustavljen na stupnju primordija, koje se nikad nisu potpuno razvile u pupoljke.

Osim navedenog, smatra se i da citoplazmatički efekti i nukleo-citoplazmatičke interakcije utiču na proces regeneracije *in vitro* (Deglene i sar., 1997; Mitić i sar., 1999; Pinto i sar., 2008). Sve ove činjenice ukazuju na vrlo kompleksnu genetičku kontrolu potencijala za *de novo* regeneraciju. U praktičnom smislu, ovaj rezultat podržava pristup da se najpre izvrši izbor visoko regenerativnih individua, da bi proces regeneracije bio što efikasniji. Ovaj stav podržavaju i ranija zapažanja da visoko produktivne individue mogu biti prisutne kod kultivara sa niskim regenerativnim potencijalom (Chen i sar., 1987; Rose i sar., 1999; Ishizaki i sar., 2001; Mishra i sar., 2003; Milojević i sar., 2011). Štaviše, visoka varijabilnost rezultata i potreba za velikim uzorkom, koje su tipične za kulturu biljnih ćelija, tkiva i organa, se mogu objasniti visokom genetičkom varijabilnošću biljnog donor materijala.

Istraživanja u okviru ove disertacije su pokazala i da je individualnim linijama bilo potrebno različito vreme za regeneraciju biljaka, što otvara mogućnost skraćivanja procedure regeneracije odabirom linija koje brzo odgovaraju na indukcionu tretman. Ovo je u skladu sa rezultatima Li i sar. (2013), koji su između kolekcija, inbred linija, njihovog potomstva i hibrida šargarepe utvrdili postojanje značajnih razlika u vremenskom periodu potrebnom za embriogeni odgovor mikrospora. U isto vreme su Zhao i sar. (2013) utvrdili da je za regeneraciju pupoljaka kod ekotipova *A. thaliana* Wassilewskija i Columbia potrebno različito vreme, tako da brže odgovara ekotip Columbia koji ujedno ima i veći kaulogeni potencijal. Rezultati u ovoj disertaciji su potvrdili da je za regeneraciju pupoljaka potrebno različito vreme i da najbrže odgovaraju jedinke koje pripadaju liniji sa najvećim kaulogenim potencijalom. U skladu sa tim, kod jedinki iz 88 kolekcija *A. thaliana* je ustanovljena velika varijabilnost u vremenu potrebnom za *de novo* regeneraciju pupoljaka (Motte i sar., 2014).

Velika varijabilnost u morfologiji i teksturi indukovanih kalusa individualnih linija šalota je takođe dokumentovana. Osobine kalusa su bile stabilne i uočljive tokom celokupnog eksperimenta. Nasuprot tome, u literaturi su opisana samo tri (Zheng i sar., 1998; Eady i sar., 1998; Fereol i sar., 2002; Luciani i sar., 2006), odnosno četiri tipa kalusa (Silvertand i sar., 1996) kod vrsta roda *Allium*, sa varijabilnim regenerativnim potencijalom. Zhao i sar. (2013) su takođe utvrdili postojanje razlike u morfologiji kalusa i izdanaka između ekotipova *A. thaliana* Wassilewskija i Columbia.

5.1.3. Uticaj inteziteta svetlosti

Svetlost se često navodi kao jedan od presudnih faktora koji svojim kvalitetom ili intezitetom na različite načine može upravljati procesima regeneracije *in vitro*. U okviru ove disertacije najbolja regeneracija je postignuta kada su eksplantati gajeni u prisustvu svetlosti pri PPF 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom faza indukcije kalusa i indukcije regeneracije (Sl. 5). Kada se indukcija kalusa odvijala u odsustvu svetlosti, tokom faze indukcije regeneracije nije bilo moguće postići pun regenerativni potencijal eksplantata, pa je broj pupoljaka na kalusima indukovanim u mraku bio dvostruko manji nego na kalusima indukovanim u prisustvu svetlosti pri PPF 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. To je u suprotnosti sa široko prihvaćenom praksom (kod lukova i generalno kod ostalih biljaka) da se faza za indukciju kalusa odigrava u mraku, a zatim sledi izlaganje eksplantata

svetlosti tokom faze indukcije regeneracije (Robledo-Paz i sar., 2000; Fereol i sar., 2002; Luciani i sar., 2006). Međutim, Haque i sar. (1997) i Martín-Urdíroz i sar. (2004) su takođe postigli poboljšanu regeneraciju izdanaka iz apikalnih osečaka korenova belog luka tako što su eksplantate izložili svetlosti od samog početka faze indukcije kalusa. Tome slično, Zhang i sar. (2004) su selekcionisali visoko regenerativne linije ćelijskih agregata crnog luka gajenjem suspenzija u prisustvu svetlosti. U istraživanjima u okviru ove disertacije, slično kao kod Martín-Urdíroz i sar. (2004), utvrđeno je da svetlost nije neophodna za indukciju regeneracije, ali da je u prisustvu svetlosti proces regeneracije daleko efikasniji nego u mraku. Slični rezultati su dobijeni i na drugim biljnim vrstama. Kod spanaća je takođe pokazano da je regeneracija somatskih embriona iz odsečaka korenova moguća u mraku, ali da je proces regeneracije višestruko efikasniji kada su eksplantati gajeni na svetlosti u opsegu PPFD 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Milojević i sar., 2012). Sličan opseg (PPFD 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) je bio optimalan i za kaulogenezu *Dierma erectum* (Koetle i sar., 2010), dok je za propagaciju *in vitro* nekih biljnih vrsta bio optimalan niži ili viši intezitet svetlosti, npr. 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ za *Withania somnifera* (Lee i sar., 2007) ili čak 570-860 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ za *Musa acuminata* (Kodym i Zapata-Aris, 1999). Biljne vrste imaju različite zahteve prema svetlosti, što nije neočekivano jer svetlost kontroliše mnogobrojne fiziološke procese i utiče na rastenje, anatomiju i morfogenezu biljaka (Lee i sar., 2007; Mengxi i sar., 2011).

5.1.4. Uticaj odnosa 2,4-D/BA u podlozi

Rezultati ove disertacije su pokazali da kaulogeni kalus može biti indukovan na eksplantatima *A. ascalonicum* u prisustvu 2,4-D kao jedinog RR, ali je pritom proces regeneracije izuzetno neefikasan. Eksplantati gajeni na podlozi sa 5 ili 10 μM 2,4-D su regenerisali sa učestalošću manjom od 3%, dok su eksplantati gajeni na podlozi sa 1 μM 2,4-D regenerisali sa učestalošću od 60% i prosečno 1,9 pupoljaka po eksplantatu (Sl. 7). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa brojnim podacima iz literature o drugim vrstama roda *Allium*. 2,4-D je korišćen kao jedini RR (2,2-4,5 μM) za indukciju organogenog kalusa iz korenova *A. sativum* (Myers i Simon, 1998; Robledo-Paz i sar., 2000), ali je ovaj kalus bio sposoban da regeneriše samo posle produženog perioda kultivacije od šest meseci (Myers i Simon, 1998). Kod vrste *A. tuberosum* indukcija kaulogenog

kalusa je bila prilično efikasna u prisustvu 5,38 μM NAA (Shuto i sar., 1993). 2,4-D nije bio dovoljan za indukciju organogenog kalusa niti pupoljaka iz korenova kultivara belog luka "White roppen" (najviše 10% eksplantata je odgovorilo na 1 μM 2,4-D) (Haque i sar., 1997). Međutim, ovi autori su kasnije demonstrirali da je 2,4-D kao jedini RR bio sposoban da indukuje somatsku embriogenezu kod istog kultivara belog luka. 2,4-D je u širokom opsegu koncentracija 0,1-5 μM indukovao značajan embriogeni odgovor eksplantata (Haque i sar., 1998). Štaviše, pri optimalnoj koncentraciji od 0,5 μM 2,4-D u toj studiji je indukovana indirektna somatska embriogeneza, u kojoj je 98% eksplantata formiralo embriogeni kalus, sa prosečno 45 somatskih embriona po eksplantatu (Haque i sar., 1998).

Za povećanje efikasnosti indukcije indirektna kaulogeneze iz apikalnih odsečaka korenova šalota u ovoj disertaciji je bila neophodna kombinacija auksina i citokinina. Dodatak BA u podlogu koja je sadržala 2,4-D je povećao učestalost formiranja kalusa na 100% eksplantata, sa prosečno 24,5 pupoljaka po eksplantatu (Sl. 7). Ovaj rezultat je takođe u saglasnosti sa rezultatima drugih studija, u kojima je dodatak citokinina (Kin, BA ili 2iP) u podlogu za indukciju regeneracije (koja je sadržala 2,4-D) značajno poboljšao efikasnost regeneracije, kao kod belog luka (Fereol i sar., 2002; Robledo-Paz i sar., 2000; Myers i Simon, 1998). Zapravo, Haque i sar. (1997) su utvrdili da su brojne kombinacije auksina i citokinina u širokom opsegu koncentracija (0,1-5 μM 2,4-D ili 1-10 μM NAA u kombinaciji sa 0,1-5 μM Kin ili 0,1-40 μM BA) bile efikasne za indukciju procesa kaulogeneze iz apikalnih odsečaka korenova kod kultivara belog luka "White roppen".

Martín-Urdíroz i sar. (2004) su primenili tri različite kombinacije RR, koje su se u prethodnim istraživanjima pokazale kao efikasne, uključujući i protokol Haque i sar. (1997), na jedinke tri kolekcije koje predstavljaju tri genetički vrlo različite grupe belog luka. Protokol po Haque i sar. (1997), koji je bio vrlo efikasan kod kultivara "White roppen", kompletno je bio neuspešan u istraživanju Martín-Urdíroz i sar. (2004), dok su druge dve procedure bile vrlo efikasne, potvrđujući da je genotip odlučujući faktor koji utiče na regenerativni potencijal. Ova činjenica takođe ukazuje da različiti genotipovi mogu imati različite zahteve za RR. Kontradiktorni rezultati Haque i sar. (1997, 1998), koji su u dve studije na istoj sorti belog luka upotrebom istog RR i istog tipa eksplantata

dobili vrlo različite rezultate, mogli bi se takođe objasniti različitim potrebama eksplantata izolovanih sa različitih jedinki, za RR. Shodno tome, Zhao i sar. (2013) su pokazali jasnu korelaciju između kaulogenog odgovora jedinki dva ekotipa *A. thaliana* (Wassilewskija i Columbia) i njihove različite potrebe za RR. Eksplantati jedinki ekotipa Columbia, koji su imali niži regenerativni potencijal, su zahtevali višu koncentraciju NAA da bi dostigli svoju maksimalnu učestalost regeneracije (Zhao i sar., 2013). Kod ovih ekotipova *A. thaliana* je detektovan različit nivo ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za biosintezu auksina i citokinina i shodno tome različit nivo endogenih hormona. Osim toga, eksplantati jedinki ekotipa Columbia su efikasnije regenerisali u prisustvu IAA nego NAA, za razliku od jedinki ekotipa Wassilewskija (Zhao i sar., 2013).

Uzimajući u obzir rezultate Zhao i sar. (2013), može se objasniti i činjenica da se kod nekih vrsta ili kultivara indukuje kaulogeneza, a kod drugih somatska embriogeneza, pod istim ili sličnim eksperimentalnim uslovima. U okviru ove disertacije je postignuta indirektna regeneracija pupoljaka iz odsečaka korenova šalota, kao kod vrsta *A. tuberosum* i *A. sativum* (Shuto i sar. 1993), dok je pod sličnim uslovima postignuta direktna regeneracija pupoljaka kod belog luka "White roppen" (Haque i sar., 1997). Osim toga, u ovoj disertaciji je sličnom kombinacijom RR iz apikalnih odsečaka korenova šalota indukovana proces kaulogeneze, dok je kod vlašca indukovana proces somatske embriogeneze.

5.1.5. Trajanje faze indukcije kalusa

Trajanje faze indukcije kalusa utiče na efikasnost regeneracije. Kratak tretman (jedna nedelja) indukcije kalusa je bio dovoljan za indukciju regeneracije iz apikalnih odsečaka korenova šalota, ali je pet nedelja bio optimalan period (Sl. 8). Dobijeno je u proseku $16,65 \pm 0,03$ pupoljaka po eksplantatu nakon dodatnih sedam nedelja na podlozi za indukciju regeneracije (ukupno 12 nedelja). Ovo je sasvim efikasna procedura, naročito ako se uzme u obzir i odgovor eksplantata od 100%. Haque i sar. (1997) su u svojim istraživanjima uspeli da dobiju više od 10 izdanaka po eksplantatu tokom dva meseca i pritom je postignuta učestalost regeneracije od 75%, dok su Shuto i sar. (1993) postigli i veću učestalost regeneracije (93-95%) kod tri kultivara *A. tuberosum* posle samo pet nedelja (srednji broj izdanaka po eksplantatu nije prikazan).

Međutim, skraćivanje vremena potrebnog za regeneraciju nije jedini razlog zbog kojeg se teži što kraćoj fazi indukcije kalusa. Prisustvo 2,4-D u podlozi može da izazove hromozomske aberacije. Novak (1980) je utvrdio da je kalus vrste *A. sativum* koji je rastao na podlozi sa 2,4-D duže od četiri meseca pokazao povećanje hromozomskih aberacija. Mukhopadhyay i sar. (2005) su utvrdili značajno povećanje aneuploidije u kalusu kod vrsta *A. sativum* i *A. cepa* tokom produženog gajenja na podlozi sa 9,05 μ M 2,4-D. Pojava aneuploidije je započinjala od trećeg pasaža, a učestalost se povećavala sa starošću kalusa kod obe vrste od 2,2 do 48,9%. Za efikasnu indukciju i proliferaciju kalusa i smanjenje verovatnoće pojave aberacije najčešće se vrši zamena 2,4-D posle uspešne indukcije kalusa nekim drugim auksinom tokom faze proliferacije kalusa (Myers i Simon, 1998; Yan i sar., 2009; Hailekidan i sar., 2013). Međutim, u literaturi nema dostupnih informacija da li je ovaj pristup pozitivno uticao na smanjenje učestalosti aberacija. Osim navedenog, kod *A. ampeloprasum* je uočeno smanjenje i potpuni gubitak regenerativnog potencijala eksplantata posle 12 odnosno 14 nedelja kultivacije na podlozi sa 4,5 μ M 2,4-D kod većine genotipova (Silvertand i sar., 1996).

5.1.6. Primena optimizovanog protokola na linije sa različitim regenerativnim potencijalom

Iz praktičnih razloga, uzimajući u obzir visoku genetičku varijabilnost, vrlo je dobro imati protokol koji odgovara većini genotipova, naročito pri održavanju velikih kolekcija (Barandiaran i sar., 1999b; Zheng i sar., 2003; Scotton i sar., 2013). U skladu sa tim, optimizovani protokol dobijen ispitivanjem efekta različitih faktora na regeneraciju linije 6 u okviru ove disertacije je povećao efikasnost regeneracije linija sa nižim regenerativnim potencijalom (Sl. 9). Međutim, i pored značajnog povećanja efikasnosti regeneracije, ove linije su i dalje imale značajno niži regenerativni potencijal od visoko regenerativnih linija, što potvrđuje zaključak da je genetički faktor najznačajniji faktor koji određuje efikasnost regeneracije. To znači da se optimizacijom uslova regeneracije regenerativni potencijal individualnih linija može povećati samo do neke mere, ali da je za njegovo dalje povećanje neophodna genetička promena, npr. ukrštanje sa visoko regenerativnim genotipom (Popelka i Altpeter, 2003; Marchionni Basté i sar., 2007; Anami i sar., 2010) ili genetička transformacija, tj. unošenje gena čiji produkti imaju esencijalnu ulogu u ranim fazama somatske embriogeneze i/ili

kaulogeneze, poput gena *BBM*, *WUS* ili *LEC2* (Boutilier i sar., 2002; Zuo i sar., 2002; Elhiti i sar., 2013).

Kod šalota su izbor superiorne linije i optimizacija protokola omogućili efikasnu indukciju kalusa (posle pet nedelja na podlozi za indukciju kalusa sa 5 μM 2,4-D i 5 μM BA) i regeneraciju pupoljaka (posle osam nedelja na podlozi za indukciju regeneracije sa 5 μM BA) sa učestalošću od 100% i prosečno 18,4 pupoljka po odsečku korena i KP indeksom 6,85. Za ožiljavanje 100% biljaka je bilo dovoljno gajenje pet nedelja (ili kraće) na podlozi bez RR, sa stopom aklimatizacije od čak 95%. To znači da je za oko 22 nedelje dobijeno je prosečno 17,5 aklimatizovanih biljaka po apikalnom odsečku korena početnog materijala.

U preliminarnim istraživanjima nije razvijen efikasan protokol za indukciju *de novo* regeneracije iz bazalnih odsečaka biljaka šalota, pa ovaj protokol nije dalje razvijan. Za sorte šalota Huruta i Minjar je razvijen protokol za indirektnu kaulogenezu/somatsku embriogenezu iz bazalnih odsečaka lukovica (Hailekidan i sar., 2013). Međutim, protokol nije bio naročito efikasan kada se uzme u obzir učestalost indukcije kalusa od 81%, regeneracije izdanaka od 84%, ožiljavanja od 87% i aklimatizacije od 60-67%, sa samo 3,5 pupoljka po eksplantatu za 16 nedelja.

5.1.7. Ožiljavanje i aklimatizacija biljaka

Vrste roda *Allium* gajene *in vitro* se generalno lako ožiljavaju i aklimatizuju (Haque i sar., 1997; Zheng i sar., 1998; Xu i sar., 2008; Alizadeh i sar., 2013). U skladu sa tim, u ovoj disertaciji je demonstrirano vrlo efikasno spontano ožiljavanje biljaka na podlozi bez RR tako da dodatni tretman za indukciju ožiljavanja nije bio neophodan; sve biljke su ožiljene i skoro sve su uspešno aklimatizovane na uslove *ex vitro* (Tab. 8). Interesantno, izdanci šalota indukovani iz bazalnih odsečaka bulbosa sorti Huruta i Minjar ne samo da nisu imali sposobnost spontanog ožiljavanja (0%), već je za njihovo ožiljavanje bila neophodna veća koncentracija auksina (7,39 μM IBA) i tada je samo 83-87% biljaka bilo ožiljeno (Hailekidan i sar., 2013). I aklimatizacija ovih biljaka je bila neefikasna, te se samo 60-67% biljaka prilagodilo uslovima u stakleniku (Hailekidan i sar., 2013). Osim toga, kod biljaka *A. giganteum*, regenerisanih iz ovarijuma direktnom kaulogenezom, je uočena dormancija izdanaka tokom faze

izduživanja i ožiljavanja, koja se ogledala u sporom rasteњу i neefikasnom ožiljavanju i kasnijoj aklimatizaciji biljaka (Šušek i sar., 2002).

5.2. Regeneracija *A. schoenoprasum*

5.2.1. Indukcija somatske embriogeneze iz odsečaka korenova

Kod *A. schoenoprasum* je do sada indukovana *de novo* regeneracija pupoljaka iz odsečaka listova sa učestalošću 1,8% i 1-5 pupoljaka po eksplantatu (Rauber i Grunewaldt, 1988). Za dalja istraživanja morfogeneze *in vitro* i primenu protokola u oplemenjivanju ove vrste potreban je značajno efikasniji sistem za regeneraciju. Za eksperimente u ovoj disertaciji su izabrani eksplantati odsečaka korenova. S obzirom da je već tokom ranih istraživanja zapažen značajan uticaj genotipa na regenerativni potencijal vlašca (Rauber i Grunewaldt, 1988), ali i na osnovu napred prikazanih detaljnih istraživanja na šalotu na kojima je potvrđen neprikosnoveni značaj genotipa na proces regeneracije, izvršena su preliminarna istraživanja i ustanovljena je visoka individualna varijabilnost regenerativnog potencijala. Za eksperimente u kojima je istraživani proces somatske embriogeneze izabrana je linija 3, koja je imala najveći embriogeni i rizogeni potencijal.

5.2.1.1. Indukcija kalusa

Kalusi formirani na odseccima korenova vlašca su postali uočljivi već posle dve nedelje, ali je njihova proliferacija bila vrlo spora, kao što je prethodno opisano kod *A. cepa* (Dunstan i Short, 1977), *A. sativum* (Myers i Simon, 1998, 1999; Robledo-Paz i sar., 2000; Fereol i sar., 2002) i *A. tuberosum* (Matsuda i Adachi, 1996). U ovoj disertaciji individualna variranja morfologije i teksture kalusa linija vlašca nisu detaljno studirana kao kod šalota, jer je eksperimentalni rad bio fokusiran na izabranu liniju 3. Međutim, čak i u okviru ove linije vlašca su uočena dva tipa kalusa: žuti, nodularni, kompaktni kalus (Sl. 12A) i bleđi, rastesiti kalus (Sl. 12B), ali je samo žuti, kompaktni kalus posedovao sposobnost da se transformiše u embriogeni kalus (Sl. 12C). Ista pojava je uočena i kod drugih vrsta roda *Allium*: *A. cepa* (Eady i sar., 1998; Zheng i sar., 1998), *A. sativum* (Fereol i sar., 2002), *A. ampeloprasum* (Hong i Debergh, 1995) i *A. tuberosum* (Matsuda i Adachi, 1996).

Od kada su Dunstan i Short (1977) formulisali novi mineralni BDS rastvor sa ciljem poboljšanja proliferacije kalusa *A. cepa*, većina istraživača je koristila taj mineralni rastvor za kultivaciju različitih vrsta roda *Allium* u uslovima *in vitro*. Međutim, u okviru ove disertacije nisu utvrđene značajne razlike u učestalosti formiranja kalusa na eksplantatima gajenim na podlozi sa BDS mineralnim rastvorom u poređenju sa standardno korišćenim MS mineralnim rastvorom. Tome slično, kod *A. cepa* nisu uočene značajne razlike u učestalosti indukcije kalusa iz zigotskih embriona gajenih na podlogama sa ova dva mineralna rastvora (Zheng i sar., 1998).

Za indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova vlašca u ovoj studiji je izabran 2,4-D na osnovu brojnih literaturnih podataka koji su pokazali njegovu superiornost u indukciji kalusa u odnosu na druge auksine (Nagasawa i Finer, 1988a; Myers i Simon, 1998; Luthar i Bohanec, 1999; Luciani i sar., 2006). 2,4-D je u najvećem broju studija korišćen za indukciju kalusa kod lukova (Shuto i sar., 1993; Haque i sar., 1997, 1998; Myers i Simon, 1998; Barandiaran i sar., 1999b; Robledo-Paz i sar., 2000; Zheng i sar., 2003; Martín-Urdíroz i sar., 2004; Scotton i sar., 2013). Samo u retkim studijama, pikloram je bio efikasniji u odnosu na 2,4-D, kao pri indukciji somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona *A. cepa* (Eady i sar., 1998). NAA je ili indukovao kalus koji kasnije nija imao sposobnost *de novo* regeneracije pupoljaka ili somatskih embriona (Nagasawa i Finer, 1988a) ili je njegov kalogeni potencijal bio inferioran u odnosu na 2,4-D (Haque i sar., 1997).

Kod vlašca, 2,4-D je kao jedini RR indukovao značajan kalogeni odgovor apikalnih odsečaka korenova (na oko 70% eksplantata u rasponu koncentracija 5-10 μM), ali taj kalus kasnije nije imao sposobnost regeneracije pupoljaka ili somatskih embriona. Kombinacija 2,4-D sa citokinima nije značajno povećala učestalost formiranja kalusa (do 80%, Sl. 11), ali je delovala odlučujuće na transformaciju žutog kompaktnog kalusa u segmentirani embriogeni kalus. Kombinacija 5 μM 2,4-D i 5-10 μM BA, Kin ili TDZ je bila efikasna za indukciju kalusa, mada je sposobnost tih kalusa da se transformišu u embriogeni kalus i regenerišu somatske embrione bila najveća pri koncentraciji citokinina od 10 μM . Za razliku od vlašca, 2,4-D je kao jedini RR mogao da indukuje kaulogeneze iz korenova šalota, ali je taj efekat bio vrlo slab, da bi dodatak citokinina značajno povećao kaulogeni potencijal eksplantata korenova

šalota. Nasuprot tome, 2,4-D je kao jedini RR indukovao vrlo visok kalogeni i kaulogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova *A. tuberosum* (Shuto i sar., 1993), dok je za indukciju kaulogenog kalusa *A. sativum* bio nedovoljan i bilo je neophodno kombinovati ga sa citokininom (Shuto i sar., 1993).

Na osnovu literaturnih podataka je uočena različita preferencija eksplantata lukova prema 2,4-D. U okviru ove disertacije je uočeno da je kod šalota niska koncentracija 2,4-D (1 μM) bila znatno efikasnija za indukciju kaulogenog kalusa kada je 2,4-D korišćen kao jedini RR. Međutim, kad je 2,4-D kombinovan sa BA, 5 μM 2,4-D je u kombinaciji sa 5 μM BA imao daleko veći kaulogeni potencijal. Podaci iz literature ukazuju da je najveća učestalost formiranja kalusa iz apikalnih odsečaka korenova i mladih listova kod *A. sativum* postignuta pri niskim koncentracijama 2,4-D (0,14-2,27 μM) (Barandiaran i sar., 1999c; Fereol i sar., 2002), kao i iz zrelih zigotskih embriona *A. ampeloprasmum* (Silevrtand i sar., 1996). Nasuprot tome, veće koncentracije 2,4-D (4,54 μM i 9,09 μM) su bile optimalne za indukciju kalusa iz zrelih zigotskih embriona *A. cepa* (Zheng i sar., 1998) odnosno bazalnih odsečaka biljaka *A. ampeloprasmum* (Hong i Debergh, 1995). Sveukupno, ovi podaci ukazuju da je za svaku biljnu vrstu, tip eksplantata i kombinaciju RR potrebno izvršiti optimizaciju uslova.

Efikasnost indukcije embriogenog kalusa iz odsečaka korenova vlašca se kretala od 4,3% do 45% i bila je nešto veća nego kod *A. sativum*, kod koga je samo do 20% kalusa bilo embriogeno (Myers i Simon, 1998; Fereol i sar., 2002; Luciani i sar., 2006). Proces regeneracije je bio prilično spor. Bilo je potrebno najmanje 7-8 nedelja za transformaciju žutog kompaktnog kalusa u segmentirani embriogeni kalus i indukciju somatskih embriona kao kod *A. tuberosum* (Matsuda i Adachi, 1996) i *A. sativum* (Fereol i sar., 2002). Ukupan proces regeneracije biljaka iz apikalnog regiona korena *A. sativum* je trajao najmanje šest meseci procesom indirektno somatske embriogeneze (Haque i sar., 1998) ili osam meseci procesom indirektno kaulogeneze (Myers i Simon, 1998). Globularni kalus slične strukture embriogenom kalusu vlašca je imao najveći regenerativni potencijal kod *A. ampeloprasmum* (Silvertand i sar., 1996).

5.2.1.2. Indukcija somatske embriogeneze

Izbor BDS ili MS mineralnog rastvora nije značajno uticao na učestalost formiranja embriogenog kalusa, kao ni na srednji broj somatskih embriona po regenerišućem kalusu. S obzirom na tu činjenicu, iz praktičnih razloga, u daljem radu u okviru ove doktorske disertacije je korišćen samo MS mineralni rastvor. Međutim, Zheng i sar. (1998) su utvrdili da je MS mineralni rastvor efikasnije delovao na regeneraciju izdanaka kod *A. cepa* nego BDS. Nasuprot tome, Luciani i sar. (2001) su utvrdili da je efikasnost mikropropagacije belog luka rasla sa povećanjem odnosa nitrata i amonijum jona u mineralnom rastvoru i da je BLM mineralni rastvor, sa povećanim nivoom NO_3^- u odnosu na BDS i najvećim odnosom NO_3^- i NH_4^+ , bio najefikasniji u indukciji regeneracije pupoljaka. Ove razlike se mogu objasniti različitim potrebama eksplantata za mineralnim materijama tokom različitih fizioloških procesa i na različitim stadijumima razvića.

Na osnovu rezultata dobijenih tokom istraživanja u okviru ove disertacije utvrđeno je da je 2,4-D neophodan za indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova vlašca, iako kalus vlašca indukovan na podlozi koja je sadržala 2,4-D kao jedini RR nije imao sposobnost regeneracije. Za proces regeneracije je, osim 2,4-D, bilo neophodno prisustvo citokinina (Sl. 13). Neke istraživačke grupe su takođe utvrdile da su citokinini neophodni za indukciju organogenog kalusa (Mohamed-Yasseen i sar., 1995; Hong i Debergh, 1995; Kim i Soh, 1996; Haque i sar., 1997; Luthar i Bohanec, 1999). Luthar i Bohanec (1999) su ustanovili da je prisustvo 8,89 μM BA u podlozi stimulisalo proces regeneracije pupoljaka iz neoprašenih cvetova i ovarijuma *A. cepa* i da je izostavljanje ili zamena BA sa 9,85 μM 2iP smanjilo efikasnost regeneracije, dok je 4,54 μM TDZ bio jednako efikasan. Mohamed-Yasseen i sar. (1995) i Zhang i sar. (2004) su takođe koristili BA za indukciju regeneracije kod *A. ampeloprasum*, odnosno *A. cepa*. Za razliku od toga, 2,4-D je bio dovoljan za indukciju somatske embriogeneze kod *A. sativum* (Haque i sar., 1998; Luciani i sar., 2006) i *A. ampeloprasum* (Hong i Debergh, 1995). Matsuda i Adachi (1996) su uočili da je koncentracija 2,4-D u podlozi za indukciju kalusa odlučujuće uticala na izbor i efikasnost morfogenog puta kod *A. tuberosum*. Niske koncentracije 2,4-D (0,905-2,26 μM) su pogodovale regeneraciji pupoljaka, dok je za indukciju somatske

embriogeneze bila potrebna visoka koncentracija 2,4-D (22,72 μM). Kod *A. sativum* je demonstrirana suprotna pojava (Haque i sar., 1998). Ove razlike još jednom ukazuju da se za svaku biljnu vrstu, čak i kultivar ili liniju, mora empirijski odrediti optimalna kombinacija RR.

5.2.1.3. Razviće i umnožavanje somatskih embriona i aklimatizacija biljaka

Jednom započet proces somatske embriogeneze kod *A. schoenoprasum* može biti nastavljen bez RR, ali je proces značajno efikasniji u prisustvu citokinina (Sl. 14). Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim kod *A. sativum*, čiji su somatski embrioni bili sposobni da regenerišu iz embriogenog kalusa bez prisustva RR, ali su se znatno kasnije diferencirali u odnosu na somatske embrione gajene u prisustvu 2,4-D/Kin pri koncentraciji 0,45/1,40 μM ili 0,45/2,33 μM (Fereol i sar., 2002). Druge istraživačke grupe su takođe utvrdile da su citokinini korisni za ovu fazu. Buiteveld i sar. (1993) su koristili 4,65 μM Kin kod *A. ampeloprasum*, Haque i sar. (1998) 5 μM Kin kod *A. sativum*, dok su Hong i Debergh (1995) koristili 9,8 μM 2iP za indukciju kompletnog razvića somatskih embriona kod *A. porrum*. Matsuda i Adachi (1996) su uz dodavanje 4,65 μM Kin i 2,89 μM GA₃ u podlogu za regeneraciju postigli povećanje učestalosti klijanja somatskih embriona i umnožavanje kod vrste *A. tuberosum*.

Iako je u okviru ove disertacije broj somatskih embriona po eksplantatu udvostručen u prisustvu 2,5-5 μM Kin u odnosu na eksplantate gajene na podlozi bez RR, a učestalost somatskih embriona sa dobro razvijenim apikalnim pupoljkom skoro utrostručena, Kin je inhibirao razviće korenovog sistema, pa je za dobijanje kompletnih regenerisanih biljaka sa dobro razvijenim korenovima bilo potrebno subkultivisati somatske embrione sa podloge koja sadrži Kin na ½MS podlogu bez RR (Sl. 16). Ovo je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Hong i Debergh (1995) i Zheng i sar. (1999). Zanimljivo je da je Kin u drugim eksperimentima u okviru ove disertacije stimulisao razviće korenovog sistema, npr. pri razviću pupoljaka indukovanih iz bazalnih odsečaka iste linije biljaka vlašca, pupoljci gajeni na podlozi sa Kin su formirali najbolje razvijen korenov sistem. Razlike u dobijenim rezultatima se mogu objasniti činjenicom da su u pitanju različite propagule, pupoljci i somatski embrioni, i

različiti fiziološki procesi, ožiljavanje izdanaka i klijanje i razviće somatskih embriona, te da na ove procese citokinini mogu različito uticati.

Kao što je ranije istaknuto, vrste roda *Allium* se lako aklimatizuju u stakleniku, sa stopom preživljanja blizu 100% (Mohamed-Yasseen i sar., 1995; Hong i Debergh, 1995; Zheng i sar., 1998; Xu i sar., 2008), što je potvrđeno i rezultatima u ovoj disertaciji i rezultatima Rauber i Grunewaldt (1988) na vlašcu.

Za razliku od šalota, proces somatske embriogeneze iz apikalnog regiona korena vlašca nije bio tako efikasan. Kalus je indukovao iz najviše 79% apikalnih odsečaka korenova vlašca, od kojih je najviše 45% prešlo u embriogeni kalus sa 19,53 somatskih embriona po eksplantatu posle 16 nedelja od početka tretmana. Uzimajući u obzir da je za razviće somatskih embriona potrebno još osam nedelja (četiri nedelje na podlozi sa Kin za razviće apikalnog pupoljka, i četiri nedelje na podlozi bez RR za razviće korenovog sistema) za dobijanje aklimatizovanih biljaka je bilo potrebno 28 nedelja. Osim toga, samo oko 70% somatskih embriona je razvilo apikalni pupoljak.

5.2.2. Indukcija kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum*

Kao što je već pokazano kod šalota, ali i drugih lukova, veoma efikasnu direktnu kaulogenezu i indirektnu somatsku embriogenezu moguće je indukovati iz apikalnih odsečaka korenova (Haque i sar., 1997, 1998). Međutim, Luciani i sar. (2006) su u uporednoj studiji utvrdili da apikalni odsecci korenova i nezrele cvasti *A. sativum* poseduju niži regenerativni potencijal nego meristemi i bazalna ploča. S ciljem daljeg poboljšanja efikasnosti sistema za regeneraciju vlašca u uslovima *in vitro*, razvijen je protokol za indukciju *de novo* regeneracije iz eksplantata bazalne ploče.

Rezultati ove disertacije su potvrdili da je bazalni odsečak biljke vlašca koji sadrži SAM jedini eksplantat koji odgovara na indukcionu tretman formiranjem pupoljaka (Sl.18). Kod *A. cepa*, *A. wallichii* i *A. ampeloprasum* SAM mora biti oštećen, da bi se prekinula apikalna dominacija (Kahane i sar., 1992; Wawrosch i sar., 2001; Mohamed-Yasseen i sar., 1994, 1995), ali da bi eksplantat *A. cepa* imao dobar regenerativni potencijal neophodno je da sadrži deo SAM. Samo eksplantati koji uključuju najmanje dva lisna rukavca su sposobni da regenerišu, sve dok su među prva

četiri lisna rukavca (Kahane i sar., 1992). Kod vrste *A. cepa de novo* inicijacija pupoljaka se dešava direktno iz prvog sloja parenhimatičnih ćelija na abaksijalnoj strani osnove lisnog rukavca (Kahane i sar., 1992). Eksplantat koji najbolje odgovara kod roda *Allium* je deo bazalne ploče na nivou osnove lisnog rukavca, kao što je demonstrirano kod vlašca u okviru ove doktorske disertacije (Sl. 19). U skladu sa tim Ayabe i Sumi (1998) su opisali direktnu regeneraciju izdanaka *A. sativum* iz struktura oblika kupole, koje su formirane iz bazalne ploče između osnove listova, a i Kenel i sar. (2010) su utvrdili da nezreli listovi *A. sativum* koji se nalaze neposredno iznad bazalne ploče imaju visok kaulogeni potencijal.

Citokinini su vrlo retko korišćeni kao jedini RR za indukcije *de novo* regeneracije kod lukova. Ipak, za indukciju regeneracije iz bazalnog odsečka biljaka *A. cepa* citokinini su bili neophodni (Kahane i sar., 1992), kao što je demonstrirano i u ovoj disertaciji. Za razliku od toga, bazalni odsečki *A. ampeloprasum* i *A. sativum* su spontano regenerisali pupoljke na podlozi bez RR (Mohamed-Yasseen i sar., 1994; 1995; Ayabe i Sumi, 1998). Međutim, rezultati ove disertacije su pokazali da citokinini koji pripadaju istoj strukturalnoj grupi ne moraju obavezno da imaju isti uticaj na proces regeneracije. Nasuprot derivatima feniluree, koji su imali sličan uticaj na indukciju *de novo* regeneracije pupoljaka vlašca, derivati adenina sa aromatičnim bočnim lancem su imali značajno različit uticaj na ovaj proces. BA i *mT* su bili tek neznatno manje efikasni nego TDZ i njihov uticaj je uporediv sa CPPU. Međutim, Kin je imao vrlo nizak potencijal za indukciju kaulogeneze, mnogo sličniji ZEA, derivatu adenina sa izoprenoidnim bočnim lancem, nego BA i *mT* koji spadaju u istu grupu citokinina. Za razliku od rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, BA i Kin su indukovali sličan broj pupoljaka (do 25, odnosno do 22) iz bazalnih odsečaka biljaka *A. cepa* u širokom opsegu koncentracija 5-50 μM (Kahane i sar., 1992). Međutim, BA je bio najefikasniji u rasponu od 5-25 μM , dok je Kin bio najefikasniji u rasponu od 10-50 μM . Slično rezultatima ove disertacije, Kin je indukovao vrlo nizak kaulogeni odgovor *Barleria greenii* (Amoo i sar., 2011). U skladu sa izloženim činjenicama, efikasnost citokinina se ne može predvideti na osnovu njihove hemijske strukture, pa se njihov uticaj na indukciju *de novo* regeneracije mora empirijski utvrditi.

Egzogeno primenjeni citokinini mogu biti metabolizovani u različita jedinjenja, zavisno od mnogobrojnih faktora, kao što su biljna vrsta, stadijum razvića i tip eksplantata (Aremu i sar., 2012b). Biljna tkiva različito usvajaju i metabolizuju citokinine, a produkti njihovog metabolizma utiču na nivo endogenih hormona (Auer i sar., 1992a; Van Staden i Crouch, 1996; Bairu i sar., 2011; Motte i sar., 2013). Egzogeno primenjeni derivati feniluree i aromatični citokinini (npr. BA ili Kin) indukuju akumulaciju endogenih izoprenoidnih citokinina, pre svega 2iP i ZEA i njegovih derivata (Vankova i sar., 1991), i indukuju aktivnost citokinin oksidaze, koja vrši ireverzibilnu degradaciju citokinina (Motyka i Kamínek, 1990; Kamínek i sar., 1997). Osim toga, i brzina kojom egzogeni citokinini indukuju promenu nivoa endogenih citokinina je značajna. Fenil-adenin u nižim koncentracijama efikasnije indukuje kaulogenezu iz korenova *A. thaliana* u odnosu na 2iP, jer značajno narušava homeostazu citokinina indukujući akumulaciju endogenih citokinina, pošto je potentan inhibitor citokinin oksidaze/dehidrogenaze (Motte i sar., 2013). Kod dve linije *Petunia hybrida*, čiji su listovi imali različit kaulogeni potencijal pod uticajem BA, je pokazano da je linija sa većim regenerativnim potencijalom i kraćim periodom indukcije pupoljaka u većoj meri apsorbavala BA iz podloge, koji je zatim izazvao povećanje nivoa izoprenoidnih citokinina i aktivnosti citokinin oksidaze (Auer i sar., 1992a, b, 1999). Kod linije sa niskim regenerativnim potencijalom nizak nivo usvajanja BA i njegova brza konverzija u neaktivne N-glikozide su verovatno bili uzrok izostanka akumulacije endogenih izoprenoidnih citokinina i slabog kaulogenog odgovora (Auer i sar., 1992a, b).

Kultivari iste vrste se često razlikuju u potrebama za citokininima tokom indukcije kaulogeneze, kao što je uočeno kod jabuke (Magyar-Tábori i sar., 2010). Kod nekih kultivara jabuke TDZ je bio superiorniji u poređenju sa BA, dok je kod drugih bilo obrnuto. Osim toga, optimalne koncentracije primenjenih citokinina za indukciju regeneracije su se značajno razlikovale među kultivarima (Magyar-Tábori i sar., 2010).

U ovoj disertaciji TDZ se izdvojio kao superiorni RR za indukciju kaulogeneze iz bazalnog odsečka biljaka vlašca (Sl. 20). Kao što je već naglašeno, TDZ je efikasna zamena za auksine i citokinine (Visser i sar., 1992). To nije iznenađujuće, jer ovaj RR pozitivno utiče na metabolizam endogenih auksina i citokinina (Hare i sar., 1994;

Hutchinson i sar., 1996; Hutchinson i Saxena, 1996; Victor i sar., 1999; Murch i Saxena, 2001; Jones i sar., 2007) i takođe ima sopstvenu biološku aktivnost (Casanova i sar., 2004). Štaviše, TDZ je manje podložan enzimskoj degradaciji i samim tim postojaniji nego derivati adenina. Za razliku od TDZ, citokinin oksidaza/dehidrogenaza ima visok afinitet prema 2iP i ZEA, te ih brzo degradira, što je najverovatnije objašnjenje njihove slabije aktivnosti u odnosu na druge citokinine (Chatfield i Armstrong, 1988). Ovaj enzim ima vrlo nizak afinitet prema BA (Auer i sar., 1999). Díaz-Vivancos i sar. (2011) su utvrdili da BA efikasnije indukuje kaulogenezu kod vrste *Crocus sativus* u poređenju sa TDZ i 2iP.

Za razliku od lukova, kod nekih monokotila citokinini inhibiraju somatsku embriogenezu. Kod *Dactylis glomerata* je uočeno da rekalcitrantni genotipovi imaju viši nivo endogenih citokinina i da se proces somatske embriogeneze kod genotipova sa visokim regenerativnim potencijalom može inhibirati 0,001 μM ZEA (Wenck i sar., 1988).

U ovom istraživanju, prvi pupoljci su uočeni na eksplantatima petog dana kultivacije na podlozi sa TDZ, dok su na eksplantatima kultivisanim na podlogama sa drugim citokininima pupoljci kasnije uočeni. Shodno tome, brzo delovanje TDZ je uočeno i kod drugih biljnih vrsta. Kod geranijuma, dva dana gajenja segmenata hipokotila na podlozi sa TDZ je bilo dovoljno da indukuje formiranje somatskih embriona, koji su bili vidljivi posle 12 dana (Visser i sar., 1992). Kod paradajza, TDZ je pokrenuo kaulogeni odgovor 10. dana kultivacije i delovao je mnogo brže nego drugi RR (Torelli i sar., 2006).

Nešto slabiji odgovor je dobijen u okviru ove disertacije kod eksplantata gajenih na podlozi sa 10 μM *mT* u odnosu na one gajene na 10 μM TDZ. Izuzev ove koncentracije, *mT* je bio približno efikasan kao BA i CPPU (Sl. 20). Nasuprot tome, u literaturi postoji veliki broj podataka da su topolini vrlo efikasni citokinini za indukciju regeneracije velikog broja biljnih vrsta i da su najčešće efikasniji od BA i drugih citokinina, npr. kod banane (Aremu i sar., 2012a), *Aloe polyphylla* (Bairu i sar., 2007), *Huernia hystrix* (Amoo i Van Staden, 2013), *Ulmus glabra* (Malá i sar., 2013) i *Pelargonium sidoides* (Moyo i sar., 2012).

5.2.2.1. Uticaj tipa citokinina na rasteenje biljaka

Kada se u potpunosti sagledaju svi parametri rasteenja (dužina najdužeg izdanka i korena, učestalost formiranja korenova i broj korenova po eksplantatu) na podlozi sa Kin dobijene su biljke sa superiornim parametrima. Osim toga, 1 μM *mT* je indukovao pojavu najdužih izdanaka, ali je bio neefikasan u ožiljavanju, slično kao BA, TDZ i CPPU (Sl. 21). Ovaj rezultat je u suprotnosti sa brojnim podacima iz literature, prema kojima je *mT* imao značajno bolji efekat na ožiljavanje biljaka u odnosu na BA (Werbrouck i sar., 1996; Magyar-Tábori i sar., 2010). Ostali citokinini su slično uticali na rasteenje biljaka. Štaviše, biljke dobijene na svim tretmanima su uglavnom bile normalne po izgledu i hiperhidriranost se samo povremeno javljala kod izdanaka koji su dobijeni iz eksplantata gajenih na podlozi sa najvećom koncentracijom citokinina, tako da ovaj parametar nije detaljnije studiran.

U suprotnosti sa rezultatima ove disertacije, TDZ i BA su prouzrokovali hiperhidriranost kod izdanaka jabuke (Dobránszki i sar., 2002). Međutim, pretretman eksplantata na podlozi sa topolinima u trajanju od tri nedelje je značajno smanjio stepen hiperhidriranosti kod izdanaka jabuke indukovanih na podlozi sa TDZ ili BA (Dobránszki i sar., 2002). Proces starenja, koji se javlja kod izdanaka *Ulmus glabra* tretiranih BA, je kompletno rešen njegovom zamenom *mT* (Malá i sar., 2013). Visok stepen malformacija je uočen kod izdanaka vrste *Barleria greenii* gajenih na podlozi sa BA (Amoo i sar., 2011). U suprotnosti sa tim, utvrđeno je da nema značajne razlike između biljaka banane tretiranih BA i topolinima (Bairu i sar., 2008).

5.2.2.2. Optimizacija protokola za regeneraciju

U ovoj disertaciji je dobijen nizak kaulogeni odgovor TCL preseka, koji je verovatno posledica povrede tkiva tokom izolacije. Ova činjenica dodatno ukazuje da je samo mali bazalni deo biljke vlašca kompetentan za *de novo* regeneraciju, jer je mogao biti razoren presecima debljine 0,5 mm. Osim toga, ovo zapažanje objašnjava i činjenicu da su samo preseki biljaka koji sadrže SAM imali regenerativni potencijal, pošto je SAM u zoni eksplantata koja ima najveći regenerativni potencijal. U suprotnosti sa ovim rezultatima, TCL eksplantati su uspešno korišćeni kod mnogih biljnih vrsta koje se teško razmnožavaju klasičnim metodama kulture tkiva, kao orhideje

(Teixeira da Silva, 2013) ili za inicijaciju regeneracije iz nejuvenilnog tkiva, kao kod vrste *Citrus sinensis* (Kobayashi i sar., 2003). Kod vrsta koje inače imaju visok regenerativni potencijal, TCL tehnika se koristi za ubrzanje i dodatno povećanje efikasnosti procesa regeneracije, kao kod uljane repice (Ghnaya i sar., 2008).

Neki citokinini, naročito TDZ imaju produženo dejstvo, koje se nastavlja i nakon isključenja ovog RR. Ponekad je ovaj uticaj odgovoran za smanjenje učestalosti ožiljavanja i slabu aklimatizaciju biljaka u stakleniku, tako da trajanje tretmana treba da bude što je kraće moguće (Makara i sar., 2010). U ovoj disertaciji je demonstrirano da je gajenje eksplantata na podlozi sa 10 μ M TDZ tokom četiri nedelje dovoljno za efikasnu indukciju procesa kaulogeneze.

Biljke dobijene tokom ovog istraživanja su vrlo pogodne da se dalje koriste kao donor materijal za nove cikluse regeneracije kao što je predloženo i kod vrste *A. cepa* (Kahane i sar., 1992).

Regeneracija pupoljaka iz bazalne ploče vlašca je bila znatno efikasnija i brža nego regeneracija somatskih embriona iz apikalnih odsečaka korenova vlašca. Kaulogeni potencijal eksplantata bazalne ploče izloženih najefikasnijem tretmanu je iznosio 7,0 (Sl. 20C), dok je embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova izloženih najefikasnijem tretmanu iznosio 3,24 (Sl. 13C). Za regeneraciju kompletnih biljčica kompetentnih za aklimatizaciju je bilo potrebno osam nedelja kada je regeneracija indukovana iz bazalne ploče i 24 nedelje kada je regeneracija indukovana iz apikalnih odsečaka korenova. Zanimljivo je da su i embriogeni potencijal kalusa indukovanih na apikalnim odsečcima korenova (Sl. 13C) i kaulogeni potencijal bazalne ploče (Sl. 20C) bili najveći u prisustvu 10 μ M TDZ. Osim toga, morfogogenetski putevi indukovani iz odsečaka korenova i bazalne ploče vlašca su se razlikovali. Iz prvih eksplantata je indukovana indirektna somatska embriogeneza, a iz drugih direktna kaulogeneza. Bez obzira što se somatska embriogeneza smatra superiornim vidom regeneracije *in vitro*, proces kaulogeneze kod lukova je vrlo efikasan način za mikropropagaciju s obzirom na sposobnost spontanog ožiljavanja izdanaka, tako da dodatne manipulacije i tretman za indukciju ožiljavanja nisu potrebni. S druge strane, korišćenje apikalnih odsečaka korenova je opravdano zbog stalne produkcije i

dostupnosti korenova biljaka gajenih *in vitro* tokom cele godine i smanjenju gubitaka primarnih eksplantata usled kontaminacije.

Zanimljivo je da je ista linija vlašca dala bolji rezultat za regeneraciju iz bazalne ploče nego iz korenova, ali da je regenerativni potencijal ipak bio relativno sličan. Na osnovu ovog zapažanja i saznanja o genetičkoj osnovi determinacije kaulogenog potencijala (Motte i sar., 2014) može se pretpostaviti da bi jedinke genotipa koji je pokazao visok regenerativni potencijal iz jednog tipa eksplantata efikasno regenerisale i iz drugih tipova eksplantata, ali ostaje da se ova teza detaljnije elaborira u budućem radu.

5.3. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema tokom regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum*

Za analizu korelacije između procesa *de novo* regeneracije pupoljaka/somatskih embriona, aktivnosti antioksidativnih sistema i produkcije H₂O₂ je izabran proces direktne kaulogeneze iz bazalnih odsečaka vlašca, koji je predstavljao najbrži proces regeneracije dobijen u ovoj disertaciji i kod koga su dobijene najveće razlike u regenerativnom odgovoru između efikasnih i neefikasnih tretmana.

U ovom radu je demonstrirana jasna korelacija između povećane aktivnosti antioksidativnog sistema i potencijala eksplantata za regeneraciju pupoljaka. U svim eksplantatima podvrgnutim dejstvu citokinina je detektovana povećana aktivnost sva tri testirana enzima (POD, CAT i SOD) u odnosu na eksplantate gajene na podlozi bez RR, što ukazuje da stanje stresa biljnog tkiva pogoduje pokretanju procesa regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca (Sl. 30-32). To je u skladu sa prihvaćenim stavom da ROS mogu funkcionisati kao komponenta kompleksne mreže transdukcije signala, koja može dovesti do reprogramiranja razvića (Barba-Espín i sar., 2011; Smékalová i sar., 2014). Ovu pretpostavku podržava i činjenica da se aktivnost svih analiziranih antioksidativnih enzima menjala brže u eksplantatima gajenim u prisustvu 10 µM TDZ, koji su imali najveći kaulogeni potencijal, nego u eksplantatima gajenim na podlozi koja je sadržala 1 µM Kin, koji su imali najniži regenerativni potencijal. Ovaj efekat TDZ je u skladu sa podacima iz literature, koji ukazuju da on indukuje ekspresiju gena povezanih sa stanjem stresa (Zhang i sar., 2006) i dovodi do

akumulacije jedinjenja koja nastaju pod stresnim uslovima (Murch i sar., 1997). Međutim, iako ima hemijsku strukturu koja odstupa od strukture ostalih citokinina, TDZ nije jedini citokinin koji utiče na aktivnost antioksidativnog sistema. Kod *Crocus sativus*, BA i 2iP su, pored TDZ, stimulisali aktivnost POD tokom umnožavanja meristema (Díaz-Vivancos i sar., 2011), a u listovima pšenice je detektovana povećana aktivnost CAT i POD pod uticajem BA (Zavaleta-Mancera i sar., 2007). Kod transformisanih biljaka duvana, povećan nivo citokinina, izazvan prekomernom ekspresijom *ipt* gena, je bio u korelaciji sa povećanjem aktivnosti POD (Synková i sar., 2004; Schnablová i sar., 2006).

U eksplantatima gajenim na podlozi sa 10 μ M TDZ, posle tri ili više dana tretmana detektovana je specifična POD izoforma koje u ostalim eksplantatima nije bilo (Sl. 30). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatom Pasternak i sar. (2002), koji su pokazali povećanu aktivnost POD tokom početne faze regeneracije somatskih embriona iz protoplasta lucerke. Prisustvo izoformi enzima antioksidativnog sistema specifičnih za određeni morfogenetski proces je uočeno i kod drugih biljnih vrsta. Kod *Albizia odoratissima* je detektovana aktivnost specifične izoforme POD samo kod eksplantata koji su imali kaulogeni potencijal i čija je aktivnost koincidirala sa pojavom pupoljaka (Rajeswari i Paliwal, 2008). U kulturi kalusa vrste *Panax ginseng* je uočena korelacija između povećane aktivnosti POD i sposobnosti kalusa da formiraju pupoljke (Bonfill i sar., 2003). Tome slično, kod *Mesembryanthemum crystallinum* i *Centaurium erythraea* su detektovane specifične izoforme Mn-SOD samo pod uslovima povoljnim za indirektnu, odnosno direktnu kaulogenezu (Libik i sar., 2005; Filipović i sar., 2015), dok je kod *C. erythraea* detektovana i specifična izoforma CAT (Filipović i sar., 2015). Specifične izoforme antioksidativnih enzima se mogu koristiti kao markeri za diferencijaciju (Racchi i Terragna, 1993).

POD imaju značajnu ulogu u kontroli mnogih fizioloških procesa, npr. razvića korena (Dunand i sar., 2007). POD koje se značajno eksprimiraju na granici između zone deobe i zone izduživanja ćelija korena utiču na redoks status u ćelijama i prestanak ćelijskih deoba. Transkripcioni faktor UPBEAT1 (UPB1), koji reguliše ovaj proces, tu funkciju vrši represijom gena za specifičnu POD (Tsukagoshi i sar., 2010). Povećanje aktivnosti POD je detektovano kod protoplasta koji se dele, nasuprot protoplastima koji

nemaju tu sposobnost (De Marco i Roubelakis-Angelakis, 1996; Xu i sar., 2013). Osim toga, reprogramirana ekspresija gena koji kodiraju POD tokom procesa ćelijske dediferencijacije i kasnije rediferencijacije ukazuje na njihovu značajnu ulogu u morfogenezi (Che i sar., 2006). Pozitivna korelacija između aktivnosti POD i rastenja biljaka takođe je uočena kod graška (Barba-Espin i sar., 2010; Díaz-Vivancos i sar., 2010), duvana i hibridne jasike (Kawaoka i sar., 2003).

Kao što je već rečeno, veliki broj podataka iz literature ukazuje na pozitivnu korelaciju između morfogenetskih odgovora i promena aktivnosti enzima antioksidativnog sistema. Predloženo je da jačina oksidativnog stresa i efikasnost antioksidativnog sistema određuju sudbinu ćelije. Dok stanje oksidativnog stresa izaziva ireverzibilna oštećenja, gubitak regenerativnog kapaciteta i ćelijsku smrt (Siminis i sar., 1993; Papadakis i sar., 2001; Xu i sar., 2013), ROS pri niskim koncentracijama deluju kao signalni molekuli koji mogu da pokrenu morfogenetski odgovor biljnog tkiva (De Marco i Roubelakis-Angelakis, 1996; Gechev i Hille, 2005). Takođe je predloženo da rekalcitrantnost i gubitak regenerativne sposobnosti biljnog materijala usled starenja mogu biti povezani sa nastankom ROS i pojavom oksidativnog stresa tokom kultivacije u uslovima *in vitro* (Benson, 2000), tako da kontrolisan nastanak ROS može biti od ključne važnosti za rastenje i diferencijaciju ćelija (Petrivalský i sar., 2012). Međutim, nije odlučujuća samo koncentracija ROS, već i njegoova lokalizacija može biti presudna za odgovor biljaka (De Marco i Roubelakis-Angelakis, 1996; Gapper i Dolan 2006). Detekcija H₂O₂ posredstvom DAB u biljnim organima omogućava da se odrede mesta odigravanja reakcija izazvanih različitim stresnim uslovima za biljku. Nekada su te reakcije posledica povređivanja biljnih organa (Orozco-Cárdenas i sar., 2001; Liu i sar., 2014), a nekada su izazvane prisustvom teških metala u podlozi (Jonak i sar., 2004). Zahvaljući ovoj metodi Libik-Konieczny i sar. (2015) su ustanovili lokaciju mitotičke aktivnosti ćelija koje pripadaju vaskularnom tkivu centralnog cilindra hipokotila vrste *Mesembryanthemum crystallinum*. Rezultat ovih deoba u kulturi *in vitro* je proces rizogeneze. Time je potvrđeno da H₂O₂ kao jedan od glavnih ROS učestvuje u procesima rastenja i razvića biljaka. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u istraživanjima u okviru ove disertacije, u kojima je prisustvo H₂O₂ detektovano upravo na delovima eksplantata iz kojih započinje regeneracija pupoljaka (Sl. 35). Sve ovo

navodi na ideju da ROS mogu da predstavljaju markere za identifikaciju ćelija sposobnih da indukuju regeneraciju (Libik-Konieczny i sar., 2015).

Uprkos brojnim publikacijama uloga oksidativnog stresa u pokretanju procesa morfogeneze je još uvek nejasna i u mnogim slučajevima kontradiktorna. Ne postoji opšti model kojim se mogu objasniti svi eksperimentalni podaci. Povećane aktivnosti POD, CAT i SOD su detektovane u regenerišućem kalusu, u odnosu na kalus koji nema sposobnost regeneracije (Subhashini Devi i sar., 2013). Brojne studije su utvrdile povećanje aktivnosti POD i CAT i smanjenje aktivnosti SOD tokom kaulogeneze, kao što je opisano kod *Tacitus belus* (Mitrović i sar., 2012), *Anethum graveolens* (Jana i Shekhawat, 2012) i *Crocus sativus* (Vatankhah i sar., 2010). Međutim, u mnogim studijama su dobijeni suprotni rezultati. Tokom direktne kaulogeneze indukovane iz zrelih zigotskih embriona kod vrste *Pinus strobus*, detektovano je smanjenje aktivnosti POD i CAT (Tang i Newton, 2005), dok je povećanje aktivnosti CAT i SOD zabeleženo na početnim stadijumima somatske embriogeneze *Crocus sativus* (Blazquez i sar., 2009).

Paralelni sistemi koji omogućavaju usmeravanje procesa regeneracije ka somatskoj embriogenezi ili kaulogenezi iz istog eksplantata jednostavnom manipulacijom RR su veoma korisni za razumevanje uloge ROS u indukciji regeneracije, kao kod gladiole i kičice (Dutta Gupta i Datta 2003/4; Filipović i sar., 2015). Kod gladiole, proces somatske embriogeneze je bio povezan sa postepenim povećanjem aktivnosti SOD i smanjenjem aktivnosti CAT i POD, dok je promena aktivnosti ovih enzima bila suprotna tokom procesa organogeneze (Dutta Gupta i Datta 2003/4). Osim toga, egzogeno primenjeni antioksidansi (GSH, α -tokoferol i askorbat) su inhibirali somatsku embriogenezu i stimulisali organogenezu, dok je primena H₂O₂ stimulisala somatsku embriogenezu i inhibirala organogenezu pupoljaka (Dutta Gupta i Datta 2003/4).

Izuzetno je ilustrativan i primer indukcije morfogeneze iz listova kičice, u kome je pokazana još veća plastičnost u kanalisanju različitih morfogenetskih procesa (direktne i indirektne kaulogeneze, rizogeneze i somatske embriogeneze) i aktivnosti enzima antioksidativnog sistema pod uticajem RR (auksina i citokinina) i svetlosti (Filipović i sar., 2015). Ukupna aktivnost SOD i CAT je bila najveća odmah nakon

pripreme eskplantata za indukciju regeneracije (odseći listova), dok je ukupna aktivnost POD tada bila značajno manja u poređenju sa intaktnim listovima. Tokom indukcije morfogeneze je došlo do smanjenja aktivnosti CAT, dok se aktivnost POD povećala tokom svih primenjenih tretmana. Aktivnost Cu/Zn-SOD je postepeno opadala tokom kultivacije na induktivnim tretmanima na svetlosti (Filipović i sar., 2015).

Gore navedene činjenice ukazuju da antioksidativni tretmani omogućavaju kontrolu nastanka slobodnih radikala u cilju indukcije morfogeneze. U skladu sa tim, obrazac aktivnosti antioksidativnih enzima dobijen u ovoj disertaciji može da se koristi za procenu efikasnosti protokola za indukciju regeneracije pupoljaka iz bazalnih odsečaka biljaka *A. schoenoprasum*.

6. ZAKLJUČCI

- ✓ U ovoj disertaciji su razvijeni efikasni i pouzdani protokoli za indukciju regeneracije pupoljaka/somatskih embriona kod šalota i vlašca i definisani su najvažniji faktori koji utiču na efikasnost procesa regeneracije.
- ✓ Odsecci korenova obe vrste imaju značajan regenerativni potencijal i mogu se koristiti za efikasnu indukciju regeneracije pupoljaka ili somatskih embriona.
- ✓ Samo apikalni deo korena obe vrste ima regenerativni potencijal pod testiranim eksperimentalnim uslovima.
- ✓ Genotip statistički značajno utiče na regenerativni potencijal kod obe vrste. Kod šalota, kod koga je ova pojava detaljno studirana, uočeno je izrazito variranje učestalosti regeneracije testiranih individua (linija) (0,93-100%) i broja pupoljaka po eksplantatu (od vrednosti manje od 1 do 20,7).
- ✓ Od 30 testiranih linija šalota izdvojila se linija 6, čija se superiornost ogleda u posedovanju najvećeg kaulogenog i rizogenog potencijala, kao i u brzom regenerativnom odgovoru.
- ✓ Na kaulogeni potencijal korenova jedinki šalota linije 6 statistički značajno utiču: svetlost, odnos 2,4-D/BA u podlozi i trajanje faze indukcije kalusa.
- ✓ Protokol optimizovan za regeneraciju pupoljaka iz apikalnih odsečaka korenova jedinki linije 6 uključuje pet nedelja na podlozi za indukciju kalusa sa $5 \mu\text{M}$ 2,4-D + $5 \mu\text{M}$ BA, zatim osam nedelja na podlozi za indukciju regeneracije sa $5 \mu\text{M}$ BA pri PPFD od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tokom obe faze.
- ✓ Primenom optimizovanog protokola moguće je regenerisati prosečno 18,4 biljke po eksplantatu, koje su posle 18 nedelja spremne za aklimatizaciju.
- ✓ Primenom protokola koji je optimizovan za regeneraciju pupoljaka iz apikalnih odsečaka korenova jedinki šalota linije 6 postignuto je značajno povećanje regenerativnog potencijala kod jedinki odabranih linija sa niskim regenerativnim potencijalom, ali je on i dalje bio statistički značajno niži nego kod jedinki linije 6, čime je potvrđen snažan uticaj genotipa na proces organogeneze.

- ✓ Stopa preživljavanja biljaka šalota posle četiri nedelje aklimatizacije u stakleniku je bila visoka (80-94,7%).
- ✓ Apikalni odsečki korenova biljaka vlašca su regenerisali somatske embrione procesom indirektno somatske embriogeneze. Za eksperimente je izabrana linija 3, koja je u preliminarnim istraživanjima pokazala superiorni regenerativni potencijal.
- ✓ Za indukciju embriogenog kalusa iz apikalnih odsečaka korenova vlašca neophodno je prisustvo 2,4-D i citokinina.
- ✓ Na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova vlašca statistički značajno utiče tip i koncentracija citokinina, dok tip mineralnog rastvora ne utiče na ovu veličinu.
- ✓ Embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova vlašca je bio najveći kada je kalus indukovan na podlozi sa 5 μ M 2,4-D i 10 μ M BA ili TDZ.
- ✓ Dobijeni somatski embrioni vlašca se značajno bolje razvijaju i umnožavaju na podlozi sa Kin nego na podlozi bez RR, mada je za razviće dobrog korenovog sistema poželjno kratko gajenje biljaka na podlozi bez RR.
- ✓ Posle mesec dana aklimatizacije stopa preživljavanja biljaka je bila izuzetno visoka, čak 96,07%. Nakon tri meseca aklimatizacije došlo je do umnožavanja biljaka, tako da je broj biljaka uvećan za 57,1% u odnosu na broj posađenih biljaka.
- ✓ Iako efikasan, proces regeneracije iz apikalnih odsečaka korenova vlašca je dugotrajan proces. Za indukciju regeneracije i razviće somatskih embriona u biljke spremne za aklimatizaciju su potrebne 24 nedelje.
- ✓ Proces kaulogeneze iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca se pokazao kao efikasniji i brži sistem za regeneraciju ove vrste.
- ✓ Adventivni pupoljci su se formirali samo iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca koji su sadržali SAM.

- ✓ Adventivni pupoljci ne regenerišu spontano iz bazalnih odsečaka biljaka vlašca. Za njihovu indukciju je neophodno prisustvo citokinina.
- ✓ Skenirajućom elektronskom mikroskopijom i histološkom analizom je utvrđeno da adventivni pupoljci regenerišu iz bazalnih delova listova, kao i iz merstemoida iz površinskih slojeva bazalne ploče.
- ✓ Od testiranih citokinina (BA, Kin, ZEA, *mT*, CPPU i TDZ), 10 μM TDZ je indukovao najveći, a Kin i ZEA najmanji kaulogeni odgovor eksplantata.
- ✓ Tip i koncentracija citokinina su značajno uticali na sve parametre rastenja (dužinu najdužeg izdanka i korena, učestalost formiranja korenova i broj korenova po eksplantatu). Najduži izdanak su formirale biljke dobijene iz eksplantata kultivisanih na podlozi sa 1 μM *mT*, dok su najbolji korenov sistem formirale biljke dobijene iz eksplantata kultivisanih na 5 μM Kin.
- ✓ Debljina preseka je značajno uticala na kaulogeni potencijal bazalnih odsečaka biljaka vlašca. Najveći regenerativni potencijal su imali bazalni odsecci biljaka vlašca debljine 5 mm, a biljke koje su regenerisale iz ovih eksplantata su imale najbolje morfološke parametre.
- ✓ Optimizovan protokol je pokazao da je za efikasno rastenje regenerisanih biljaka neophodna zamena podloge sa 10 μM TDZ podlogom sa 5 μM Kin posle četiri nedelje indukcije regeneracije.
- ✓ Primenom optimizovanog protokola moguće je regenerisati prosečno 16,9 biljaka po eksplantatu, koje su već posle osam nedelja spremne za aklimatizaciju.
- ✓ Uočena je korelacija između produkcije H_2O_2 i aktivnosti enzima antioksidativnog sistema (POD, CAT i SOD) i sticanja kompetencije eksplantata za kaulogenezu.
- ✓ Prisustvo H_2O_2 je detektovano u bazalnim odseccima biljaka vlašca nakon kultivacije na podlozi sa 10 μM TDZ u regionu za koji je histološkom analizom pokazano da ima kaulogeni potencijal.

-
- ✓ Svi testirani antioksidativni enzimi su pokazivali bržu promenu i viši nivo aktivnosti u eksplantatima koji su imali najveći kaulogeni potencijal (gajenim na podlozi sa 10 μM TDZ) u odnosu na eksplantate sa najnižim kaulogenim potencijalom (gajenim na podlozi sa 1 μM Kin).
 - ✓ U svim eksplantatima (kultivisanim na podlozi sa 10 μM TDZ ili 1 μM Kin) su detektovane dve izoforme POD, dok je treća specifična izoforma POD uočena kod eksplantata izloženih dejstvu 10 μM TDZ posle trećeg dana od početka tretmana. Upravo kod tih eksplantata je pokazano statistički značajno povećanje ukupne aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolu.
 - ✓ U svim eksplantatima je detektovano prisustvo dve blisko postavljene izoforme CAT. Kin je indukovao slab odgovor i maksimalna aktivnost CAT je uočena 10. dana kultivacije, dok je TDZ prouzrokovao nagli porast aktivnosti CAT posle samo tri dana.
 - ✓ Detektovano je prisustvo pet izoformi SOD u svim uzorcima, tri Cu/Zn-SOD i dve Mn-SOD izoforme. Kin je indukovao postepeni porast SOD, pri čemu je maksimalna vrednost postignuta 10. dana od početka tretmana. U eksplantatima gajenim na podlozi sa TDZ, maksimalna vrednost aktivnosti SOD je detektovana već posle prvog dana tretmana i na toj vrednosti se zadržala još dodatnih pet dana. Nakon toga aktivnost je opala i približila se nivou kontrole.

7. LITERATURA

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wiśniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* 8: 249-256.
- Abbasi BH, Khan M, Guo B, Bokhari SA, Khan MA (2011) Efficient regeneration and antioxidative enzyme activities in *Brassica rapa* var. *turnip*. *Plant Cell Tiss Org* 105: 337-344.
- Abo El-Nil MM (1977) Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Sci Lett* 9: 259-264.
- Adeniyi BA, Anyiam FM (2004) *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. *Phytother Res* 18: 358-361.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105: 121-126.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30: 161-175.
- Ahn YK, Yoon MK, Jeon JS (2013) Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system and production of herbicide-resistant transgenic plants in garlic (*Allium sativum* L.). *Mol Cells* 36: 158-162.
- Aida M, Ishida T, Tasaka M (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* 126: 1563-1570.
- Alan AR, Mutschler MA, Brants A, Cobb E, Earle ED (2003) Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. *Plant Sci* 165: 1201-1211.
- Alizadeh B, Royandazagh SD, Khawar KM, Özcan S (2013) Microporopagation of garlic chives (*Allium tuberosum* Rottl. ex Sprang) using mesocotyl axis. *J Anim Plant Sci* 23: 543-549.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331-1341.
- Amoo SO, Finnie JF, Van Staden J (2011) The role of *meta*-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regul* 63: 197-206.

- Amoo SO, Van Staden J (2013) Influence of plant growth regulators on shoot proliferation and secondary metabolite production in micropropagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tiss Org* 112: 249-256.
- Amoo SO, Aremu AO, Moyo M, Szüčová L, Doležal K, Van Staden J (2014) Physiological effects of a novel aromatic cytokinin analogue in micropropagated *Aloe arborescens* and *Harpagophytum procumbens*. *Plant Cell Tiss Org* 116: 17-26.
- Amoo SO, Aremu AO, Moyo M, Sunmonu TO, Plíhalová L, Doležal K, Van Staden J (2015) Physiological and biochemical effects of a tetrahydropyranyl-substituted *meta*-topolin in micropropagated *Merwillia plumbea*. *Plant Cell Tiss Org* 121: 579-590.
- Anami SE, Mgtutu AJ, Taracha C, Coussens G, Karimi M, Hilson P, Van Lijsebettens M, Machuka J (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. *Plant Cell Tiss Org* 102: 285-295.
- Aremu AO, Bairu MW, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2012a) Shoot and root proliferation in 'Williams' banana: Are the topolins better cytokinins? *Plant Cell Tiss Org* 111: 209-218.
- Aremu AO, Bairu MW, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2012b) Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Org* 108: 1-16.
- Aremu AO, Bairu MW, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2012c) Assessment of the role of *meta*-topolins on in vitro produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' banana. *Acta Physiol Plant* 34: 2265-2273.
- Aremu AO, Bairu MW, Szüčová L, Finnie JF, Van Staden J (2012d) The role of *meta*-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas. *J Plant Physiol* 169: 1530-1541.
- Arndt FJ, Rusch R, Stilfried HV (1976) SN 49537, a new cotton defoliant. *Plant Physiol* 57: 99.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.
- Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, Guivarc'h A, Carnero E, Giraudat-Pautot V, Rech P, Chriqui D (2009) Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *Plant J* 57: 626-644.

- Auer CA, Cohen JD, Laloue M, Cooke TJ (1992a) Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiol* 98: 1035-1041.
- Auer CA, Laloue M, Cohen JD, Cooke TJ (1992b) Uptake and metabolism of benzyladenine during shoot organogenesis in *Petunia* leaf explants. *Plant Growth Regul* 11: 105-114.
- Auer CA, Motyka V, Březinová A, Kamínek M (1999) Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Physiol Plantarum* 105: 141-147.
- Axtell MJ, Bowman JL (2008) Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci* 13: 343-349.
- Ayabe M, Sumi S (1998) Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 17: 773-779.
- Bah AA, Wang ZD, Wang XQ, Yan MM, Um YC, Xu Z, Guo DP (2012) *In vitro* plant regeneration from unpollinated ovaries of *Allium chinense*. *Sci Hortic* 147: 105-110.
- Bahin E, Bailly C, Sotta B, Kranner I, Corbineau F, Leymarie J (2011) Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ* 34: 980-993.
- Bairu MW, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J (2007) Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can *meta*-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tiss Org* 90: 15-23.
- Bairu MW, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J (2008) The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell Tiss Org* 95: 373-379.
- Bairu MW, Novák O, Doležal K, Van Staden J (2011) Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regul* 63:105-114.
- Baisakh N, Datta K, Oliva N, Ona I, Rao GJN, Mew TW, Datta SK (2001) Rapid Development of Homozygous Transgenic Rice using Anther Culture Harboring Rice *chitinase* Gene for Enhanced Sheath Blight Resistance. *Plant Biotechnol* 18: 101-108.

- Barandiaran X, Martín N, Rodríguez-Conde MF, Di Pietro A, Martín J (1999a) Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) Plant Cell Rep 18: 434-437.
- Barandiaran X, Martín N, Alba C, Rodríguez-Conde MF, Di Pietro A, Martín J (1999b) An efficient method for the *in vitro* management of multiple garlic accessions. In Vitro Cell Dev-Pl 35: 466-469.
- Barandiaran X, Martín N, Rodríguez-Conde MF, Di Pietro A, Martín J (1999c) An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). Hortscience 34: 348-349.
- Barba-Espin G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Albacete A, Faize L, Faize M, Pérez-Alfocea F, Hernández JA (2010) Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. Plant Cell Environ 33: 981-994.
- Barba-Espín G, Diaz-Vivancos P, Job D, Belghazi M, Job C, Hernández JA (2011) Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. Plant Cell Environ 34: 1907-1919.
- Batistič O, Kudla J (2012) Analysis of calcium signaling pathways in plants. Biochim Biophys Acta 1820: 1283-1293.
- Bařková P, Pospíšilová J, Synková H (2008) Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. Biol Plantarum 52: 413-422.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44: 276-287.
- Benkeblia N (2004) Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). Lebensm Wiss Technol 37: 263-268.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell 115: 591-602.
- Benson EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? In Vitro Cell Dev-Pl 36: 163-170.
- Beyer WF Jr, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Anal Biochem 161: 559-566.

- Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002) Golden Rice: introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr* 132: 506S-510S.
- Bhojwani SS (1980) *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci Hortic* 13: 47-52.
- Bino RJ, Janssen MG, Franken J, De Vries JN (1989) Enhanced seed development in the interspecific cross *Allium cepa* x *A. sphaerocephalon* through ovary culture. *Plant Cell Tiss Org* 16: 135-142.
- Blazquez S, Olmos E, Hernández JA, Fernández-García N, Fernández JA, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tiss Org* 97: 49-57.
- Blomster T, Salojärvi J, Sipari N, Brosché M, Ahlfors R, Keinänen M, Overmyer K, Kangasjärvi J (2011) Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 157: 1866-1883.
- Bohanec B, Jakše M, Ihan A, Javornik B (1995) Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Sci* 104: 215-224.
- Bohanec B, Jakše M (1999) Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Rep* 18: 737-742.
- Bohanec B (2002) Doubled – haploid onions. *Allium crop science*: (eds H.D. Rabinowitch and L. Currah) 145-158.
- Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M (2006) Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants. *Euphytica* 149: 73-83.
- Bolibok H, Gruszczyńska A, Hromada-Judycka A, Rakoczy-Trojanowska M (2007) The identification of QTLs associated with the *in vitro* response of rye (*Secale cereale* L.). *Cell Mol Biol Lett* 12: 523-535.
- Bonfill M, Cusidó RM, Palazón J, Canut E, Piñol MT, Morales C (2003) Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell Tiss Org* 73: 37-41.
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14:1737-1749.

- Bozhkov PV, Filonova LH, Suarez MF (2005) Programmed cell death in plant embryogenesis. *Curr Top Dev Biol* 67: 135-179.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bregitzer P, Campbell RD (2001) Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus. *Crop Sci* 41: 173-179.
- Bridges SM, Salin ML (1981) Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol* 68: 275-278.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584.
- Buechel S, Leibfried A, To JP, Zhao Z, Andersen SU, Kieber JJ, Lohmann JU (2010) Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and regeneration. *Eur J Cell Biol* 89: 279-284.
- Buiteveld J, van der Valk P, Jansen J, Creemers-Molenaar J, Colijn-Hooymans CM (1993) Callus induction and plant regeneration from explants of commercial cultivars of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.). *Plant Cell Rep* 12: 431-434.
- Buiteveld J, Creemers-Molenaar J (1994) Plant regeneration from protoplasts isolated of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.) *Plant Sci* 100: 203-210.
- Burssens S, de Almeida Engler J, Beeckman T, Richard C, Shaul O, Ferreira P, Van Montagu M, Inzé D (2000) Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2;1* gene. *Planta* 211: 623-631.
- Busch W, Miotk A, Ariel FD, Zhao Z, Forner J, Daum G, Suzaki T, Schuster C, Schultheiss SJ, Leibfried A, Haubeiss S, Ha N, Chan RL, Lohmann JU (2010) Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev Cell* 18: 841-853.
- Butt MS, Sultan MT, Butt MS, Iqbal J (2009) Garlic: Nature's protection against physiological threats. *Crit Rev Food Sci* 49: 538-551.
- Campion B, Falavigna A, Schiavi M (1984) Efforts for *in vitro* androgenesis in onion (*Allium cepa* L.). 3rd Eucarpia Allium Symp., 4-6 September, 1984, Wageningen: 110.
- Campion B, Alloni C (1990) Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. *Plant Cell Tiss Org* 20: 1-6.

- Carman JG (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behaviour. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 746-753.
- Cary AJ, Che P, Howell SH (2002) Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 32: 867-877.
- Casanova E, Valdés AE, Fernández B, Moysset L, Trillas MI (2004) Levels and immunolocalization of endogenous cytokinins in thidiazuron-induced shoot organogenesis in carnation. *J Plant Physiol* 161: 95-104.
- Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss Org* 64: 145-157.
- Chakrabarty D, Park SY, Ali MB, Shin KS, Paek KY (2006) Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol* 26: 377-388.
- Chalapathi Rao ASV, Reddy AR (2008) Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. In: Khan NA, Singh S, Umar S, (Eds.), *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants*. Springer, 111-147.
- Chapman A, Blervacq AS, Vasseur J, Hilbert JL (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211: 305-314.
- Chatfield JM, Armstrong DJ (1988) Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus cultures. Affinity for Concanavalin. *Plant Physiol* 88: 245-247.
- Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2771-2785.
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006) Gene expression programs during shoot, root and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol* 141: 620-637.
- Che P, Lall S, Howell SH (2007) Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta* 226: 1183-1194.
- Chen THH, Marowitch J, Thompson BG (1987) Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss Org* 8: 73-81.

- Chen GX, Asada K (1989) Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant Cell Physiol* 30: 987-998.
- Chen J, Ziv M (2001) The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. *Plant Cell Rep* 20: 22-27.
- Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R (2002) Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breeding* 10: 71-82.
- Cheng ZJ, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su YH, Li W, Sun TT, Zhao XY, Li XG, Cheng Y, Zhao Y, Xie Q, Zhang XS (2013) Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol* 161: 240-251.
- Chiappetta A, Fambrini M, Petrarulo M, Rapparini F, Michelotti V, Bruno L, Greco M, Baraldi R, Salvini M, Pugliesi C, Bitonti MB (2009) Ectopic expression of *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* gene and localized auxin accumulation mark embryogenic competence in epiphyllous plants of *Helianthus annuus* x *H. tuberosus*. *Ann Bot* 103: 735-747.
- Christianson ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Dev Biol* 95: 288-293.
- Chuck G, Lincoln C, Hake S (1996) KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1277-1289.
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM (1995) CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* 121: 2057-2067.
- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM (1996) The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 1567-1575.
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89: 575-585.
- Conroy JM, Borzelleca DC, McDonnell LA (1982) Homology of plant peroxidases: an immunochemical approach. *Plant Physiol* 69: 28-31.

- Cueno ME, Imai K, Ochiai K, Okamoto T (2012) Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. *J Plant Physiol* 169: 834-838.
- Curaba J, Singh MB, Bhalla PL (2014) miRNKs in the crosstalk between phytohormone signaling pathways. *J Exp Bot* 65: 1425-1438.
- Darr D, Fridovich I (1985) Inhibition of catalase by 3,3'-diaminobenzidine. *Biochem J* 226:781-787
- Deglène L, Lesignes P, Alibert G, Sarrafi A (1997) Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell Tiss Org* 48: 127-130.
- De Klerk GJ, Arnholdt – Schmitt B, Lieberei R, Neumann KH (1997) Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biol Plantarum* 39: 53-66.
- De Marco A, Roubelakis-Angelakis KA (1996) The Complexity of Enzymic Control of Hydrogen Peroxide Concentration May Affect the Regeneration Potential of Plant Protoplasts. *Plant Physiol* 110: 137-145.
- de Reuille PB, Bohn-Courseau I, Ljung K, Morin H, Carraro N, Godin C, Traas J (2006) Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1627-1632.
- de Sarker D, Johnson MAT, Reynolds A, Brandham PE (1997) Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (*Alliaceae*), and of some Eurasian relatives. *Bot J Linn Soc* 124: 361-373.
- Desikan R, Clarke A, Hancock JT, Neill SJ (1999) H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* 50: 1863-1866.
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol* 127: 159-172.
- De Souza IRP, MacAdam JW (1998) A transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes decrease in elongation rate of B73 maize (*Zea mays*) leaf blades. *Physiol Plantarum* 104: 556-562.
- De Vries JN, Wietsma WA, de Vries T (1992) Introgression of leaf blight resistance from *A. roylei* Stearn into onion (*A. cepa* L.). *Euphytica* 62: 127-133.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Dhonukshe P, Mathur J, Hülskamp M, Gadella TWJ (2005) Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation

- of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biol* 3: 11.
- Díaz-Vivancos P, Barba-Espín G, Clemente-Moreno MJ, Hernández JA (2010) Characterization of the antioxidant system during the vegetative development of pea plants. *Biol Plantarum* 54:76-82.
- Díaz-Vivancos P, Majourhat K, Fernández JA, Hernández JA, Piqueras A (2011) Study of the antioxidant enzymatic system during shoot development from cultured intercalary meristems of saffron. *Plant Growth Regul* 65: 119-126.
- Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Jámor-Benczúr E, Kiss E, Lazányi J, Bubán T (2002) Effect of conditioning apple shoots with *meta*-topolin on the morphogenetic activity of *in vitro* leaves. *Acta Agron Hung* 50: 117-126.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48: 1493-1509.
- Dodsworth S (2009) A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Dev Biol* 336: 1-9.
- Doležel J, Novák FJ, Lužný J (1980) Embryo development and *in vitro* culture of *Allium cepa* and its interspecific hybrids. *Z Pflanzenzucht* 85: 177-184.
- Dragišić-Maksimović JJ, Milivojević JM, Poledica MM, Nikolić MD, Maksimović VM (2013) Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (*Autumn bliss* and *Polka*). *J Food Compos Anal* 31: 173-179.
- Dubrovsky JG, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214: 30-36.
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 99: 475-484.
- Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol* 174: 332-341.
- Dunstan DI, Short KC (1977) Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol Plantarum* 41: 70-72.
- Dutta Gupta S, Datta S (2003/4) Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biol Plantarum* 47: 179-183.

- Eady CC, Butler RC, Suo Y (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep* 18: 111-116.
- Eady CC, Weld RJ, Lister CE (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep* 19: 376-381.
- Eady C, Davis S, Farrant J, Reader J, Kenel F (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of herbicide resistant onion (*Allium cepa*) plants. *Ann Appl Biol* 142: 213-217.
- Eady C, Davis S, Catanach A, Kenel F, Hunger S (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*). *Plant Cell Rep* 24: 209-215.
- Eady CC, Kamoi T, Kato M, Porter NG, Davis S, Shaw M, Kamoi A, Imai S (2008) Silencing Onion Lachrymatory Factor Synthase Causes a Significant Change in the Sulfur Secondary Metabolite Profile. *Plant Physiol* 147: 2096-2106.
- Ebrahimi R, Zamani Z (2009) Effect of polyamines on in vitro gynogenesis of onion (*Allium cepa* L.). *Am-Eurasian J Sustain Agric* 3: 71-74.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278-284.
- Elhiti M, Tahir M, Gulden RH, Khamiss K, Stasolla C (2010) Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J Exp Bot* 61: 4069-4085.
- Elhiti M, Stasolla C (2012) In vitro shoot organogenesis and hormone response are affected by the altered levels of *Brassica napus* meristem genes. *Plant Sci* 190: 40-51.
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In vitro Cell Dev-Pl* 49: 631-642.
- Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cell in *Arabidopsis* shoot and floral meristem and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* 10: 967-979.
- Epstein L, Lamport DTA (1984) An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin. *Phytochemistry* 23:1241-1246.

- Faisal M, Anis M (2009) Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tiss Org* 99: 125-132.
- Fehér A, Pasternak T, Ötvös K, Miskolczi P, Dudits D (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia* 57: 5 – 12.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org* 74: 201-228.
- Fereol L, Chovelon V, Causse S, Michaux-Ferriere N, Kahane R (2002) Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 21: 197-203.
- Filipović BK, Simonović AD, Trifunović MM, Dmitrović SS, Savić JM, Jevremović SB, Subotić AR (2015) Plant regeneration in leaf culture of *Centaureum erythraea* Rafn. Part 1: The role of antioxidant enzymes. *Plant Cell Tiss Org* 121: 703-719.
- Flatmark T (1964) Studies on the peroxidase effect of cytochrome c. III. A kinetic study of the over-all reaction. *Acta Chem Scand* 18: 2269-2279.
- Flavell RB (1995) Plant biotechnology R&D – the next ten years. *Trends Biotechnol* 13: 313-319.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.
- Fletcher JC, Meyerowitz EM (2000) Cell signalling within the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol* 3: 23-30.
- Friesen N, Fritsch RM, Blattner FR (2006) Phylogeny and new infrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ITS sequences. *Aliso* 22: 372-395.
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426: 147-153.
- Fritsch RM, Friesen N (2002) Evolution, Domestication and Taxonomy in Rabinowitch, H.D., Currah, L. eds., *Allium Crop Science: Recent Advances*. CABI Publishing: 5-30.

- Fry SC (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J* 332: 507-515.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- Fujieda K, Ando Y, Fujita Y (1977) Propagation of Welsh onion through shoot tip culture. *J Fac Agr Kyushu U* 22: 89-98.
- Gaj MD, Zhang S, Harada JJ, Lemaux PG (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* 222: 977-988.
- Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R (2004) WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Gene Dev* 18: 375-380.
- Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Gantait S, Mandal N, Das PK (2010) An overview on in vitro culture of genus *Allium*. *Am J Plant Physiol* 5: 325-337.
- Gao X, Nagawa S, Wang G, Yang Z (2008) Cell polarity signaling: focus on polar auxin transport. *Mol Plant* 1: 899-909.
- Gapper C, Dolan L (2006) Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species. *Plant Physiol* 141: 341-345.
- Gechev TS, Hille J (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* 168: 17-20.
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230.

- Gentile A, Jáquez Gutiérrez M, Martínez J, Frattarelli A, Nota P, Caboni E (2014) Effect of *meta*-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell Tiss Org* 118: 373-381.
- George EF (2008) Plant Tissue Culture Procedure - Background 1. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture, Volume 1. The Background* 3rd Edition, Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-28.
- Ghnaya AB, Charles G, Branchard M (2008) Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss Org* 92: 25-30.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48: 909-930.
- Goleniowski M, Del Longo O, de Forchetti SM, Argüello JA (2001) Relationships between peroxidases and *in vitro* bulbification in garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cell Dev-Pl* 37: 683-686.
- Gonzalez LG, Ford-Lloyd BV (1987) Facilitation of wide-crossing through embryo rescue and pollen storage in interspecific hybridization of cultivated *Allium* species. *Plant Breeding* 98: 318-322.
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM (2007) Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* 134: 3539-3548.
- Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16529-16534.
- Grafi G, Ben-Meir H, Avivi Y, Moshe M, Dahan Y, Zemach A (2007) Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Dev Biol* 306: 838-846.
- Greer MS, Kovalchuk I, Eudes F (2009) Ammonium nitrate improves direct somatic embryogenesis and biolistic transformation of *Triticum aestivum*. *New Biotechnol* 26: 44-52.
- Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B (2002) Onions-a global benefit to health. *Phytother Res* 16: 603-615.
- Guha S, Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.

- Guilfoyle TJ (2015) The PB1 domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. *Plant Cell* 27: 33-43.
- Guo F, Liu C, Xia H, Bi Y, Zhao C, Zhao S, Hou L, Li F, Wang X (2013) Induced expression of *AtLECI* and *AtLEC2* differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 8: e71714.
- Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C (2009) Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* 21: 3119-3132.
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzsber Akad Wiss Wien Math-naturwiss KI* 111: 69-92.
- Hailekidan B, Andargie M, Assefa K (2013) *In vitro* plantlet regeneration from the bulbs of shallot (*Allium cepa* Var. *Group Aggregatum*). *Res Plant Sci* 1: 45-52.
- Halliwell B (1974) Superoxide dismutase, Catalase and Glutathione peroxidase: Solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytol* 73: 1075-1086.
- Han M, Park Y, Kim I, Kim EH, Yu TK, Rhee S, Suh JY (2014) Structural basis for the auxin-induced transcriptional regulation by Aux/IAA17. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 18613-18618.
- Hansen EE, Hubstenberger JF, Phillips GC (1995) Regeneration of shoots from cell suspension-derived protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Rep* 15: 8-11.
- Haque MS, Wada T, Hattori K (1997) High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell Tiss Org* 50: 83-89.
- Haque MS, Wada T, Hattori K (1998) Efficient plant regeneration in garlic through somatic embryogenesis from root tip explants. *Plant Prod Sci* 3: 216-222.
- Haque MS, Wada T, Hattori K (1999) Anatomical changes during *in vitro* direct formation of shoot bud from root tips in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Prod Sci* 2: 146-153.
- Harding EW, Tang W, Nichols KW, Fernandez DE, Perry SE (2003) Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiol* 133: 653-663.
- Hare PD, Van Staden J (1994) Inhibitory effect of Thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Physiol* 35: 1121-1125.

- Harris JC, Cottrell SL, Plummer S, Lloyd D (2001) Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 282-286.
- Hasegawa H, Sato M, Suzuki M (2002) Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from long-term, shoot primordia-derived calluses of garlic (*Allium sativum*). *J Plant Physiol* 159: 449-452.
- Havel L, Novák FJ (1988) Regulation of somatic embryogenesis and organogenesis in *Allium carinatum* L. *J Plant Physiol* 132: 373-377.
- Hawes MC, Smith LY, Stephenson M (1991) Root organogenesis from single cells released from the root cap of *Medicago* sp. *Plant Cell Tiss Org* 27: 303-308.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* 15: 1899-1911.
- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inzé D (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5: 1711-1723.
- Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, Heyndrickx KS, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoele K (2013) ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* 342: 860-863.
- Hinman RL, Lang J (1965) Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry* 4: 144-158.
- Hong W, Debergh P (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. *Plant Cell Tiss Org* 43: 21-28.
- Hromada-Judycka A, Bolibok-Bragoszewska H, Rakoczy-Trojanowska M (2010) Genetically directed differential subtraction chain products related to in vitro response of immature embryos of rye (*Secale cereale* L.): isolation, characterization, and expression analysis. *Plant Cell Tiss Org* 100:131-138.
- Hu H, Xiong L, Yang Y (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cells and host defense response against fungal infection. *Planta* 222: 107-117.
- Hutchinson MJ, Murch SJ, Saxena PK (1996) Morphoregulatory role of thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *J Plant Physiol* 149: 573-579.

- Hutchinson MJ, Saxena PK (1996) Role of purine metabolism in Thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium* × *Hortorum*) hypocotyl cultures. *Physiol Plantarum* 98: 517-522.
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389.
- Hyde PT, Earle ED, Mutschler MA (2012) Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance. *HortScience* 47: 1690-1695.
- Iciek M, Kwiecień I, Włodek L (2009) Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environ Mol Mutagen* 50: 247-265.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* 409: 1060-1063.
- Ishizaki T, Komai F, Masuda K (2001) Screening for strongly regenerative genotypes of spinach in tissue culture using subcultured root explants. *Plant Cell Tiss Org* 67: 251-255.
- Jaleel CA, Manivannan P, Lakshmanan GMA, Gomathinayagam M, Panneerselvam R (2008) Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloid Surface B* 61: 298-303.
- Jana S, Shekhawat GS (2012) *In vitro* regeneration of *Anethum graveolens*, antioxidative enzymes during organogenesis and RAPD analysis for clonal fidelity. *Biol Plantarum* 56: 9-14.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M (2005) KNOX action in Arabidopsis is mediated by the coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* 15: 1560-1565.
- Javornik B, Bohanec B, Campion B (1998) Second cycle gynogenesis in onion, *Allium cepa* L., and genetic analysis of the plants. *Plant Breeding* 117: 275-278.
- Jia H, Yu J, Yi D, Cheng Y, Xu W, Zhang L, Ma Z (2009) Chromosomal intervals responsible for tissue culture response of wheat immature embryos. *Plant Cell Tiss Org* 97:159-165.
- Jiang K, Meng YL, Feldman LJ (2003) Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130: 1429-1438.

- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Rev Bras Fisiol Veg* 13: 196-223.
- Jin F, Hu L, Yuan D, Xu J, Gao W, He L, Yang X, Zhang X (2014) Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnol J* 12: 161-173.
- Jonak C, Nakagami H, Hirt H (2004) Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol* 136: 3276-3283.
- Jones MPA, Cao J, O'Brien R, Murch SJ, Saxena PK (2007) The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. *Plant Cell Rep* 26: 1481-1490.
- Jones B, Gunnerås SA, Petersson SV, Tarkowski P, Graham N, May S, Dolezal K, Sandberg G, Ljung K (2010) Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell* 22: 2956-2969.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126: 1055-1060.
- Kagan VE, Serbinova EA, Packer L (1990) Generation and recycling of radicals from phenolic antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 280: 33-39.
- Kahane R, Rancillac M, de la Serve BT (1992) Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org* 28: 281-288.
- Kairong C, Gengsheng X, Xinmin L, Gengmei X, Yafu W (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci* 146: 9-16.
- Kakimoto T (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985.
- Kamada H, Tachikawa Y, Saitou T, Harada H (1994) Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant Tiss Cult Lett* 11: 229-232.
- Kamenetsky R, Rabinowitch HD (2006) The Genus *Allium*: A Developmental and Horticultural Analysis. *Hortic Rev* 32: 329-337.
- Kamínek M, Motyka V, Vaňková R (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol Plantarum* 101: 689-700.

- Kawaoka A, Matsunaga E, Endo S, Kondo S, Yoshida K, Shinmyo A, Ebinuma H (2003) Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiol* 132: 1177-1185.
- Keller J (1990a) Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 47: 241-247.
- Keller J (1990b) Results of anther and ovule culture in some species and hybrids in the genus *Allium* L. *Arch Zuchtungsforsch* 20: 189-197.
- Keller ERJ, Schubert I, Fuchs J, Meister A (1996) Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. *Theor Appl Genet* 92: 417-424.
- Kenel F, Eady C, Brinch S (2010) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. *Plant Cell Rep* 29: 223-230.
- Kepinski S, Leyser O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- Kim JW, Soh WY (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum* L. *Plant Sci* 114: 215-220.
- Kim J, Harter K, Theologis A (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11786-11791.
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998) Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Plant Physiol* 118: 637-650.
- Kobayashi AK, Besspalhok JC, Pereira LFP, Vieira LGE (2003) Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell Tiss Org* 74: 99-102.
- Koch M, Tanami Z, Salomon R (1995) Improved regeneration of shoots from garlic callus. *HortScience* 30: 378.
- Kodym A, Zapata-Arias FJ (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell Tiss Org* 55: 141-145.

- Koetle MJ, Finnie JF, Van Staden J (2010) In vitro regeneration in *Dierma erectum* Hilliard. *Plant Cell Tiss Org* 103: 23-31.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547-574.
- Korasick DA, Westfall CS, Lee SG, Nanao MH, Dumas R, Hagen G, Guilfoyle TJ, Jez JM, Strader LC (2014) Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 5427-5432.
- Kozak D, Stelmaszczyk M (2013) Comparison of *Allium aflatunense* B. Fedtseh. 'Purple Sensation' and *Allium karataviense* Regel. 'Ivory Queen' regenerative capabilities in tissue culture. *Acta Sci Pol Hortoru* 12:197-213.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652-655.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagrimini LM, Rothstein S (1987) Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 84: 438-442.
- Lagunes-Fortiz E, Robledo-Paz A, Gutiérrez-Espinosa MA, Mascorro-Gallardo JO, Espitia-Rangel E (2013) Genetic transformation of garlic (*Allium sativum* L.) with tobacco chitinase and glucanase genes for tolerance to the fungus *Sclerotium cepivorum*. *Afr J Biotechnol* 12: 3482-3492.
- Lanzotti V, Scala F, Bonanomi G (2014) Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochem Rev* 13: 769-791.
- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jürgens G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 87-96.
- Laux T, Jürgens G (1997) Embryogenesis: A new start in life. *Plant Cell* 9: 989-1000.
- Lee SH, Tewari RK, Hahn EJ, Peak KY (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. plantlets. *Plant Cell Tiss Org* 90: 141-151.

- Leelarungrayub N, Rattanapanone V, Chanarat N, Gebicki JM (2006) Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition* 22: 266-274.
- Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohman JU (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172-1175.
- Letham DS (1994) Cytokinins as phytohormones – Sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. An overview Mok DWS, Mok MC Cytokinins – Chemistry, activity and function. Boca Raton FL: CRC Press: 57-80.
- Li W, Sun G, Liu J, Masilamany P, Taylor JH, Yan W, Kasha KJ, Pauls KP (2004) Inheritance of plant regeneration from maize (*Zea mays* L.) shoot meristem cultures derived from germinated seeds and the identification of associated RAPD and SSR markers. *Theor Appl Genet* 108: 681-687.
- Li W, Liu H, Cheng ZJ, Su YH, Han HN, Zhang Y, Zhang XS (2011) DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in Arabidopsis by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. *PLoS Genet* 7:e1002243.
- Li JR, Zhuang FY, Ou CG, Hu H, Zhao ZW, Mao JH (2013) Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tiss Org* 112: 275-287.
- Libik M, Konieczny R, Pater B, Ślesak I, Miszalski Z (2005) Differences in the activities of some antioxidant enzymes and H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Rep* 23: 834-841.
- Libik-Konieczny M, Kozieradzka-Kiszkurno M, Desel C, Michalec-Warzecha Ż, Miszalski Z, Konieczny R (2015) The localization of NADPH oxidase and reactive oxygen species in in vitro-cultured *Mesembryanthemum crystallinum* L. hypocotyls discloses their differing roles in rhizogenesis. *Protoplasma* 252: 477-487.
- Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Ann NY Acad Sci* 851: 187-198.
- Liu C, Xu Z, Chua NH (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621-630.

- Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, Zhou H, Qu LH, Chen YQ (2009) Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett* 583: 723-728.
- Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J Exp Bot* 61: 2979-2990.
- Liu HI, Wang GC, Feng Z, Zhu J (2010) Screening of genes associated with dedifferentiation and effect of LBD29 on pericycle cells in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 62: 127-136.
- Liu C, Lin Z, Zhang X (2012) Unbiased genomic distribution of genes related to cell morphogenesis in cotton by chromosome mapping. *Plant Cell Tiss Org* 108: 529-534.
- Liu YH, Offler CE, Ruan YL (2014) A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. *Front Plant Sci* 5: 745, 1-6.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66-69.
- López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA, Ros Barceló A (2004) *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J Exp Bot* 55: 423-431.
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MAL, LO R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195-1205.
- Luciani GF, Marinangeli PA, Curvetto NR (2001) Increasing nitrate/ammonium ratio for improvement of garlic micropropagation. *Sci Hortic* 87: 11-20.
- Luciani GF, Mary AK, Pellegrini C, Curvetto NR (2006) Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org* 87: 139-143.
- Lumbreras V, Vilela B, Irar S, Solé M, Capellades M, Valls M, Coca M, Pagès M (2010) MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *Plant J* 63: 1017-1030.

- Luo JP, Jiang ST, Pan LJ (2001) Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities. *Plant Sci* 161: 125-132.
- Luthar Z, Bohanec B (1999) Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Rep* 18: 797-802.
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* 126: 469-481.
- Ma Y, Wang HL, Zhang CJ, Kang YQ (1994) High rate of virus-free plantlet regeneration via garlic scape-tip culture. *Plant Cell Rep* 14: 65-68.
- Mahdavi-Darvari F, Noor NM, Isamnizan I (2015) Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org* 120: 407-422.
- Mahmoudabadi AZ, Nasery MKG (2009) Anti fungal activity of shallot, *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae), *in vitro*. *J Med Plants Res* 3: 450-453.
- Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Teixeira da Silva JA, Bulley SM, Hudák I (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tiss Org* 101: 251-267.
- Makara AM, Rubaihayo PR, Magambo MJS (2010) Carry-over effect of thidiazuron on banana *in vitro* proliferation at different culture cycles and light incubation conditions. *Afr J Biotechnol* 9: 3079-3085.
- Malá J, Máchová P, Cvrčková H, Karady M, Novák O, Mikulík J, Dostál J, Strnad M, Doležal K (2013) The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. *Biol Plantarum* 57: 174-178.
- Malik MR, Wang F, Dirpaul JM, Zhou N, Polowick PL, Ferrie AMR, Krochko JE (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 144: 134-154.
- Marchionni Basté E, Pratta GR, Zorzoli R (2007) Genetic analysis of the *in vitro* culture response in tomato. *Plant Cell Tiss Org* 88: 233-239.
- Martín-Urdíroz N, Garrido-Gala J, Martín J, Barandiaran X (2004) Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step *in vitro* system. *Plant Cell Rep* 22: 721-724.

- Matsuda Y, Adachi T (1996) Plant regeneration via embryogenesis in commercial cultivars of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl.). *Plant Sci* 119: 149-156.
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T (1998) Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.
- Mazid M, Khan TA, Mohammad F (2011) Cytokinins, A classical multifaceted hormone in plant system. *J Stress Physiol Biochem* 7: 347-368.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- Mengxi L, Zhigang X, Yang Y, Yijie F (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org* 106: 1-10.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61: 4197-4220.
- Michalczyk L, Druart P (1999) Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil® cherry rootstock (*Prunus incisa* × *serrula* 'GM 9') and in hormone-dependent, nonembryogenic calli of *Prunus incisa* × *serrula* and *Prunus domestica*. *Physiol Plantarum* 107: 426-432.
- Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* 62: 3713-3725.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77: 1329.
- Milojević J, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Dragičević I, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Increased regeneration capacity in spinach lines obtained by *in vitro* self-fertilisation. *Sci Hort* 130: 681-690.
- Milojević J, Tubić Lj, Pavlović S, Mitić N, Čalić D, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2012) Long days promote somatic embryogenesis in spinach. *Sci Hort* 142: 32-37.
- Mishra R, Wang HY, Yadav NR, Wilkins TA (2003) Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype-independent regeneration. *Plant Cell Tiss Org* 73: 21-35.

- Mitić N, Nikolić R, Nešković M (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five wheat cultivars and their reciprocal hybrids. *Arch Biol Sci* 51: 99-104.
- Mitrović A, Janošević D, Budimir S, Bogdanović Pristov J (2012) Changes in antioxidative enzymes activities during *Tacitus bellus* direct shoot organogenesis. *Biol Plantarum* 56: 357-361.
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* 212: 540-546
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498.
- Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, Fernandez X, Chemat F (2014) Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the *Alliaceae* Family. *Molecules* 19: 20034-20053.
- Mohammadi M, Kazemi H (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Sci* 162: 491-498.
- Mohamed-Yasseen Y, Splittstoesser WE, Litz RE (1994) In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell Tiss Org* 36: 243-247.
- Mohamed-Yasseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE (1995) In vitro shoot proliferation and plant regeneration from kurrat (*Allium ampeloprasum* var. *kurrat*) seedlings. *Plant Cell Tiss Org* 40: 195-196.
- Mohamed-Yasseen Y, Costanza SH (1996) Clonal propagation of kurrat (*Allium ampeloprasum* var. *kurrat*). *In Vitro Cell Dev-Pl* 32: 100-102.
- Mok MC (1994) Cytokinins and plant development-an overview Mok DWS, Mok MC Cytokinins – Chemistry, activity, and function. Boca Raton FL: CRC Press: 155-166.
- Mok MC, Martin RC, Mok DWS (2000) Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell Dev-Pl* 36: 102-107.
- Molassiotis AN, Dimassi K, Diamantidis G, Therios I (2004) Changes in peroxidases and catalase activity during *in vitro* rooting. *Biol Plantarum* 48: 1-5.

- Molina RV, Nuez F (1995) Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. *Plant Cell Tiss Org* 43: 249-257.
- Molina RV, Nuez F (1996) The inheritance of organogenic response in melon. *Plant Cell Tiss Org* 46: 251-256.
- Moltrasio R, Robredo CG, Gómez MC, Díaz Paleo AH, Díaz DG, Rios RD, Franzone PM (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell Tiss Org* 77: 119-124.
- Motte H, Verstraeten I, Werbrouck S, Geelen D (2011) CUC2 as an early marker for regeneration competence in Arabidopsis root explants. *J Plant Physiol* 168: 1598-1601.
- Motte H, Galuszka P, Spíchal L, Tarkowski P, Plíhal O, Šmehilová M, Jaworek P, Vereecke D, Werbrouck S, Geelen D (2013) Phenyl-Adenine, Identified in a *LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS4*-Assisted Chemical Screen, Is a Potent Compound for Shoot Regeneration through the Inhibition of CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE Activity. *Plant Physiol* 161: 1229-1241.
- Motte H, Vercauteren A, Depuydt S, Landschoot S, Geelen D, Werbrouck S, Goormachtig S, Vuylstekec M, Vereecke D (2014) Combining linkage and association mapping identifies RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1 as an essential Arabidopsis shoot regeneration gene. *Proc Natl Acad Sci* 111: 8305-8310.
- Motyka V, Kamínek M (1990) Regulation of cytokinin catabolism in tobacco callus cultures. In (eds.): Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J. *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands pp. 492-497.
- Moussian B, Schoof H, Haecker A, Jürgens G, Laux T (1998) Role of ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J* 17: 1799-1809.
- Moyo M, Finnie JF, Van Staden J (2012) Topolins in *Pelargonium sidoides* micropropagation: do the new brooms really sweep cleaner? *Plant Cell Tiss Org* 110: 319-327.
- Mukhopadhyay MJ, Sengupta P, Mukhopadhyay S, Sen S (2005) *In vitro* stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability in solid callus culture. *Sci Hortic* 104: 1-9.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol* 25: 135-166.
- Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (1997) Thidiazuron-induced morphogenesis of Regal geranium (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response. *Physiol Plantarum* 101: 183-191.
- Murch SJ, Victor JMR, Krishnaraj S, Saxena PK (1999) The role of proline in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut. *In Vitro Cell Dev-Pl* 35: 102-105.
- Murch SJ, Saxena PK (2001) Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth Regul* 35: 269-275.
- Muren R (1989) Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience* 24: 833-834.
- Murovec J, Bohanec B (2012) Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Abdurakhmonov, I. ed. *Plant Breeding*, Chapter 5: 87-106.
- Murphy DJ (2007) Improving containment strategies in biopharming. *Plant Biotechnol J* 5: 555-569.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev-Pl* 34: 267-275.
- Musial K, Bohanec B, Jakše M, Przywara L (2005) The development of onion (*Allium cepa* L.) Embryo sacs *in vitro* and gynogenesis induction in relation to flower size. *In Vitro Cell Dev-Pl* 41: 446-452.
- Myers JM, Simon PW (1998) Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. *Plant Cell Rep* 17: 726-730.
- Myers JM, Simon PW (1999) Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation, plant growth regulators and culture conditions over time. *Plant Cell Rep* 19: 32-36.
- Nagakubo T, Nagasawa A, Ohkawa H (1993) Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell Tiss Org* 32: 175-183.
- Nagasawa A, Finer JJ (1988a) Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic. *HortScience* 23: 1068-1070.

- Nagasawa A, Finer JJ (1988b) Development of morfogenic cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Tiss Org* 15: 183-187.
- Nair AS, Seo BB (1993) Plantlet regeneration from callus initiated from flower buds in the wild species *Allium senescens* var. *minor*. *Plant Cell Tiss Org* 34: 205-207.
- Nakano Y, Asada K (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol* 21: 1295-1307.
- Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep* 31: 597-620.
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* 59: 165-176.
- Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Peña C (2013) New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* 8: e72160.
- Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211: 756-759.
- Nitsch JP (1969) Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphol* 19: 389-404.
- Noctor G, Foyer CH (1998) A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C₃ photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J Exp Bot* 49: 1895-1908.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304.
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol* 133: 218-230.
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 60: 1759-1771.

- Novak FJ (1980) Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. Z Pflanzenzuchtung 84: 250-260.
- Novák FJ, Havel L (1981) Shoot production from *in vitro* cultured flower heads of *Allium porrum* L. Biol Plantarum 23: 266-269.
- Novak FJ (1990) Allium tissue culture. In: Rabinowitch HD and Brewster JL (eds) Onions and Allied Crops. CRC Boca Raton 1: 233-250.
- Obert B, Benson EE, Millam S, Pret'ová A, Bremner DH (2005) Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. J Plant Physiol 162: 537-547.
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 13839-13844.
- Ohyama K, Shinohara H, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009) A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. Nat Chem Biol 5: 578-580.
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. Proc Natl Acad Sci USA 96: 6553-6557.
- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA (2001) Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. Plant Cell 13: 179-191.
- Overvoorde PJ, Grimes HD (1994) The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. Plant Cell Physiol 34: 135-144.
- Ozbay A, Özgen M (2010) Is heterosis noticeable in the callus response of winter durum wheat F₁ hybrids? Biol Plantarum 54: 769-772.
- Paciorek T, Zažímalová E, Ruthardt N, Petrášek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N, Friml J (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. Nature 435: 1251-1256.
- Pandey R, Chandel KPS, Rao SR (1992) In vitro propagation of *Allium tuberosum* Rottl. ex. Spreng. by shoot proliferation. Plant Cell Rep 11: 375-378.
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA (1999) The Generation of Active Oxygen Species Differs in Tobacco and Grapevine Mesophyll Protoplasts. Plant Physiol 121: 197-205.

- Papadakis AK, Siminis CI, Roubelakis-Angelakis KA (2001) Reduced Activity of Antioxidant Machinery Is Correlated with Suppression of Totipotency in Plant Protoplasts. *Plant Physiol* 126: 434-444.
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA (2002) Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiol Bioch* 40: 549-559.
- Papadakis AK, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2005) Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant plant protoplasts. *Physiol Plantarum* 125: 10-20.
- Park MY, Yi NR, Lee HY, Kim ST, Kim M, Park JH, Kim JK, Lee JS, Cheong JJ, Choi YD (2002) Generation of chlorsulfuron-resistant transgenic garlic plants (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *Mol Breeding* 9: 171-181.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002) The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. *Plant Physiol* 129: 1807-1819.
- Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J Exp Bot* 56: 1991-2001.
- Patnaik D, Mahalakshmi A, Khurana P (2005) Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. *Indian J Exp Bio* 43: 740-745.
- Pearson J, Stewart GR (1993) The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytol* 125: 283-305.
- Peer WA, Cheng Y, Murphy AS (2013) Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *J Exp Bot* 64: 2629-2639.
- Peffley EB, Hou A (2000) Bulb-type onion introgressants possessing *Allium fistulosum* L. genes recovered from interspecific hybrid backcrosses between *A. cepa* L. and *A. fistulosum* L. *Theor Appl Genet* 100: 528-534.
- Petrášek J, Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-2688.
- Petrivalský M, Vaníčková P, Ryzí M, Navrátilová B, Piterková J, Sedlářová M, Luhová L (2012) The effects of reactive nitrogen and oxygen species on the regeneration and growth of cucumber cells from isolated protoplasts. *Plant Cell Tiss Org* 108: 237-249.

- Petrić M, Jevremović S, Trifunović M, Tadić V, Milošević S, Dragičević M, Subotić A (2013) The effect of low temperature and GA₃ treatments on dormancy breaking and activity of antioxidant enzymes in *Fritillaria meleagris* bulblets cultured in vitro. *Acta Physiol Plant* 35: 3223-3236.
- Petrić M, Jevremović S, Trifunović M, Tadić V, Milošević S, Subotić A (2014) Activity of antioxidant enzymes during induction of morphogenesis of *Fritillaria meleagris* in bulb scale culture. *Turk J Biol* 38: 328-338.
- Phillips GC (2004) *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In vitro Cell Dev-Pl* 40: 342-345.
- Pinto G, Park YS, Neves L, Araújo C, Santos C (2008) Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Rep* 27: 1093-1101.
- Pinzón AM, Castillo B, Londoño MT (2013) Characterization of the mechanical properties of chives (*Allium schoenoprasum* L.) *Agronomía Colombiana* 31: 83-88.
- Pittler MH, Ernst E (2007) Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Mol Nutr Food Res* 51: 1382-1385.
- Plíhalová L, Vylíčilová H, Doležal K, Zahajská L, Zatloukal M, Strnad M (2015) Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.009>
- Popelka JC, Altpeter F (2003) Evaluation of rye (*Secale cereale* L.) inbred lines and their crosses for tissue culture response and stable genetic transformation of homozygous rye inbred line L22 by biolistic gene transfer. *Theor Appl Genet* 107: 583-590.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Seay M, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2007) Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4730-4735.
- Potters G, Pasternak TP, Guise Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12: 98-105.
- Pray C, Ma D, Huang J, Qiao F (2001) Impact of Bt Cotton in China. *World Dev* 29: 813-825.
- Priyono, Florin B, Rigoreau M, Ducos JP, Sumirat U, Mawardi S, Lambot C, Broun P, Pétiard V, Wahyudi T, Cruzillat D (2010) Somatic embryogenesis and

- vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Rep* 29: 343-357.
- Pueschel AK, Schwenkel HG, Winkelmann T (2003) Inheritance of the ability for regeneration via somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum*. *Plant Cell Tiss Org* 72: 43-51.
- Puigderrajols P, Mir G, Molinas M (2001) Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). *Ann Bot* 87: 178-189.
- Racchi ML, Terragna C (1993) Catalase isozymes are useful markers of differentiation in maize tissue cultures. *Plant Sci* 93: 195-202.
- Rai MK, Shekhawat NS, Harish, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K, Jaiswal U (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tiss Org* 106: 179-190.
- Rajeswari V, Paliwal K (2008) Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth). *Acta Physiol Plant* 30: 825-832.
- Rakshit S, Rashid Z, Sekhar JC, Fatma T, Dass S (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tiss Org* 100: 31-37.
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev-Pl* 38: 116-124.
- Ramakrishnan M, Antony Ceasar S, Duraipandiyan V, Daniel MA, Ignacimuthu S (2013) Efficacious somatic embryogenesis and fertile plant recovery from shoot apex explants of onion (*Allium cepa*. L.). *In Vitro Cell Dev-Pl* 49: 285-293.
- Ramírez-Malagón R, Pérez-Moreno L, Borodanenko A, Salinas-González GJ, Ochoa-Alejo N (2006) Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tiss Org* 86: 103-110.
- Rauber M, Grunewaldt J (1988) In vitro regeneration in *Allium* species. *Plant Cell Rep* 7: 426-429.
- Ravnikar M, Žel J, Plaper I, Špacapan A (1993) Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. *J Plant Growth Regul* 12: 73-77.

- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Benett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255-260.
- Reinert J (1958) Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber Deutsch Bot Ges* 71: 15.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JA (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544.
- Rivlin RS (2001) Historical Perspective on the Use of Garlic. *J Nutr* 131: 951S-954S.
- Robert U, Žel J, Ravnikar M (1998) Thermo-therapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. *Sci Hortic* 73: 193-202.
- Robledo-Paz A, Villalobos-Arámbula VM, Jofre-Garfias AE (2000) Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. *In Vitro Cell Dev-Pi* 36: 416-419.
- Robledo-Paz A, Cabrera-Ponce JL, Villalobos-Arámbula VM, Herrera-Estrela L, Jofre-Garfias AE (2004) Genetic transformation of garlic (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *HortScience* 39: 1208-1211.
- Rocha DI, Dorneles MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB reviews* 8: 022.
- Rose RJ, Nolan KE, Bicego L (1999) The development of the highly regenerable seed line Jermalong 2HA for transformation of *Medicago truncatula*: Implications for regenerability via somatic embryogenesis. *J Plant Physiol* 155: 788-791.
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* 18: 557-563.
- Růžička K, Šimášková M, Duclercq J, Petrášek J, Zažímalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu MCE, Benková E (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4284-4289.
- Sagare AP, Lee YL, Lin TC, Chen CC, Tsay HS (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) - a medicinal plant. *Plant Sci* 160: 139-147.

- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R (2004) Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* 16: 616-628.
- Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol Plantarum* 120: 152-161.
- Sakamoto T, Kamiya N, Ueguchi-Tanaka M, Iwahori S, Matsuoka M (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Gene Dev* 15: 581-590.
- Saker MM (1997/1998) In vitro regeneration of onion through repetitive somatic embryogenesis. *Biol Plantarum* 40: 499-506.
- Salehin M, Bagchi R, Estelle M (2015) SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27: 9-19.
- Sata SJ, Bagatharia SB, Thaker VS (2001) Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum*). *Methods Cell Sci* 22: 299-304.
- Sato Y, Demura T, Yamawaki K, Inoue Y, Sato S, Sugiyama M, Fukuda H (2006) Isolation and characterization of a novel peroxidase gene ZPO-C whose expression and function are closely associated with lignification during tracheary element differentiation. *Plant Cell Physiol* 47: 493-503.
- Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wiśniewska J, Reinöhl V, Friml J, Benková E (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Gene Dev* 20: 2902-2911.
- Scandalios JG (1987) The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. In: Rattazzi MC, Scandalios JC, Whitt GS (eds) *Isozymes: Current topics in biological and medical research, molecular and cellular biology*, Alan R.Liss, New York, pp 14: 19-44.
- Scandalios JG (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 101: 7-12.
- Schavemaker CM, Jacobsen E (1995) Development of a cyclic somatic embryogenesis regeneration system for leek (*Allium ampeloprasum* L.) using zygotic embryos. *Plant Cell Rep* 14: 227-231.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062.

- Schnablová R, Synková H, Vičánková A, Burketová L, Eder J, Cvirková M (2006) Transgenic *ipt* tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. *Plant Physiol Bioch* 44: 526-534.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G, Laux T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100: 635-644.
- Schopfer P (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant J* 28: 679-688.
- Schrader J, Baba K, May ST, Palme K, Benett M, Bhalerao RP, Sandberg G (2003) Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals. *Proc Natl Acad Sci* 100: 10096-10101.
- Schulze J (2007) Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron. In: Marian P (ed.) *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, Global Science Books, 1: 64-79.
- Scotton DC, Benedito VA, de Molfetta JB, Rodrigues BI FP, Tulmann-Neto A, Figueira A (2013) Response of root explants to in vitro cultivation of marketable garlic cultivars. *Hortic Bras* 31: 80-85.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72.
- Sena G, Birnbaum KD (2010) Built to rebuild: in search of organizing principles in plant regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 20: 460-465.
- Seo BB, Kim HH (1988) Regeneration of amphidiploid plants from tissue cultures of *Allium wakegi*. *Plant Cell Rep* 7: 297-300.
- Shani E, Yanai O, Ori N (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr Opin Plant Biol* 9: 484-489.
- Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ (2008) Cloning and molecular characterization of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228: 319-330.
- Shibaoka H (1994) Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: Alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 527-544.

- Shirshova TI, Beshlei IV, Deryagina VP, Ryzhova NI, Matistov NV (2013) Chemical composition of *Allium schoenoprasum* leaves and inhibitory effect of their extract on tumor growth in mice. *Pharm Chem J* 46: 672-675.
- Shiota H, Satoh R, Watabe K, Harada H, Kamada H (1998) C-ABI3, the carrot homologue of the Arabidopsis ABI3, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. *Plant Cell Physiol* 39: 1184-1193.
- Shiota H, Kamada H (2000) Acquisition of desiccation tolerance by cultured carrot cells upon ectopic expression of C-ABI3, a carrot homolog of ABI3. *J Plant Physiol* 156: 510-515.
- Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58: 1399-1417.
- Shuto H, Abe T, Sasahara T (1993) *In vitro* propagation of plants from root apex-derived calli in Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler) and garlic (*Allium sativum* L.) *Jpn J Breed* 43: 349-354.
- Si-Ammour A, Windels D, Arn-Boulidoires E, Kutter C, Ailhas J, Meins F Jr, Vazques F (2011) miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the *TIR1/AFB2* auxin receptor clade and auxin-related development of Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 157: 683-691.
- Silvertand B, Jacobsen E, Mazereeuw J, Lavrijsen P, van Harten A (1995) Efficient *in vitro* regeneration of leek (*Allium ampeloprasum* L.) via flower stalk segments. *Plant Cell Rep* 14: 423-427.
- Silvertand B, van Rooyen A, Lavrijsen P, van Harten AM, Jacobsen E (1996) Plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures derived from mature zygotic embryos of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Euphytica* 91: 261-270.
- Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA (1993) Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalcitrant and regenerating protoplasts. *Physiol Plantarum* 87: 263-270.
- Siminis CI, Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA (1994) Catalase Is Differentially Expressed in Dividing and Nondividing Protoplasts. *Plant Physiol* 105: 1375-1383.
- Singla B, Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P (2007) Analysis of expression profile of selected genes expressed during auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base system of wheat (*Triticum aestivum*) and their possible interactions. *Plant Mol Biol* 65: 677-692.

- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11: 118-130.
- Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. Biotechnol Adv 32: 2-11.
- Smertenko A, Bozhkov PV (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. J Exp Bot 65: 1343-1360.
- Sobolewska D, Michalska K, Podolak I, Grabowska K (2014) Steroidal saponins from the genus *Allium*. Phytochem Rev 15: 1-35.
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. Plant Cell Rep 19: 718-726.
- Song P, Peffley EB (1994) Plant regeneration from suspension cultures of *Allium fistulosum* and an *A. fistulosum* × *A. cepa* interspecific hybrid. Plant Sci 98: 63-68.
- Song SI, Cheong JJ, Choi YD (2007) Onion, garlic and related species. Biotechnol Agric For 59: 415-433.
- Song X, Han Y, Teng W, Sun G, Li W (2010) Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Plant Cell Rep 29: 125-131.
- Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. In vitro Cell Dev-Pl 38: 93-105.
- Stelmaszczuk M, Kozak D (2013) Micropropagation of *Allium neapolitanum* Cirillo. Acta Sci Pol Hortorum Cultus 12: 193-206.
- Steward FC, Mapes MO and Smlth J (1958) Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Am J Bot 45: 693-703.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. Proceedings of the National Academy of Science USA 98: 11806 – 11811.
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong LW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh TF, Fisher RL, Goldberg RB, Harada JJ (2008) Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON2*

- induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3151-3156.
- Strnad M, Hanus J, Vaněk T, Kamínek M, Ballantine JA, Fussell B, Hanke DE (1997) *Meta-topolin*, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. Robusta). *Phytochemistry* 45: 213-218.
- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS (2009) Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 448-460.
- Subhashini Devi P, Satyanarayana B, Arundhati A, Raghava Rao T (2013) Activity of antioxidant enzymes and secondary metabolites during *in vitro* regeneration of *Sterculia urens*. *Biol Plantarum* 57: 778-782.
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* 18: 463-471.
- Sugiyama M (1999) Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol* 2: 61-64.
- Sulistyaningsih E, Yamashita K, Tashiro Y (2002) Haploid induction from F₁ hybrids between CMS shallot with *Allium galanthum* cytoplasm and common onion by unpollinated flower culture. *Euphytica* 125: 139-144.
- Sulistyaningsih E, Aoyagi Y, Tashiro Y (2006) Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant Cell Tiss Org* 86: 249-255.
- Synková H, Semorádová Š, Burketová L (2004) High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Tiss Org* 79: 169-179.
- Štajner D, Čanadanović-Brunet J, Pavlović A (2004) *Allium schoenoprasum* L., as a Natural Antioxidant. *Phytother Res* 18: 522-524.
- Šušek A, Javornik B, Bohanec B (2002) Factors affecting direct organogenesis from flower explants of *Allium giganteum*. *Plant Cell Tiss Org* 68: 27-33.
- Taguchi-Shiobara F, Lin SY, Tanno K, Komatsuda T, Yano M, Sasaki T, Oka S (1997) Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 95: 828-833.
- Taguchi-Shiobara F, Yamamoto T, Yano M, Oka S (2006) Mapping QTLs that control the performance of rice tissue culture and evaluation of derived near-isogenic lines. *Theor Appl Genet* 112: 968-976.

- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4: 607-609.
- Takahama U, Yoshitama K (1998) Hydroxycinnamic acid esters enhance peroxidase-dependent oxidation of 3, 4-dihydroxyphenylalanine. Differences in the enhancement among the esters. *J Plant Res* 111: 97-100.
- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J Exp Bot, Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue* 53: 971-977.
- Tang W, Newton RJ (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Physiol Bioch* 43: 760-769.
- Tattelman E (2005) Health effects of garlic. *Am Fam Physician* 72: 103-106.
- Tchorbadjieva M, Pantchev I, Harizanova N (2004) Two-dimensional protein pattern analysis of extracellular proteins secreted by embryogenic and non-embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Biotechnol Biotec Eq* 18: 20-27.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signaling transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Bio* 7: 847-859.
- Teixeira da Silva JA (2013) The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. *Plant Cell Tiss Org* 113: 149-161.
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Bioch* 42: 35-42.
- Thompson HJM, Knox JP (1998) Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β -glucosyl Yariv reagent. *Planta* 205: 32-38.
- Thomson SJ, Rippon P, Butts C, Olsen S, Shaw M, Joyce NI, Eady CC (2013) Inhibition of platelet activation by lachrymatory factor synthase (LFS)-silenced (tearless) onion juice. *J Agr Food Chem* 61: 10574-10581.
- 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 Sci* 165: 701-707.

- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15: 533-543.
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- Torelli A, Borinato M, Francia S, Carra A, Ricci A, Branca C (2006) Adeninic and ureidic cytokinins: primary response events in in vitro tomato caulogenesis. *Plant Sci* 171: 60-73.
- Traas J, Monéger F (2010) Systems biology of organ initiation at the shoot apex. *Plant Physiol* 152: 420-427.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606-616.
- Tulecke WR (1953) A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science* 117: 599-600.
- Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R (2009) Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res* 681: 134-149.
- Umehara M, Sueyoshi T, Shimomura K, Nakahara T (2006a) Production of interspecific hybrids between *Allium fistulosum* L. and *A. macrostemon* Bunge through ovary culture. *Plant Cell Tiss Org* 87: 297-304.
- Umehara M, Sueyoshi T, Shimomura K, Iwai M, Shigyo M, Hirashima K, Nakahara T (2006b) Interspecific hybrids between *Allium fistulosum* and *Allium schoenoprasum* reveal carotene-rich phenotype. *Euphytica* 148: 295-301.
- Valero-Aracama C, Kane M, Wilson S, Philman N (2010) Substitution of benzyladenine with *meta*-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *Plant Growth Regul* 60: 43-49.
- Van der Valk P, Scholten OE, Verstappen F, Jansen RC, Dons JJM (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell Tiss Org* 30: 181-191.
- Van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries SC (2001) N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing Arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 125: 1880-1890.

- Van der Meer QP, de Vries JN (1990) An interspecific cross between *Allium roylei* Stearn and *Allium cepa* L., and its backcross to *A. cepa*. *Euphytica* 47: 29-31.
- Vankova R, Hsiao KC, Bomman CH, Gaudinova A (1991) Effects of synthetic cytokinins on levels of endogenous cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. *J Plant Growth Regul* 10: 197-199.
- Van Staden J, Davey JE (1979) The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. *Plant Cell Environ* 2: 93-106.
- Van Staden J, Crouch NR (1996) Benzyladenine and derivatives - their significance and interconversion in plants. *Plant Growth Regul* 19: 153-175.
- Van Staden J, Zazimalova E, George EF (2008) Cytokinins, their Analogues and Antagonists, *Plant Growth Regulators II in Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition George EF, Hall MA, De Klerk GJ 205-226.
- Vasil IK (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep* 27: 1423-1440.
- Vatankhah E, Niknam V, Ebrahimzadeh H (2010) Activity of antioxidant enzyme during *in vitro* organogenesis in *Crocus sativus*. *Biol Plantarum* 54: 509-514.
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D, May MJ, Sung ZR (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12: 97-109.
- Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckam T, Luschnig C, Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521-4531.
- Victor JMR, Murthy BNS, Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (1999) Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul* 28: 41-47.
- Visser C, Qureshi JA, Gill R, Saxena PK (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron: Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol* 99: 1704-1707.
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701-710.

- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org* 69: 233-249.
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53: 1227-1236.
- Wang M, van der Meulen RM, Visser K, Van Schaik HP, Van Duijn B, de Boer AH (1998) Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Sci Res* 8: 129-137.
- Wang P, Song CP (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytol* 178: 703-718.
- Wawrosch C, Malla PR, Kopp B (2001) Micropropagation of *Allium Wallichii* kunth, a threatened medicinal plant of Nepal. *In Vitro Cell Dev-Pl* 37: 555-557.
- Weigel D, Jürgens G (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415: 715-754.
- Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.
- Wenck AR, Conger BV, Trigiano RN, Sams CE (1988) Inhibition of somatic embryogenesis in Orchardgrass by endogenous cytokinins. *Plant Physiol* 88: 990-992.
- Werbrouck SPO, Van der Jeugt B, Dewitte W, Prinsen E, Van Onckelen HA, Debergh PC (1995) The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* 'Schott Petite' in relation to acclimatisation problems. *Plant Cell Rep* 14: 662-665.
- Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen HA, Debergh PC (1996) *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol Plantarum* 98: 291-297.
- Werner T, Motyka V, Laucov V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
- Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 12: 527-538.
- Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U, Schmülling T (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22: 3905-3920.

- White PR (1943) A handbook of plant tissue culture. 1st edn. Jaques Cattell Press, Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Willekens H, Villarroel R, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1994) Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). FEBS Lett 352: 79-83.
- Willemsen V, Scheres B (2004) Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. Annu Rev Genet 38: 587-614.
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinate behaviour of cells as an embryogenic group. Ann Bot 57: 443-462.
- Williams L, Zhao J, Morozova N, Li Y, Avivi Y, Grafi G (2003) Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. Dev Dynam 128: 113-120.
- Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD (2011) MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. Plant Physiol 155: 1871-1884.
- Wiśniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Růžička K, Blilou I, Rouquié D, Benková E, Scheres B, Friml J (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. Science 312: 883.
- Wójcikowska B, Jaskóła K, Gasiorek P, Meus M, Nowak K, Gaj MD (2013) *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via *YUCCA*-mediated auxin biosynthesis. Planta 238: 425-440.
- Wójcikowska B, Gaj MD (2015) *LEAFY COTYLEDON2*-mediated control of the endogenous hormone content: implications for the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. Plant Cell Tiss Org 121: 255-258.
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot 95: 707-735.
- Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. Anal Biochem 44: 301-305.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. Cell 138: 750-759.
- Wu Z, Chen LJ, Long YJ (2009) Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. In Vitro Cell Dev-Pl 45: 483-490.

- Xia XJ, Zhou YH, Shi K, Zhou J, Foyer CH, Yu JQ (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J Exp Bot* 66: 2839-2856.
- Xu X, Xie G, He L, Zhang J, Xu X, Qian R, Liang G, Liu JH (2013) Differences in oxidative stress, antioxidant systems, and microscopic analysis between regenerating callus-derived protoplasts and recalcitrant leaf mesophyll-derived protoplasts of *Citrus reticulata* Blanco. *Plant Cell Tiss Org* 114: 161-169.
- Xu Z, Um YC, Kim CH, Lu G, Guo DP, Liu HL, Bah AA, Mao A (2008) Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and in vitro bulblet formation. *Acta Physiol Plant* 40: 521-528.
- Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 514-519.
- Yan MM, Xu C, Kim CH, Um YC, Bah AA, Guo DP (2009) Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Sci Hortic* 123: 124-128.
- Yanagino T, Sugawara E, Watanabe M, Takahata Y (2003) Production and characterization of an interspecific hybrid between leek and garlic. *Theor Appl Genet* 107: 1-5.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sanderberg G, Samach A, Ori N (2005) Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* 15: 1566-1571.
- Yi HC, Mysore KS, Gelvin SB (2002) Expression of the *Arabidopsis* histone *H2A-1* gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. *Plant J* 32: 285-298.
- Yoshimura K, Ishikawa T, Nakamura Y, Tamoi M, Takeda T, Tada T, Nishimura K, Shigeoka S (1998) Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. *Arch Biochem Biophys* 353: 55-63.
- Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado H, Loza-Tavera H, Mora-Herrera M, Trevilla-García C, Vargas-Suárez M, Ougham H (2007) Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J Plant Physiol* 164: 1572-1582.
- Zhang W, Lin X, Takano H, Takio S, Ono K (2004) Efficient plant regeneration from suspension cells of *Allium cepa* L. *Plant Cell Rep* 23: 371-376.

- Zhang CR, Huang XL, Wu JY, Feng BH, Chen YF (2006) Identification of thidiazuron-induced ESTs expressed differentially during callus differentiation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol Plantarum* 128: 732-739.
- Zhang Y, Tan J, Guo Z, Lu S, He S, Shu W, Zhou B (2009) Increased abscisic acid levels in transgenic tobacco over-expressing 9 cis-epoxycarotenoid dioxygenase influence H₂O₂ and NO production and antioxidant defences. *Plant Cell Environ* 32: 509-519.
- Zhang S, Liu X, Lin Y, Xie G, Fu F, Liu H, Wang J, Gao S, Lan H, Rong T (2011) Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. *Plant Cell Tiss Org* 105: 29-37.
- Zhang TQ, Lian H, Tang H, Dolezal K, Zhou CM, Yu S, Chen JH, Chen Q, Liu H, Ljung K, Wang JW (2015) An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell* 27: 349-360.
- Zhao XY, Su YH, Zhang CL, Wang L, Li XG, Zhang XS (2013) Differences in capacities of *in vitro* organ regeneration between two *Arabidopsis* ecotypes Wassilewskija and Columbia. *Plant Cell Tiss Org* 112: 65-74.
- Zhao X, Li L (2013) Comparative analysis of microRNA promoters in *Arabidopsis* and rice. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11: 56-60.
- Zheng S, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Krens FA, Kik C (1998) Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. *Plant Cell Tiss Org* 53: 99-105.
- Zheng S, Henken B, Sofiari E, Keizer P, Jacobsen E, Kik C, Krens F (1999) Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures of *Allium cepa* L. *Euphytica* 108: 83-90.
- Zheng SJ, Khrustaleva L, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Kik C, Krens FA (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Mol Breeding* 7: 101-115.
- Zheng SJ, Henken B, Krens FA, Kik C (2003) The development of an efficient cultivar-independent plant reneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cell Dev-Pl* 39: 288-292.
- Zheng SJ, Henken B, Ahn YK, Krens FA, Kik C (2004) The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). *Mol Breeding* 14: 293-307.

- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.
- Ziv M, Lilien-Kipins H (2000) Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro. *Plant Cell Rep* 19: 845-850.
- Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH (2002) The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J* 30: 349-359.
- Żur I, Dubas E, Krzewska M, Janowiak F, Hura K, Pociecha E, Bączek-Kwinta R, Płażek (2014) Antioxidant activity and ROS tolerance in triticale (*x Triticosecale* Wittm.) anthers affect the efficiency of microspore embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org* 119: 79-94.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ljiljana B. Tubić je rođena 09. januara 1981. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2000/2001 godine na studijskoj grupi Biologija. Fakultet je završila 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,19. Iste godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

Od februara 2010. godine radi kao istraživač pripravnik na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, a od maja 2011. godine radi na istom mestu kao istraživač saradnik. Tokom istraživačkog rada Ljiljana B. Tubić je učestvovala u realizaciji dva nacionalna projekta: „Regulacija morfogenetskih procesa i sekundarnog metabolizma i genetičke transformacije biljaka u kulturi *in vitro*“ (br. 143026B, u periodu od 2006-2010. godine) i Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste“ (br. 173015, u periodu od 2011. do danas), oba pod rukovodstvom dr Branke Vinterhalter.

Ljiljana B. Tubić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Federacije evropskih udruženja za biljnu biologiju (FESPB). Dobitnik je nagrade za najbolji poster na simpozijumu nacionalnog značaja „XVIII Simpozijum Društva za fiziologiju biljaka Srbije“, 2009. godine.